



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Análisis de la expresión de genes regulados por mir-26a en un
modelo de cáncer colorrectal asociado
a inflamación crónica**

TESIS

Que para obtener el título de:

Biólogo

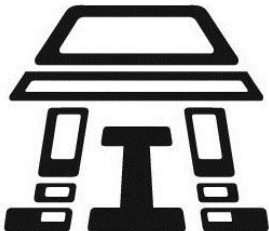
Presenta:

Jossimar Coronel Hernández

Director de Tesis: Dr. Carlos Pérez Plasencia

Tlalnepantla de Baz. Edo. De México

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Este proyecto fue realizado en el Laboratorio de Genómica funcional de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la UNAM bajo la dirección del Dr. Carlos Pérez Plasencia.

Este proyecto fue financiado por CONACYT, del fondo sectorial en salud número SALUD-2009-01-113948 y numero CONACY-catedras-2425.

Durante el desarrollo del trabajo, Jossimar Coronel Hernández fue depositario del Programa de Becas de Inicio a la Investigación (PROBEI) de la Comisión Coordinadora de Institutos Nacionales de Salud y Hospitales de Alta Especialidad.

Me imagino perfectamente que, cuando el señor creó el mundo y a las personas que habitan en él –obra que, según la ciencia moderna, llevó mucho tiempo- razonó consigo mismo de la manera siguiente: “Si lo hago todo predecible, estos seres humanos, a los que he dotado de cerebros bastante buenos, indudablemente aprenderán a predecirlo todo y, por lo tanto, no tendrán aliciente alguno para hacer absolutamente nada, pues reconocerán que el futuro está totalmente determinado y que en él no puede influir ninguna acción humana. Por otra parte, si todo lo hago impredecible, gradualmente descubrirán que no existe base racional para tomar ninguna decisión y, por lo tanto, como en el primer caso no tendrán motivo alguno para hacer nada. Ninguno de estos dos proyectos tiene sentido. Crearé, por tanto, una mezcla de las dos. Que unas cosas sean predecibles y otras impredecibles. Así, entre otras muchas cosas, su importante tarea será la de saber cuál es cuál”

E. F. Schumacher

¡Experimenta!

Haz de ello tu consigna día y noche.

Experimenta,

y ello te llevará a la luz.

La manzana en la copa del árbol

nunca está demasiado alta para alcanzarla,

así que sigue el ejemplo de Eva.

¡Experimenta!

Sé curioso,

aunque los amigos con quien te cruces se molesten.

Enójate

cada vez que quieran retenerte.

Si solo sigues este consejo,

el futuro puede ofrecerte una infinita felicidad y alegría

Experimenta ¡Y ya verás!

Cole Porter

-No hay medicina que cure lo que no cura la felicidad-

Gabriel García Márquez

Dedicatoria

A Catalina:

Por ser el motor de mi vida y la fuerza que me impulsa
a ser mejor cada día

Agradecimientos

A mi madre Catalina Hernández Saavedra, por ser una mujer valiente, por ser padre y madre a la vez, por ser mi heroína, por apoyarme siempre e incondicionalmente, por saber respetar mis decisiones y por estar siempre pendiente de mí.

A Mirna, Perla y Mariela, por brindarme su amistad y haberme permitido disfrutar de momentos muy gratos en esas prácticas de campo, por el fallido intento de enseñarme a bailar y por permitirme formar parte de grupos tan memorables como “*los muéganos de la esquina*” y el “*equipo de las chicas*”.

A Mayito, Maicol, Martín, Anisho, Mitzy, Blancas, Ricardo, Carlingui, Pablo, Karencita, Erick y Alex, por haber sido mis amigos durante la carrera.

A Johnny, Ness, Cuchi e Yrvinn, que a pesar de vernos con poca frecuencia han sabido apoyarme “de lejitos” y han sido mis amigos de toda la vida.

A Osvaldo, Oliver, Verito, Rebe, Luisa y Víctor, por ser el mejor equipo de trabajo que he conocido en la vida, y por compartir conmigo momentos tan agradables con “*Don more*”. Gracias por darme de su comida en el laboratorio y por dejarme molestarlos hasta el cansancio.

A Brendita, por escuchar siempre mis ideas con respecto al proyecto aun sin entenderme mucho y por mostrarse siempre muy interesada, por el apoyo moral que me brindo, y por estar a mi lado durante este tiempo.

A Vero García por ser una muy buena amiga, una excelente maestra y sobre todo por tener las ganas y la paciencia para enseñarme todos los secretos que existen detrás de las tan tediosas técnicas de la biología molecular.

A la tan carismática y alegre Dra. Gaby, por ser una excelente amiga y darme buenos consejos.

Al Dr. Urrutia, poseedor de un característico sentido del humor, quien desde el momento de su llegada al laboratorio demostró una inteligencia y una capacidad inigualable y me brindo su amistad y apoyo incondicional.

Y especialmente al Dr. Carlos por haberme aceptado como parte de su grupo de investigación y haber confiado en mí para llevar a cabo este proyecto, por decirme frases motivacionales como: *“Con mi cerebro y tus manos, llegaremos muy lejos”*. Por ser un excelente tutor y buen amigo, por seguir apoyándome en mis planes de posgrado y por forjar en mí un carácter de responsabilidad y compromiso.

Abreviaturas

AFIP - Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América

AOM - Azoximetano

APC - Adenomatous polyposis coli

BrEt - Bromuro de Etidio

β -TRCP - Beta-transducin repeat containing

CCR - Cancer Colorrectal

CDK4,5,6 - Cinasas dependiente de ciclinas

CDKN1A – Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas 1A

CENTG1 - Centaurin family of ADP-ribosylation factor directed GTPase-activating proteins

CK1A - Casein Kinase 1A

c-myc - Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

COX2 - Ciclo-oxigenasa 2

CyclinD1,E - CiclinaD1, E

DSS - Dextran Sulfato de Sodio

EII - Enfermedad inflamatoria intestinal

FCA - Focos de criptas aberrantes

GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GSK-3 β - Glycogen synthase kinase-3 beta

HIF-1 α - Factor 1 Inducible por Hipoxia

IARC - International Agency for Research on Cancer

IFN- γ - Interferón gamma

IL17, 4, 10 - Interleucina 17,4,10

K-Ras - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

miRNA – microRNA

MMR - Mismatch repair

NF- κ B - Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B

OMS - Organización Mundial de la Salud

PDVF - Polifluoruro de vinilideno

PGE2 – Prostaglandina 2

PI3K-AKT - Fosfatidil-inositol-3-cinasa AKT

PIKE - Phosphoinositide 3-kinase enhancer

PIP2 - Fosfatidil-inositol-bifosfato

PIP3 - Fosfatidil-inositol-trifosfato

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

qRT-PCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Rb1 - Retinoblastoma 1

RISC - Complejo inductor de silenciamiento de RNA

RTK - Receptor de cinasas de tirosina

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

SINAVE - Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica

TCF/LEF - T-cell and lymphoid enhancing transcription factor

TGF- β - Factor de crecimiento transformante beta

TNF- α - Factor de necrosis tumoral alfa

UTR - Untranslated

VEGF - Factor de crecimiento endotelial vascular

Wnt - Wingless protein

ÍNDICE

1.- Resumen	1
2.- Introducción	2
2.1- Cáncer, un problema de salud pública a nivel mundial	2
2.2- Factores etiológicos del cáncer colorrectal	5
2.2.1- Factores genéticos.....	5
2.2.2-Factores ambientales.....	7
2.3- Enfermedad inflamatoria intestinal y su papel en el CCR	7
2.4- Mecanismos moleculares del CCR	8
2.5- PTEN y la vía de señalización AKT	11
2.6- GSK-3 β y APC, reguladores de la vía Wnt/ β -catenina	12
2.7- Rb1, controlador maestro del ciclo celular	14
2.8- MicroRNAs reguladores clave de la expresión génica	16
2.8.1 Biogénesis de los miRNAs.....	16
2.9- MicroRNAs en CCR.....	18
2.10 Antecedentes	20
3.- Justificación	21
4.- Hipótesis	21
5.- Objetivos	22
6.- Materiales y Métodos	23
6.1 Identificación de miRNA	23
6.2 Establecimiento de modelos de CCR.....	23
6.2.1 Modelo <i>in vivo</i>	23
6.2.2 Análisis histológico.....	24
6.2.3 Modelo <i>in vitro</i>	24
6.3 Expresión de citocinas, mir-26a y sus genes blancos a nivel de mensajero.....	25
6.3.1 Diseño de Oligonucleótidos	25
6.3.2 Extracción de RNA	25
6.3.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)	26
6.4 Expresión de genes potencialmente regulados por mir-26a a nivel proteico	28
6.4.1Extracción de Proteínas	28
6.4.2 Western Blot	28

6.5 Análisis estadístico.....	30
7.- Resultados.....	31
8.- Discusión.....	46
9.- Conclusiones.....	51
10.- Perspectivas.....	52
11.- Bibliografía.....	53

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Lista de miRNAs asociados a la progresión de CCR.....	19
Tabla 2. Listado de oligonucleótidos.....	25
Tabla 3. Condiciones de PCR pf para citocinas y genes regulados por mir-26a.....	27
Tabla 4. Condiciones de amplificación de mir-26a para qRT-PCR.....	27
Tabla 5. Condiciones de amplificación para qRT-PCR para citocinas y genes regulados por mir-26a.....	27
Tabla 6. Listado de anticuerpos utilizados para Westen Blot.....	29
Tabla 7. Análisis bioinformático de miRNAs sobreexpresados en CCR y sus posibles genes blanco.....	31
Tabla 8. Porcentaje de unión de mir-26a a sus respectivos genes blanco.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad relacionada con cáncer a nivel mundial.....	3
Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer CCR a nivel mundial mundial.....	4
Figura 3. Tasa de mortalidad de CCR por cada 100,000 habitantes, según entidad federativa.....	5
Figura 4. El microambiente inflamatorio, nueva característica emergente de las células cancerígenas.....	8
Figura 5. Secuencia del modelo genético de carcinogénesis colorrectal propuesto por Vogelstein.....	9
Figura 6. Eventos moleculares que influyen en el desarrollo de CCR asociado a inflamación crónica.....	10
Figura 7. Vía de señalización PI3K-AKT.....	11
Figura 8. Vía de señalización Wnt/ β -catenina.....	13

Figura 9. La función principal de Rb1 es regular la progresión del ciclo celular.....	14
Figura 10. Biogénesis de microRNAs.....	17
Figura 11. Modelo de carcinogénesis de CCR asociado a inflamación, basado en la administración de AOM/DSS.	24
Figura 12a. Representación de la ganancia y/o pérdida de peso durante el desarrollo de CCR en el modelo <i>in vivo</i>	33
Figura 12b. Número de tumores promedio que desarrolló cada ratón durante el modelo de carcinogénesis	34
Figura 13. Cortes longitudinales obtenidos del modelo de CCR de los diferentes grupos experimentales.	34
Figura 14. Secciones histológicas de la región media del colon teñidas con H&E	36
Figura 15. Imagen representativa de la integridad del RNA de las muestras del modelo de CCR AOM/DSS.....	37
Figura 16a. Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR pf de los genes involucrados en la respuesta inflamatoria	38
Figura 16b. Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR pf de los posibles genes regulados por mir-26a.	39
Figura 17. Nivel de expresión relativo de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias medidas por qRT-PCR durante la progresión del CCR en el modelo <i>in vivo</i>	40
Figura 18. Sobreexpresión de mir-26a durante la progresión del CCR en el modelo <i>in vivo</i> y en la línea celular HCT116	41
Figura 19. Disminución en la expresión de los posibles genes regulados por mir-26a en el modelo <i>in vivo</i> y en la línea HCT116.....	42
Figura 21a Expresión de las de las proteínas reguladas por mir-26a mediante Western Blot.,	44
Figura 21b Análisis densitométrico de Western Blot	45

1.- Resumen

Universidad Nacional Autónoma de México.

Unidad de Biomedicina. Facultad de Estudios Superiores Iztacala.

Coronel Hernández Jossimar

El cáncer colorrectal (CCR) es la cuarta causa más común de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial. Se ha observado que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica es mayor la probabilidad de desarrollar esta neoplasia. Además, diversos estudios demuestran que existe disminución en la expresión de los genes supresores de tumor p53, GSK-3 β , APC, CDKN1A, PTEN y Rb1. Por otra parte, nueva evidencia sugiere que los microRNAs pueden ejercer una función oncogénica y promover el desarrollo y crecimiento del tumor. Mediante un análisis bioinformático hemos identificado a mir-26a como un posible regulador de GSK-3 β , APC, PTEN y Rb1.

Para analizar esta relación se indujo CCR en ratones Balb/c utilizando el modelo carcinogénico de AOM/DSS; se realizaron cortes histológicos de los tumores para observar el desarrollo de la neoplasia. Mediante qRT-PCR se analizó el perfil inflamatorio y se encontró sobreexpresión de TNF- α . Se midió el nivel de expresión de mir-26a, GSK-3 β , APC, PTEN y Rb1. Se encontró sobreexpresión de mir-26a en el modelo *in vivo* y en la línea celular HCT116 derivada de CCR. Por otra parte, la expresión de los transcritos de GSK-3 β , APC, PTEN y Rb1 disminuyó durante la progresión del modelo *in vivo* y en HCT116. Mediante Western Blot se observó decremento en la expresión de las proteínas GSK-3 β , APC y Rb1, dicha disminución presenta un patrón consistente con la sobreexpresión de mir-26a.

2.- Introducción

2.1- Cáncer, un problema de salud pública a nivel mundial

Se define como cáncer al proceso de crecimiento sin control de algunas células que son capaces de invadir localmente y a distancia otros tejidos. Las células tumorales desarrollan una serie de cambios genéticos que les confieren ciertas ventajas para proliferar y crecer, permitiendo la transformación progresiva de células normales a células neoplásicas (Hanahan and Weinberg, 2000).

El cáncer es la principal causa de muerte a nivel mundial y se le atribuyen más de 8.2 millones de defunciones ocurridas en el 2012 (Ferlay, 2013).

De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2014) aproximadamente el 22% de los casos están asociados al consumo de tabaco y un 20% están vinculados a infecciones bacterianas o virales. Por otra parte, el índice de masa corporal elevado, el consumo de alcohol y la predisposición hereditaria son factores de riesgo importantes en el desarrollo y progresión del cáncer.

Actualmente, los tipos de cáncer con mayor incidencia en ambos sexos son: cáncer de mama, próstata, pulmón y colorrectal, siendo el cáncer de pulmón el que presenta la tasa más alta de mortalidad (Ferlay, 2013) (Figura 1).

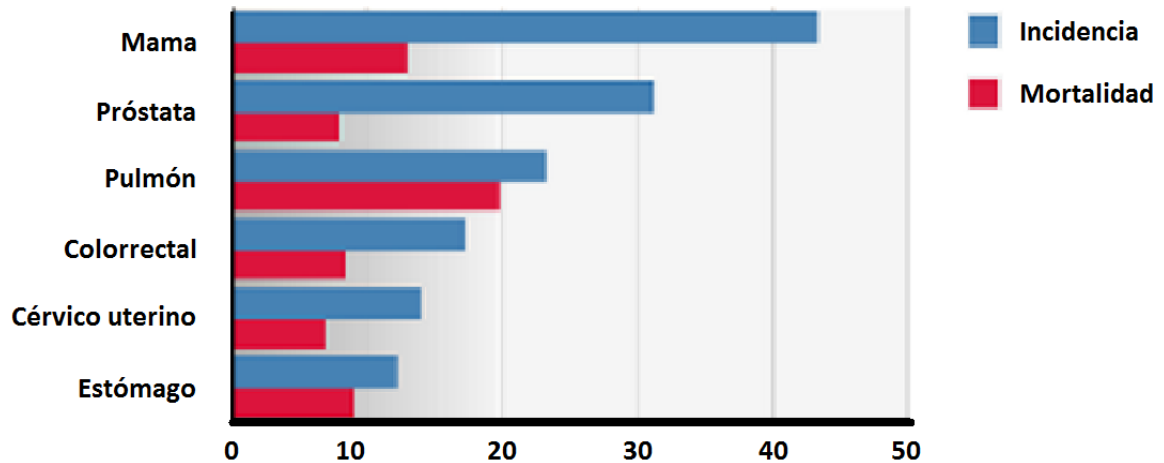


Figura 1. Tasas de incidencia y mortalidad relacionada con cáncer a nivel mundial (los números en el eje de las abscisas representan la tasa respectiva por cada 100,000 personas) (GLOBOCAN 2012).

Con base en la clasificación de la IARC (International Agency for Research on Cancer, 2012), el cáncer colorrectal (CCR) es la cuarta causa más común de muerte relacionada con cáncer en ambos sexos, en todo el mundo. En el 2012 se presentaron 1,360,602 casos de los cuales 693,881 fueron decesos. Es el tercero más común en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial. Las tasas de incidencia más altas se reportaron en Australia (44.8 y 32.3 por cada 100,000 hombres y mujeres respectivamente), mientras que la mortalidad más elevada se registró en la parte Central de Europa (20.3 y 11.7 por cada 100,000 hombres y mujeres) (Figura 2).

A su vez, en América fueron reportados 245,643 casos con una incidencia de 22.3 por cada 100,000 hombres y 17.6 por cada 100.000 mujeres, registrando una mortalidad de 9.8 y 7.4 por cada 100,000 hombres y mujeres respectivamente (Ferlay, 2013).

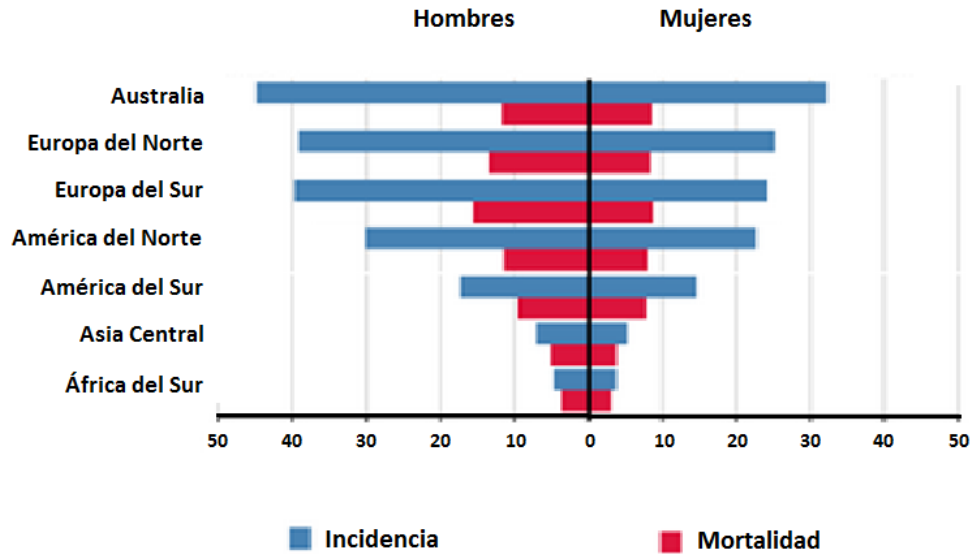


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer CCR a nivel mundial mundial (los números en el eje de las abscisas representan la tasa respectiva por cada 100,000 personas) (GLOBOCAN 2013).

En México, el CCR es la segunda causa de muerte por cáncer y el cuarto más frecuente dentro de la patología oncológica en la población, afectando en igual proporción a hombres y mujeres. Tan solo en el año 2012, se presentaron 8651 casos, de los cuales 4694 fueron decesos.

En pacientes mexicanos, se ha observado que el riesgo de adquirir este tipo de cáncer se incrementa a partir de los 35 años de edad con máximo a los 65, y a pesar de ser una neoplasia ubicada en pacientes de edad avanzada, cada día se detectan casos en personas más jóvenes.

Por otra parte, el CCR se ha situado entre las 10 primeras causas de muerte principalmente en Sonora, Chihuahua, Baja California Sur y el Distrito Federal, estados que presentan las tasas de mortalidad más altas (SINAVE 2011) (Figura 3).

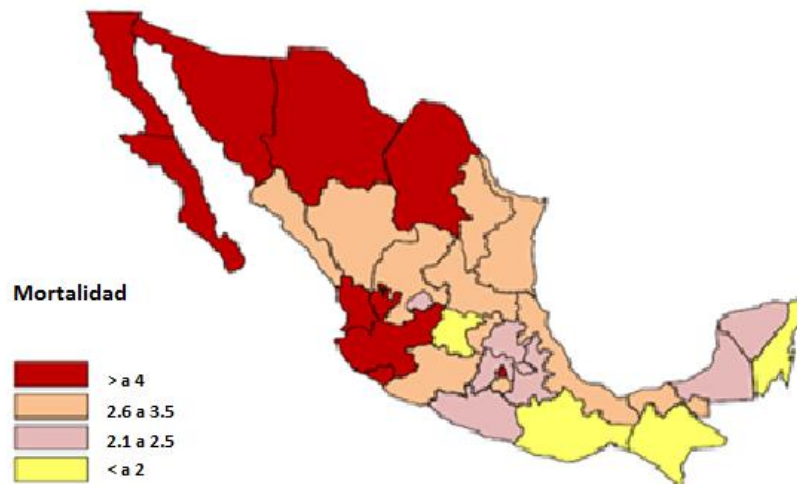


Figura 3. Tasa de mortalidad de CCR por cada 100,000 habitantes, según entidad federativa (SINAVE 2011).

2.2- Factores etiológicos del cáncer colorrectal

La etiología del CCR es compleja; incluye factores genéticos y ambientales.

2.2.1- Factores genéticos: Se han descrito varios factores de predisposición hereditaria que se relacionan con la presencia de polimorfismos proteicos, tales como:

Poliposis Adenomatosa Familiar

Representa tan solo el 1% del CCR, se asocia a una mutación germinal en el gen APC (Adenomatous polyposis coli por sus siglas en ingles) que se hereda de forma autosómica dominante; se caracteriza por presentar cientos de pólipos, que al no ser removidos quirúrgicamente desarrollaran CCR. Este tipo de síndrome presenta manifestaciones extracolónicas benignas (osteomas y adenoma de suprarrenales) y malignas (cáncer gástrico) (Boman and Fields, 2013).

CCR no poliposico hereditario

Conocido como Síndrome de Lynch, es una condición hereditaria en la que se presentan mutaciones germinales en los genes MSH2 y MLH1, los cuales codifican para proteínas involucradas en la identificación y reparación de errores en el DNA. Estas proteínas forman un complejo mismatch repair (MMR). Los pacientes con Síndrome de Lynch presentan cambios moleculares conocidos como inestabilidad microsatélite, es decir, que existe un error en la maquinaria de reparación post-replicativa del DNA y no se reconocen los apareamientos erróneos de bases nitrogenadas causados por errores en la replicación. Esta inestabilidad conlleva a la acumulación de mutaciones en las células somáticas; además, la pérdida de la actividad MMR reduce la resistencia al efecto tóxico de diversos compuestos capaces de dañar el DNA (Lynch et al., 2009).

Síndromes de poliposis hamartomatosa

Se incluye al Síndrome de Peutz-Jeghers, Síndrome de poliposis juvenil, Síndrome de Cowden y el Síndrome de Bannayan-Ruvalcaba, y representan el 1% de los casos de CCR, afectando en su mayoría a la población infantil y juvenil. Se caracterizan por pólipos en el colon y en el intestino delgado, además de la presencia de lesiones en la mucosa oral. En estos síndromes se encuentra afectado el gen PTEN (Phosphatase and tensin homolog por sus siglas en inglés) (Bosserhoff et al., 2006).

2.2.2-Factores ambientales

Dentro de estos factores destacan: el consumo de comidas ricas en grasa y carnes rojas, la falta de actividad física que da como resultado un incremento en las tasas de obesidad y sobrepeso, el consumo excesivo de alcohol y tabaco, entre otros factores (Cross et al., 2010).

Por otra parte, estudios recientes muestran que en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII), constituida por la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn, existe una mayor probabilidad de desarrollar CCR, debido a que el estrés oxidativo producido por citocinas pro-inflamatorias induce mutaciones en genes supresores de tumores, y consecuentemente promueve la formación del carcinoma (Hyun et al., 2012).

2.3- Enfermedad inflamatoria intestinal y su papel en el CCR

Hanahan y Weinberg, mencionaron en el 2011 que el proceso inflamatorio contribuye a la progresión de la neoplasia, debido a que la inflamación promueve la activación constante de moléculas, tales como: factores de crecimiento que mantienen señales constantes de proliferación, factores de supervivencia que limitan la muerte celular y enzimas modificadoras de la matriz extracelular que facilitan los procesos de angiogénesis, invasión y metástasis (Figura 4).

Diversos estudios en CCR han demostrado que la sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias tales como IL-6, IFN- γ y TNF- α , estimulan la glucólisis, proliferación, reclutamiento de células del sistema inmune y producción de factores de crecimiento, favoreciendo el desarrollo de la enfermedad (Straus, 2013).

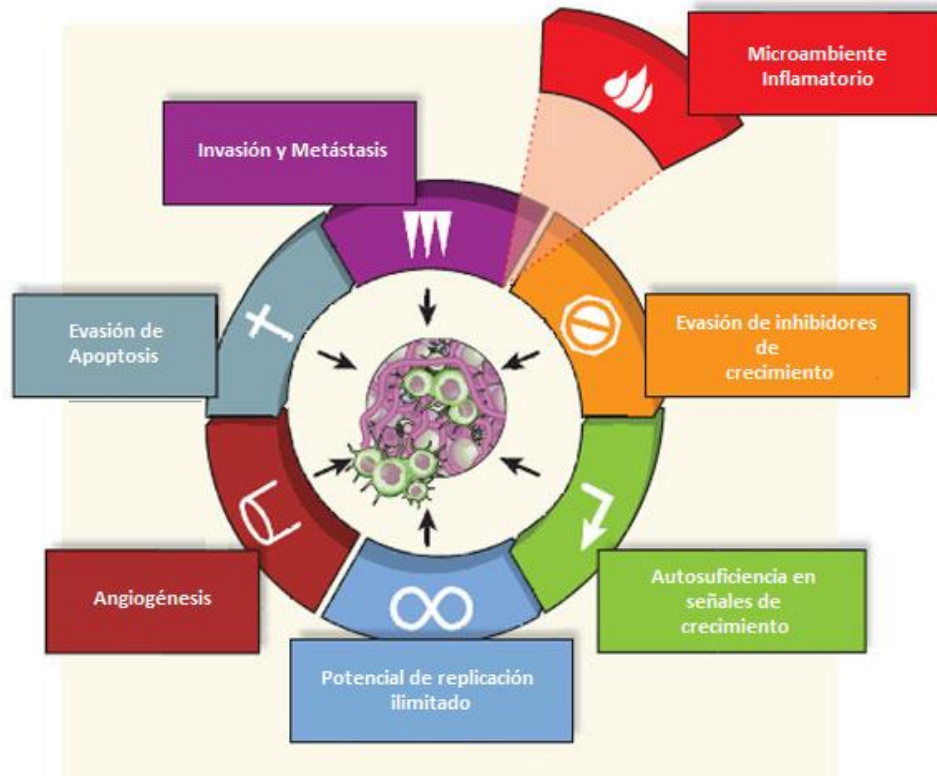


Figura 4. El microambiente inflamatorio, nueva característica emergente de las células cancerígenas (modificado de Hanahan, 2011).

Por otra parte, las citocinas anti-inflamatorias tales como IL-10, IL-4, IL-13 e IFN- α , regulan e inhiben la producción de citocinas pro-inflamatorias, mediante la respuesta inmune Th2 y por la supresión en la activación de macrófagos; además se ha reportado que estas citocinas evitan el desarrollo tumoral. Sin embargo, en CCR se ha observado disminución en su expresión (Coussens and Werb, 2002).

2.4- Mecanismos moleculares del CCR

Para explicar el desarrollo progresivo del CCR, Vogelstein propuso un modelo llamado “*multi-step carcinogenesis*” que comienza con la mutación en el brazo largo del cromosoma 5q (región donde se localiza el gen APC) en el epitelio normal del colon. Esta alteración es la responsable de la actividad hiperproliferativa del epitelio, la formación de

pólipos y focos de criptas aberrantes, que dan lugar a adenomas menores de 1cm. En éstos, la hipometilación del DNA favorece la expresión de oncogenes como K-Ras, que envía continuamente señales mitóticas y de supervivencia, evitando que se lleve a cabo la apoptosis. Durante la evolución del adenoma se produce la delección de p53 y con ello la aparición de carcinomas invasivos. Además, alteraciones posteriores en Rb1 (Retinoblastoma por sus siglas en ingles) y c-myc confieren malignidad a las células invasivas (Fearon y Vogelstein, 1990) (Figura 5).

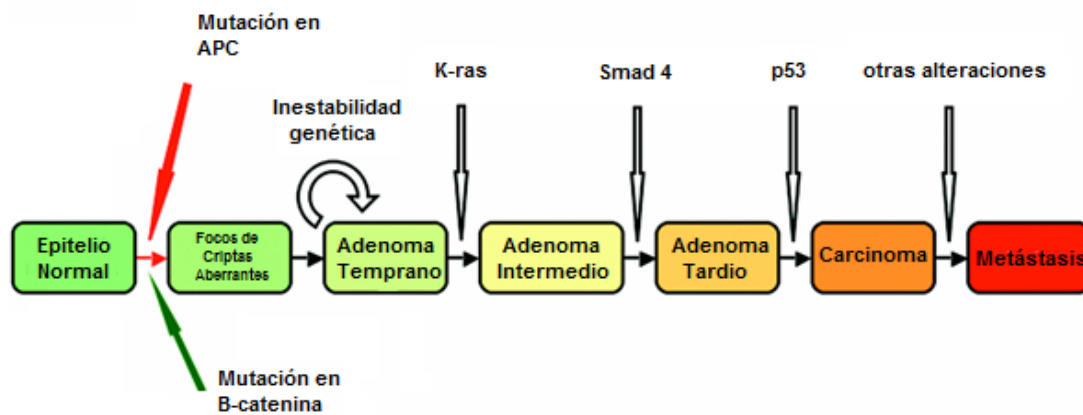


Figura 5. Secuencia del modelo genético de carcinogénesis colorrectal propuesto por Vogelstein. Explica la progresión del CCR desde la mucosa normal del colon hasta el carcinoma. La mutación de APC permite la sobreexpresión de β -catenina (modificado de Fearon y Vogelstein, 1990).

Se ha observado que la carcinogénesis de colon en pacientes con EII, presenta alteraciones genéticas diferentes a las descritas por Vogelstein (Feagins et al., 2009).

La inflamación crónica, permite la producción de citocinas pro-inflamatorias ($TNF-\alpha$, IL-17, $IFN-\gamma$ y $TGF-\beta$) que inducen mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumor. Se ha observado que dichas mutaciones permiten la activación aberrante de la vía de señalización Wnt/ β -catenina, presentando mutaciones en el gen APC y β -catenina favoreciendo la transición de células pre-neoplásicas a focos de criptas aberrantes,

posteriormente en adenoma y finalmente a carcinoma (Terzić et al., 2010) (Figura 6). Cabe resaltar que la sobreexpresión temprana de β -catenina no se debe a la inactivación de APC, ya que la inactivación de este gen es el último evento molecular (en este modelo). Por otra parte, se ha sugerido que proteínas asociadas a procesos inflamatorios como COX-2, NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células Beta activadas por sus siglas en ingles) y PGE2 promueven y potencializan la función de β -catenina (Zhang et al., 2012).

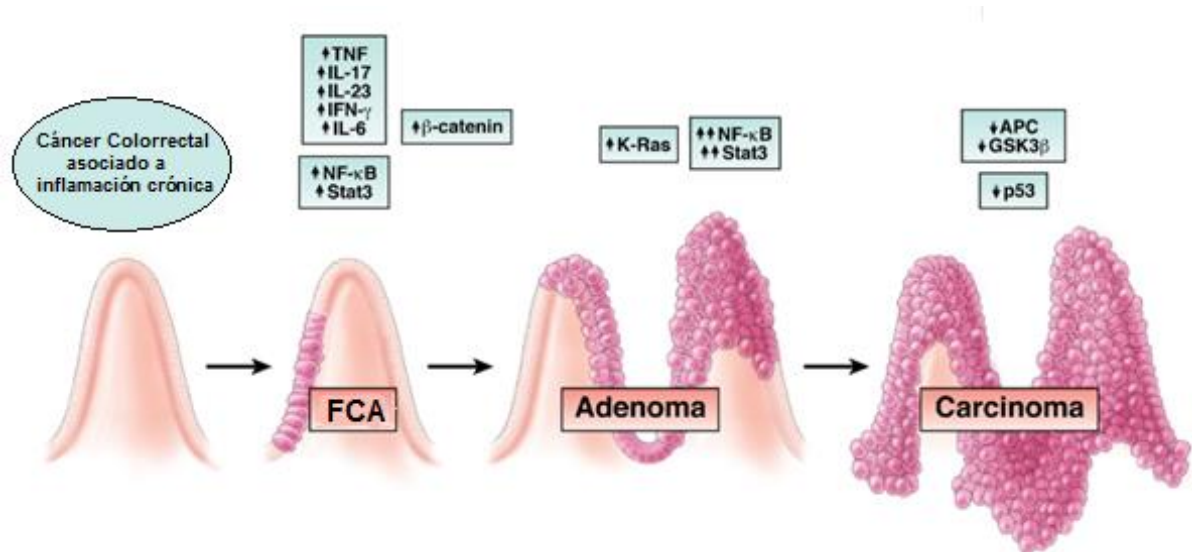


Figura 6. Eventos moleculares que influyen en el desarrollo de CCR asociado a inflamación crónica. Se observa un aumento en la producción de citocinas pro-inflamatorias asociado a la formación de focos de criptas aberrantes (FCA), dicho aumento genera inestabilidad en los genes APC, GSK-3 β y P53 promoviendo la progresión a carcinoma (modificada de Terzic, 2010).

En su conjunto, trabajos recientes han logrado identificar algunos genes relacionados directamente con los mecanismos moleculares que originan el CCR; entre ellos destacan PTEN, GSK-3 β , APC y Rb1.

2.5- PTEN y la vía de señalización AKT

El gen PTEN codifica para una fosfatasa supresora de tumor que modula la progresión del ciclo celular al regular negativamente la actividad de la vía de señalización PI3K-AKT (fosfatidil-inositol-3-cinasa AKT por sus siglas en inglés). PTEN es capaz de fosforilar a PIP3 (fosfatidil-inositol-trifosfato) regresándola a su estado basal PIP2 (fosfatidil-inositol-bifosfato). PIP3 puede donar su fosfato a la proteína AKT, activarla, y de esta manera promover la proliferación celular y evadir apoptosis (Papandreou and Logothetis, 2004) (Figura 7).

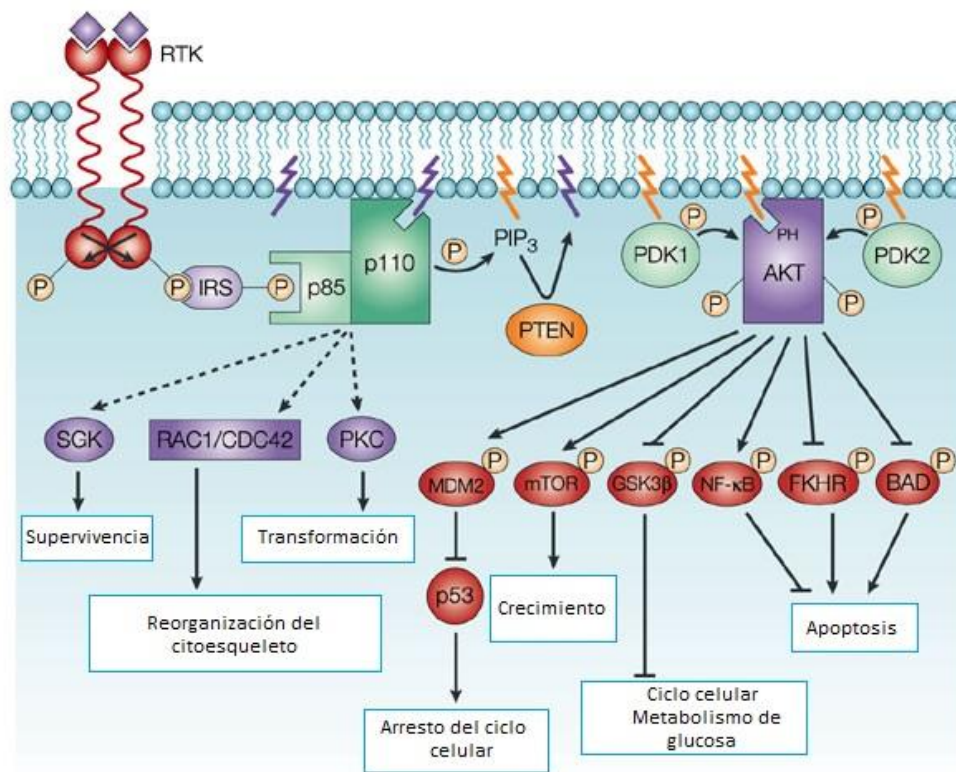


Figura 7. Vía de señalización PI3K-AKT. La activación de la vía PI3K ocurre a través de la estimulación del receptor de cinasas de tirosina (RTK), el cual interactúa con la subunidad p110 la que cataliza la conversión de PIP2 a PIP3. PIP3 sirve como segundo mensajero que activa mediante fosforilación a la proteína AKT. AKT promueve activación e inhibición de varios blancos que regulan el crecimiento de la célula, señales de supervivencia y reorganización del citoesqueleto. PTEN puede defosforilar a PIP3 y de esta manera inhibir a la proteína AKT (modificado de Vivanco and Sawyers, 2002).

Agarwal demostró en el 2004 que en líneas celulares derivadas de CCR, la inhibición de PTEN permite la activación de la vía PI3K-AKT, promoviendo la sobreactivación de las proteínas NF- κ B y β -catenina; adicionalmente, hallaron correlación entre la elevada expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la ciclo-oxigenasa 2 (COX2) en la invasión y migración de este cáncer.

Por otra parte, Kara et al., (2012) reportó que la inactivación de PTEN en pacientes con CCR contribuye a la sobreexpresión de VEGF, lo que promueve eventos de angiogénesis, proliferación celular y regulación de la apoptosis.

Además, Mao y colaboradores (2012) evaluaron la expresión de PTEN en 69 tumores de pacientes de origen chino con CCR, y encontraron disminución de la expresión del 42%, e incremento en la concentración de PIP-3 y de la activación de la vía PI3K-AKT.

2.6- GSK-3 β y APC, reguladores de la vía Wnt/ β -catenina

El gen GSK-3 β por sus siglas en inglés (Glycogen synthase kinase-3 beta) codifica para una proteína serina/treonina cinasa que regula diversas vías de señalización, mediante la fosforilación de varios sustratos, y tiene un papel primordial en la regulación de la vía Wnt/ β -catenina (Shakoori et al., 2005) (Figura 8).

El gen APC codifica una proteína que además de regular la degradación de β -catenina, también, regula a proteínas modificadoras de citoesqueleto, por lo que juega un papel importante en la migración celular, adhesión celular y la mitosis (Näthke, 2004) (Figura 8).

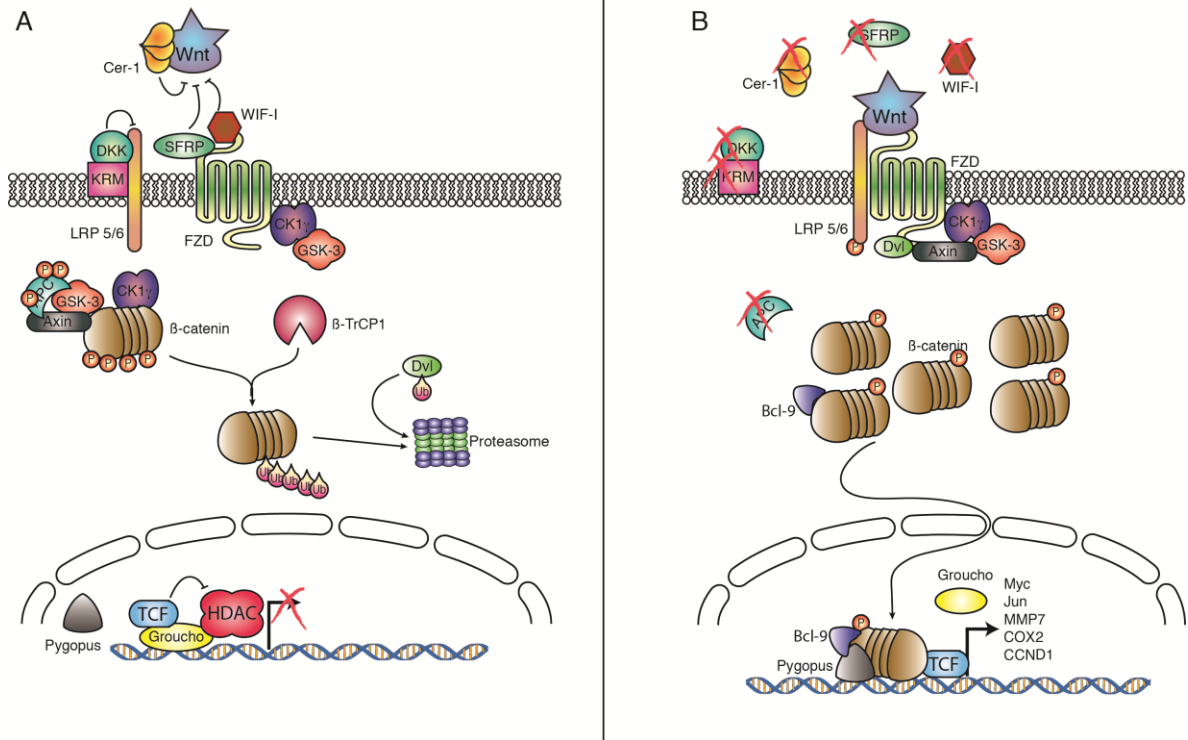


Figura 8. Vía de señalización Wnt/β-catenina. a) En ausencia de la señalización activada por Wnt, β-catenina es secuestrada por un complejo formado por APC, Axina, CK1a y GSK-3β. APC reconoce la estructura proteica de β-catenina y la incorpora al complejo, posteriormente GSK-3β fosforila los residuos amino-terminal de β-catenina, facilitando que sea ubiquitinada por β-TRCP y después sea degradada por el proteasoma. b) En presencia de señales positivas provenientes de la cascada de señalización Wnt, la proteína Dvl facilita la reubicación de axina hacia la membrana, esto impide que se forme el complejo de degradación. Este evento permite la acumulación de β-catenina y su entrada al núcleo, donde interactúa con el factor de transcripción TCF/LEF, el cual transcribe genes que activan procesos de proliferación celular (modificado de Barker and Clevers, 2006).

Se ha demostrado que la pérdida de la función de APC en el tejido colorrectal desencadena una serie de cambios histológicos y moleculares que permiten la expansión clonal de las células neoplásicas, generando inestabilidad genética (Fodde, 2002).

Kucherlapati et al., (2008), evaluaron diferentes mutaciones en APC utilizando un modelo en ratones, y observaron que en algunos animales se indujo el desarrollo de gran cantidad de adenomas en el intestino delgado y disminuciones significativas en el tiempo de vida. Además, los autores promovieron una mutación adicional en el gen Rb1 y observaron que

ambas mutaciones confieren un mayor potencial de invasión al tumor, demostrando que la correcta función de APC y Rb1 es crucial para evitar el desarrollo de la neoplasia.

Por otra parte, Voloshanenko (2013) menciona que la intensa actividad de la vía Wnt es esencial para mantener una proliferación activa de las células colorrectales tumorales; esto se debe a una serie de mutaciones en APC y GSK-3 β , dichas mutaciones inhiben la formación del complejo de degradación de β -catenina. Además, también ocurre un proceso de secreción autocrina de proteínas-ligandos que activan la vía Wnt, generando en las criptas del colon, un microambiente que favorece el desarrollo tumoral.

2.7- Rb1, controlador maestro del ciclo celular

El gen Rb1 codifica para una proteína que detiene la progresión del ciclo celular de la fase G1 a la fase S a través de la regulación negativa del factor de transcripción E2F1-3 (Di Fiore et al., 2013). Diversos estudios han demostrado que la inactivación de Rb1 permite la proliferación excesiva, además promueve la inestabilidad genética y la evolución del tumor, incrementando su resistencia a la terapia (Manning and Dyson, 2011) (Figura 9).

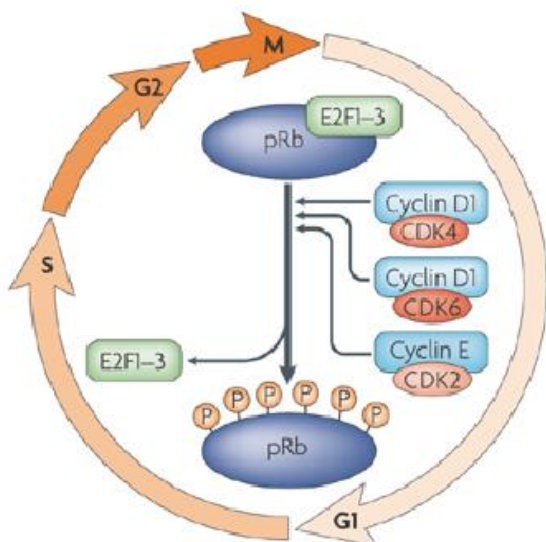


Figura 9. La función principal de Rb1 es regular la progresión del ciclo celular. La transición de G1 a S se activa por la fosforilación de Rb1 mediante el complejo de ciclinas (Cyclin D1,E) y las cinasas dependiente de ciclinas (CDK4,6 y 2). La hiperfosforilación de Rb1 está asociada con la liberación del factor de transcripción E2F1-3, el cual activa genes requeridos para la progresión del ciclo celular (Coller, 2007).

Soletti y colaboradores (2013) demostraron que en pacientes con CCR derivado de enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa existe disminución en la expresión de Rb1 e incremento en β -catenina; a su vez, existe aumento en la proteína Rb1 en su estado hiperfosforilado, debido a la inactivación de la proteína CDKN1A que se encarga de regular negativamente a CDK4/6 y CDk2, las cuales fosforilan a Rb1, permitiendo así la disociación y activación del factor de transcripción E2F responsable de la progresión del ciclo celular.

Por otra parte, Ivkovic et al., (2013) reporto que en CCR esporádico existe sobreexpresión de mRNA de Rb1 pero inversamente, existe una disminución a nivel de proteína; esto lo atribuyen a la sobreexpresión de mir-106a, el cual puede regular negativamente la traducción de la proteína Rb1.

Adicionalmente, estudios recientes indican que diversos eventos moleculares asociados a la carcinogénesis podrían estar sujetos a regulación post-transcripcional ejercida por microRNAs (Tili et al., 2013).

2.8- MicroRNAs reguladores clave de la expresión génica

Los microRNA (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA monocatenario (19 a 22 nucleótidos) no codificantes, capaces de regular la expresión génica a nivel post- transcripcional, mediante su unión a la región 3'UTR del mRNA del gen blanco, provocando la degradación completa del mensajero o solo la inhibición de la traducción. Un solo miRNA puede regular múltiples genes, actuando así como un control maestro de la expresión génica (Carthew and Sontheimer, 2009). Tan solo en seres humanos, la base de datos miRBase tiene documentados más de 1,000 miRNAs, lo que representa un 3% del genoma humano y posiblemente regulan al 30% de los genes que se transcriben (Bentwich et al., 2005).

2.8.1 Biogénesis de los miRNAs

Para la maduración de un miRNA es necesario que se lleven a cabo 3 pasos: la transcripción de un RNA precursor conocido como pri-microRNA, su procesamiento en el núcleo que da como resultado un segundo intermediario llamado pre-microRNA y finalmente su maduración en el citoplasma (Figura 10). El pri-microRNA es una molécula de cientos de bases de longitud compuesta por varias horquillas, sintetizado a partir de DNA por una RNA polimerasa tipo II. Después de que el pri-microRNA es transcrito, es procesado por una RNAsa llamada Drosha, dando como resultado una molécula con estructura de tallo y asa de aproximadamente 70 bases de longitud (pre-microRNA). El pre-microRNA es transportado del núcleo hacia el citoplasma con la ayuda de la exportina 5. Ya en el citoplasma, la endoribonucleasa DICER escinde 2 miRNAs maduros (20-25 nucleótidos) a partir de cada pre-microRNA; uno o ambos pueden ser activos (Lee et al.,

2002). Posteriormente, DICER forma (junto con las proteínas Argonautas) el complejo inductor de silenciamiento de RNA (RISC, por sus siglas en ingles). Las proteínas Argonautas tienen la capacidad de incorporar a los miRNAs maduros al complejo RISC en una dirección 5' a 3'; también tienen actividad de endonucleasa, lo que permite la degradación del mRNA complementario al miRNA (Lee et al., 2003). Si el miRNA es perfectamente complementario al mRNA blanco, éste será degradado en su totalidad, por otra parte, cuando el miRNA no es totalmente complementario ocurre represión en el proceso de traducción ocasionado por modificaciones en la estructura del mRNA blanco (Gu and Kay, 2010).

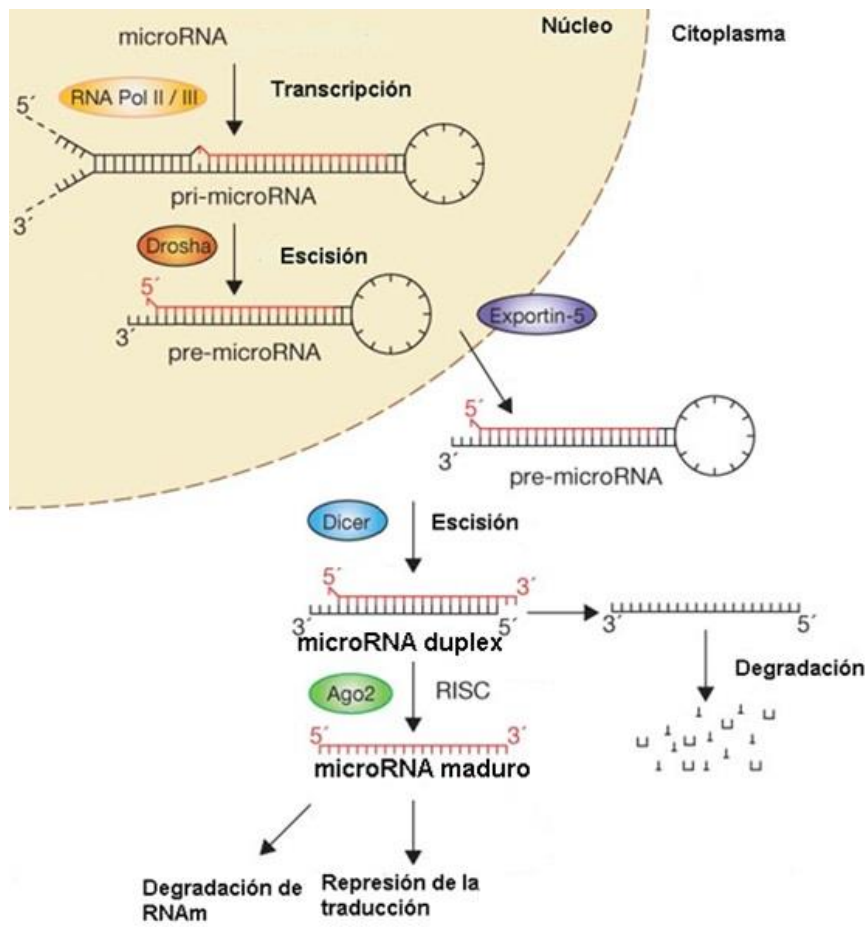


Figura 10. Biogénesis de microRNAs (modificado de Lee et al., 2002).

2.9- MicroRNAs en CCR

Recientemente se ha demostrado que los miRNAs pueden ser herramientas muy útiles para la caracterización de algunos tipos de cáncer ya que están relacionados con los procesos de diferenciación celular, progresión del ciclo celular y apoptosis. (Yang et al., 2009)

Bandres y colaboradores (2006) mencionan que la primera evidencia clínica en la que se demostró un cambio en la expresión de algunos miRNAs fue en pacientes con leucemia linfática crónica, donde se encontró subexpresión de mir-15 y mir-16. A partir de esta investigación, se han reportado alteraciones en la expresión de miRNAs en cáncer de mama (Valastyan et al., 2009), glioblastoma (Gabriely et al., 2008), hepatocarcinoma celular (Zhu et al., 2012), carcinoma de tiroides (Pallante et al., 2006) y en CCR (Kanaan et al., 2012).

El primer estudio acerca de miRNAs en CCR se debe a Michael y colaboradores (2003) en el que identificaron que mir-145 y mir-143 son factores potenciales en la tumorigénesis de colon.

Por otra parte, Xi et al., (2006) realizaron un análisis de expresión de miRNAs en células derivadas de cáncer de colon HCT116 y encontraron que existe desregulación en 10 miRNAs (mir-30, mir-181, let-7g, mir-26a, let-7b, mir-15, mir-27a, mir-200c, mir-191 y mir-30c) donde mir-191 y mir-200 se encontraron sobrepresados significativamente. Además demostraron que estos miRNAs tienen la capacidad de regular a la proteína supresora de tumor p53.

Subsecuentemente, varios autores, utilizando nuevas herramientas genómicas como los análisis de microarreglos, han identificado más de 100 miRNAs implicados en la progresión del CCR. Yang et al., (2009) publicaron una lista en la que resume el nivel de expresión de algunos miRNAs que participan en el desarrollo del CCR. (Tabla 1)

microRNAs sobrexpresados	microRNAs subexpresados
let-7b	let-7a
let-7 g	miR-10a
miR-9	miR-15b
miR-21	miR-23a
miR-26a	miR-25
miR-30a-3p	miR-27a
miR-30a-5p	miR-27b
miR-31	miR-30c
miR-96	miR-107
miR-124b	miR-124a
miR-132	miR0125a
miR-135a	miR-125b
miR-135b	miR-127
miR-141	miR-130a
miR-142-3p	miR-133a
miR-142-5p	miR-133b
miR-181 a	miR-134
miR-181b	miR-137
miR-182	miR-143
miR-183	miR-145
miR-194	miR-147
miR-200a	miR-154
miR-200b	miR-191
miR-200c	miR-199a
miR-203	miR-199b
miR-205	miR-214

Tabla 1. Lista de miRNAs asociados a la progresión de CCR publicada por Yang en el 2009.

2.10 Antecedentes

Mediante un análisis bioinformático preliminar, en nuestro grupo de trabajo hemos identificado a mir-26a como un posible regulador de PTEN, Rb1, APC y GSK-3 β , genes de importancia para el desarrollo de CCR. Por otra parte, existe evidencia experimental de la actividad de mir-26a en el desarrollo de otras neoplasias.

Por medio de la técnica de microarreglos, Huse y colaboradores (2009) encontraron que mir-26a se encuentra sobreexpresado en pacientes con glioma avanzado, y que en cultivo celular puede reprimir la actividad de PTEN. La relevancia fisiológica de mir-26a en la gliomagénesis fue demostrada usando un modelo animal, donde al transfectar mir-26a con un vector retroviral dirigido específicamente hacia las células gliales, se observó el desarrollo de gliomas de alto grado y disminución en la concentración de la proteína PTEN.

Por otra parte, Zhang et al., 2012 demostraron que en células derivadas de colangiocarcinoma existe sobreexpresión de mir-26a asociada a la disminución de GSK-3 β , lo que resulta en la activación de β -catenina y la inducción de varios oncogenes incluyendo c-myc, CiclinaD1 y COX2.

3.- Justificación

El CCR constituye una importante causa de mortalidad en nuestro país. Tan solo en el año 2012, en México, se presentaron 8651 casos, de los cuales 4694 (54% de los casos) fueron decesos.

A pesar de los conocimientos que se tienen en el desarrollo de esta enfermedad, aún no se tiene una terapia eficaz, por lo que es importante que la investigación se dirija al estudio de blancos moleculares que contribuya a mejorar la calidad de vida de quién padece esta enfermedad

En este trabajo, se analizan los perfiles de expresión de algunos genes supresores de tumor y de un posible regulador epigenético (mir-26a) en diferentes etapas del desarrollo de CCR asociado a inflamación crónica utilizando un modelo *in vivo*.

4.- Hipótesis

La sobreexpresión de mir-26a contribuye al desarrollo del cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica, mediante la regulación negativa de los genes PTEN, GSK-3 β , Rb1 y APC e indirectamente promueve la activación de vías de señalización asociadas a la progresión tumoral.

5.- Objetivos

Objetivo General

Analizar la relación entre mir-26a y la expresión de los genes PTEN, Rb1, APC y GSK-3 β en un modelo *in vivo* de cáncer colorrectal asociado a inflamación crónica y en la línea celular HCT116.

Objetivos Particulares

- 1.- Inducir cáncer colorrectal en ratones Balb/c mediante la administración de Azoximetano (AOM) y Dextran Sulfato de sodio (DSS).
- 2.- Realizar análisis morfo-histológico después de cada administración de DSS con el fin de observar la progresión gradual de la neoplasia.
- 3.- Analizar el perfil inflamatorio por qRT-PCR durante el desarrollo del modelo.
- 4.- Medir la expresión de mir-26a mediante qRT-PCR durante el desarrollo del modelo *in vivo* y en la línea celular HCT116.
- 5.- Analizar, en el modelo *in vivo* y en la línea celular HCT116, el nivel de expresión de transcritos de PTEN, Rb1, APC y GSK-3 β por qRT-PCR.
- 6.- Medir la expresión de las proteínas PTEN, Rb1, APC, GSK-3 β , β -catenina y AKT en el modelo *in vivo* mediante Western Blot.

6.- Materiales y Métodos

6.1 Identificación de miRNA

Se utilizaron los algoritmos de microRNA (<http://www.microrna.org>), miRDB (<http://mirdb.org/miRDB/>) y TargetScan (<http://www.targetscan.org/>) para predecir que miRNA (de la lista publicada por Yang) tiene sitios de unión a la región 3'-UTR de los genes PTEN, Rb1, APC, GSK-3 β , P53 Y CDKN1A.

6.2 Establecimiento de modelos de CCR

6.2.1 Modelo *in vivo*

El establecimiento del modelo *in vivo* de CCR asociado a inflamación ha sido previamente reportado por Tanaka en el 2003. En este modelo, el AOM funciona como un agente carcinógeno al inducir la formación de aductos en el DNA, mientras que el DSS promueve la inflamación y el desarrollo de colitis. Los ratones Balb/c machos fueron adquiridos en los laboratorios Harlan, y fueron separados en dos grupos experimentales: el grupo control (n=3) y el grupo AOM/DSS (n=9). Los ratones control fueron mantenidos con agua y alimento *ad libitum* durante 65 días. Por otra parte, los ratones del grupo AOM/DSS en el día 1, fueron administrados i.p con 12.5 mg/kg de AOM (Sigma-Aldrich). Después de 5 días se les administró 2.0% de DSS (Sigma-Aldrich) en el agua durante 5 días. Posteriormente, los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum* por 14 días. Terminado este periodo de tiempo se repitió el procedimiento de administración del DSS dos veces más (se sacrificaron tres ratones después de cada administración de DSS, con el fin de observar el desarrollo del proceso tumoral de una manera gradual). Finalmente, los ratones restantes fueron sacrificados en el día 68 (Figura 11). El colon fue

removido, y para evaluar la evolución de la enfermedad, los tumores se contaron y midieron con un microscopio de disección y con un vernier respectivamente.

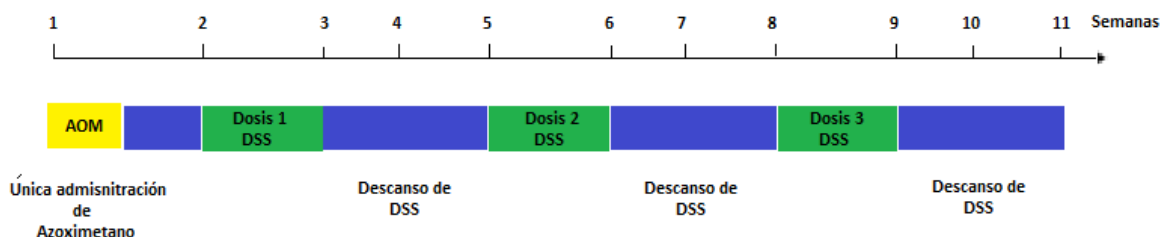


Figura 11. Modelo de carcinogénesis de CCR asociado a inflamación, basado en la administración de AOM/DSS. Los recuadros verdes indican las fases en las que se realizaron los análisis, morfo-histológico, moleculares y epigenéticos.

6.2.2 Análisis histológico

Para validar el desarrollo de la enfermedad, los tumores se procesaron para cortes histológicos siguiendo el protocolo del Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). El colon fue examinado usando cortes de 5 μm de grueso y teñidos con H & E (Hematoxilina y Eosina).

6.2.3 Modelo *in vitro*

Para comparar el nivel de expresión de los genes a evaluar, se utilizó la línea celular HCT116, la cual no está asociada a procesos inflamatorios. La línea celular HCT116, proporcionada por el Instituto Nacional de Cancerología, fue sembrada en placas Petri de 100 x 20 mm y se mantuvo en medio RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen) suplementado con Suero Fetal Bovino (SFB bioWEST) Inactivado al 10% mantenidas bajo condiciones de 5% de CO_2 a una temperatura de 37°C en un incubador (Thermo Scientific 8000 WJ).

6.3 Expresión de citocinas, mir-26a y sus genes blancos a nivel de mensajero

6.3.1 Diseño de Oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para alinearse en regiones conservadas entre los genes PTEN, Rb1, APC y GSK-3 β de humano y ratón empleando el software CLC Sequence Viewer 6.0; de esta manera, fue posible obtener amplicones para ambas muestras. Los oligonucleótidos para la detección de los mensajeros de las citocinas asociadas al proceso inflamatorio fueron proporcionados por el Laboratorio de Inmunología de la Unidad de Biomedicina de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UBIMED, FES-I). Las secuencias empleadas se muestran en la Tabla 2.

Gen	Secuencia	Tm	Secuencia de unión (GenBank ID)
PTEN F	AGGCACAAGAGGCCCTAGAT	58.1	NM_000314.4
PTEN R	AACTGAGGATTGCAAGTTCCG	55.5	NM_000314.4
Rb1 F	CACCAGGCCTCCTACCTTGT	59	NM_000321.2
Rb1 R	GGTGTGGCAGACCTTCTGA	57.3	NM_000321.2
GSK-3 β F	CGAGACACACCTGCACTCTT	57.1	NM_001146156.1
GSK-3 β R	TTAGTATCTGAGGCTGCTGTGG	56.3	NM_001146156.1
APC F	GTTGCCAACAAAGGCTACGC	57.4	NM_000038.5
APC R	ACATCTGCTCGCCAAGACAA	57	NM_000038.5
Beta catenina F	GGCCTCTGATAAAGGCAACTG	55.9	NM_001904.3
Beta catenina R	CCGAGCAAGGATGTGGAGAG	57.6	NM_001904.3
IL - 4 F	CGAAGAACCACACAGAGTGAGCT	61	NM_000589.3
IL - 4 R	GACTCATTGATGGTGACGCTTATCG	61.5	NM_000589.3
IL - 10 F	CTCCTACCTTGTGTGCCTACCTTGT	58	NM_000572.2
IL - 10 R	ATTCGTGAAGCGGCCACAGTT	58	NM_000572.2
IFN - γ F	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	57	NM_000619.2
IFN - γ R	AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG	57	NM_000619.2
TNF- α F	GGCAGGCTACTTTGGAGTCATTGC	63	NM_000594.3
TNF- α R	ACATTGAGGCTCCAAGTGAATTCG	63	NM_000594.3
GAPDH F	TCACGCCACAGTTTCCCGGAG	62	NM_002046.5
GAPDH R	CCTCAAGATCATCAGCAATGCCT	57.4	NM_002046.5
mir-26	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU	62	AJ421747.1
RNU6	CGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCCATATTTTT	62	NR_004394.1

Tabla 2. Listado de oligonucleótidos obtenidos mediante el software CLC Sequence Viewer 6.0.

6.3.2 Extracción de RNA

Se utilizaron 100 mg de tejido, el cual fue homogenizado con un Buller Blender (Next Advance) siguiendo el protocolo Bullet Blender Homogenizer for Intestinal Tissue. Las muestras fueron centrifugadas a 13,000 rpm por 20 minutos con el objetivo de

separar lípidos, carbohidratos y material extracelular. Posteriormente se llevó a cabo la extracción de RNA por el método de TRIzol (Life Technologies) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El RNA obtenido se resuspendió en 50 µl de agua milliQ (Millipore). La cuantificación del RNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una absorbancia de 260 nm. La integridad del mismo se analizó mediante un gel de agarosa al 1.5 % teñido con BrEt (bromuro de etidio).

6.3.3 Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

Con el objetivo de conocer el nivel de expresión de los diferentes genes a evaluar se utilizó la técnica de PCR en tiempo real (qRT-PCR), que es empleada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación empleando como molde DNA, los oligonucleótidos mencionados en la lista 2, dNTPs (10mM), buffer de reacción (5X) y enzima DNA polimerasa termoestable (taqPolimerasa). Además se necesita la adición de una sustancia marcada con un flouorforo que tras ser excitado nos permite medir la fluorescencia y de manera indirecta el nivel de expresión de los genes. Primeramente, fue necesario estandarizar las condiciones de amplificación por medio de PCR punto final (PCR pf) utilizando el kit GoTaq DNA Polymerase (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Axygen (Maxygen Gradient Thermal Cycler) siguiendo las condiciones representadas en la Tabla 3.

El qRT-PCR se realizó en el LightCycler 2.0 de Roche, utilizando el kit LightCycler Taqman Master Mix para mir-26a (Roche) y el kit Titan One Tube Sybr Green (Roche) para los genes regulados por mir-26a y las citocinas asociadas al proceso inflamatorio (Tablas 4 y 5). Para normalizar la expresión de los mensajeros, se cuantificó el RNA

nuclear U6 y el mRNA de GAPDH respectivamente. Se calculó el valor relativo de expresión de los genes durante las diferentes etapas del modelo utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Applied Biosystems). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

Paso	Temperatura C°	Duración	Repetición
Desnaturalización Inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	10 s	40x
Alineamiento	45-65 *	30 s	
Elongación	72	30 s	
Elongación Final	72	10 min	1
Enfriamiento	4	∞	1

Tabla 3. Condiciones de PCR pf para citocinas y genes regulados por mir-26a. *La temperatura puede variar con base a la Tm de cada oligonucleótido (Promega).

Paso	Temperatura C°	Duración	Repetición
Desnaturalización Inicial	95	10 min	1
Desnaturalización	95	10 s	40x
Alineamiento	68	40 s	
Extensión	72	1 s	
Enfriamiento	40	30 s	1

Tabla 4. Condiciones de amplificación de mir-26a para qRT-PCR (Roche).

Paso	Temperatura C°	Duración	Repetición
Síntesis de cDNA	50	30 min	1
Desnaturalización Inicial	94	2 min	1
Desnaturalización	94	10 s	40x
Alineamiento	45-65 *	30 s	
Elongación	68	45 s	
Elongación Final	68	7 min	1
Enfriamiento	37	2 min	1

Tabla 5. Condiciones de amplificación para qRT-PCR para citocinas y genes regulados por mir-26a. *La temperatura puede variar con base a la Tm de cada oligonucleótido (Roche).

6.4 Expresión de genes potencialmente regulados por mir-26a a nivel proteico

6.4.1 Extracción de Proteínas

Para la obtención de proteínas, el tejido fue homogenizado con ayuda de un Politron. La extracción se realizó bajo la técnica de RIPPA, siguiendo las instrucciones del fabricante (Santa Cruz Biotechnology). La cuantificación de las proteínas se llevó a cabo con el método colorimétrico de Bradford (Sigma-Aldrich) en espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) con una longitud de onda de 595 nm.

6.4.2 Western Blot

Con el objetivo de detectar y medir el nivel de expresión de las proteínas PTEN, Rb1, GSK-3 β y APC se utilizó la técnica de Western Blot. Se emplearon 100 μ g de proteínas, las cuales fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, en esta técnica las proteínas pierden las estructuras secundarias y terciarias, haciendo que se separen en función de su peso molecular) utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) a 80 volts por 2 horas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de PDVF (*polifluoruro de vinilideno*) con un poro de 0.45 μ m mediante transferencia semi-seca en un equipo Trans-blot turbo (BioRad) a 20 volts por 30 minutos. Al terminar la transferencia, la membrana de PDVF fue bloqueada con una solución de leche libre de grasa al 5% en TBS-Tween 0.1 % por 2 horas, esto es con el objetivo de que las proteínas en la solución se unan a los lugares de la membrana que no estén ocupados por proteínas, reduciendo así el ruido de fondo.

Posteriormente se hicieron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% y se incubo durante toda la noche con el anticuerpo (Ab) primario correspondiente a la proteína a detectar (Tabla 7).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación del Ab primario, se realizaron tres lavados con TBS-Tween y se incubo con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peróxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP) por 2 horas. Después de 3 lavados con TBS, se utilizó el sustrato quimioluminiscente SuperSignal West Femto Maximun Sensitivity Substrate (#34095, Thermo Scientific). La detección de los inmunocomplejos se realizó a través del digitalizador C-Digit Blot Scanner (Li-COR) empleando el software ImageStudio.

Anticuerpo	No. catálogo	Ab secundario
Anti-β-catenina	Sc-7199	anti-mouse
Anti-GSK-3β	Sc-9166	Anti-rabbit
Anti-Rb1	Sc-50	Anti-rabbit
Anti-PTEN	Sc-7974	Anti-mouse
Anti-AKT	Sc-8312	Anti-rabbit
Anti- β-Actina	Sc-47778	Anti-mouse
Anti-APC	Sc-896	Anti-rabbit
bovine anti-mouse IgG-HRP	sc-2371	n/a
bovine anti-rabbit IgG-HRP	sc-2370	n/a

Tabla 6. Listado de anticuerpos utilizados para Westen Blot

6.5 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos de qRT-PCR y densitometría derivada de Western Blot se utilizó Excel 2010 (Microsoft). Las gráficas se generaron con ayuda del software Prism 5 (GraphPad); las barras de error en todos los casos indican desviación estándar. Los datos de expresión qRT-PCR fueron analizados por anova de una sola vía y análisis de Tukey como prueba complementaria.

7.- Resultados

Para elegir el miRNA a estudiar, se seleccionaron los primeros 10 miRNAs mayormente expresados en CCR basándonos en la lista publicada por Yang en el 2009. Usando los algoritmos bioinformáticos de Targetscan y miRECORDS detectamos que algunos genes supresores de tumores asociados al desarrollo del CCR (tales como PTEN, p53, APC, GSK-3 β , Rb1 y CDKN1A) poseían sitios de unión para los miRNAs seleccionados. Notablemente se encontró que mir-26a tiene sitios de unión en más genes supresores de tumores que los demás miRNAs, mostrando un sitio en APC, GSK-3 β , Rb1 y tres sitios en PTEN (Tabla 7).

		Genes Supresor de Tumor					
		PTEN	p53	APC	GSK-3 β	Rb1	CDKN1A
miRNAs	let-7b		1				1
	let-7g		1			1	
	mir-9				1		
	mir-21						
	mir-26	3		1	1	1	
	mir-30-3p						
	mir-30-5p						
	mir-31						
	mir-96			1			
	mir-124b			1	1		

Tabla 7. Análisis bioinformático de miRNAs sobrepresados en CCR y sus posibles genes blanco

Para conocer el porcentaje de unión de mir-26a a la región 3 UTR de PTEN, APC, GSK-3 β y Rb1, se utilizó la base de datos de miRanda. El porcentaje más alto de unión fue el de GSK-3 β con 94%, seguido por PTEN con un 91%. Rb1 y APC presentaron un porcentaje menor del 60% (Tabla 8).

Simbolo	Nombre del Gen	GenBank ID	Probabilidad (%)	Sitios de Union para mir-26
PTEN	phosphatase and tensin homolog	NM_000314	91	<p>hsa-miR-26a/PTEN</p> <pre> 3' ucggauaggaccuaaUGAACUu 5' hsa-miR-26a 26:5' acaccuagaaaaaaACUUGAa 3' PTEN </pre> <p>hsa-miR-26a/PTEN</p> <pre> 3' ucgGAUAGGACCU---AAUGAACUu 5' hsa-miR-26a : 1244:5' uaaCUGUUAGGGAAUUUUACUUGAa 3' PTEN </pre> <p>hsa-miR-26a/PTEN</p> <pre> 3' ucGGAUAGGACCU-AAUGAACUu 5' hsa-miR-26a : 2605:5' uaCAUGU-CUGAAGUUACUUGAa 3' PTEN </pre>
GSK-3 β	glycogen synthase kinase 3 beta	NM_001146156	94	<p>hsa-miR-26a/GSK3B</p> <pre> 3' ucggaUAGGACCUAAUGAACUu 5' hsa-miR-26a : 4623:5' auaacAUUAU-UACUACUUGAa 3' GSK3B </pre>
APC	adenomatosis polyposis coli	NM_001127511.2	52	<p>hsa-miR-26a/APC</p> <pre> 3' ucggaUAGGACCUAAUGAACUu 5' hsa-miR-26a : 1237:5' auagaAUUCUG---UACUUGAa 3' APC </pre>
Rb1	retinoblastoma 1	NM_000321	60	<p>hsa-miR-26a/RB1</p> <pre> 3' ucggaUAGG-ACCUAAUGAACUu 5' hsa-miR-26a 800:5' aaagUACCCAUCUAGUACUUGAa 3' RB1 </pre>

Tabla 8. Porcentaje de unión de mir-26a a sus respectivos genes blanco. (miRanda 2014)

Para monitorear el seguimiento de la enfermedad, los animales fueron pesados en diversas ocasiones durante el transcurso del modelo *in vivo* de CCR. La gráfica muestra, en líneas, la ganancia o pérdida de masa corporal con respecto al peso inicial (expresado como el 100%). La línea roja representa al grupo control, el cual recibió únicamente agua y alimento *ad libitum*, y se observa únicamente ganancia de peso. Por otra parte, la línea punteada representa al grupo experimental, el cual recibió una dosis de AOM y tres dosis de DSS. Se logra observar disminución significativa del peso durante las tres administraciones de DSS (Figura 12a). En barras se encuentra graficado el número de tumores promedio de cada ratón; mostrando en la 3era dosis de DSS un promedio de 15 a 20 tumores por ratón (Figura 12b); esto se evaluó diseccionando el colon longitudinalmente y mediante la observación del tejido en el microscopio estereoscópico.

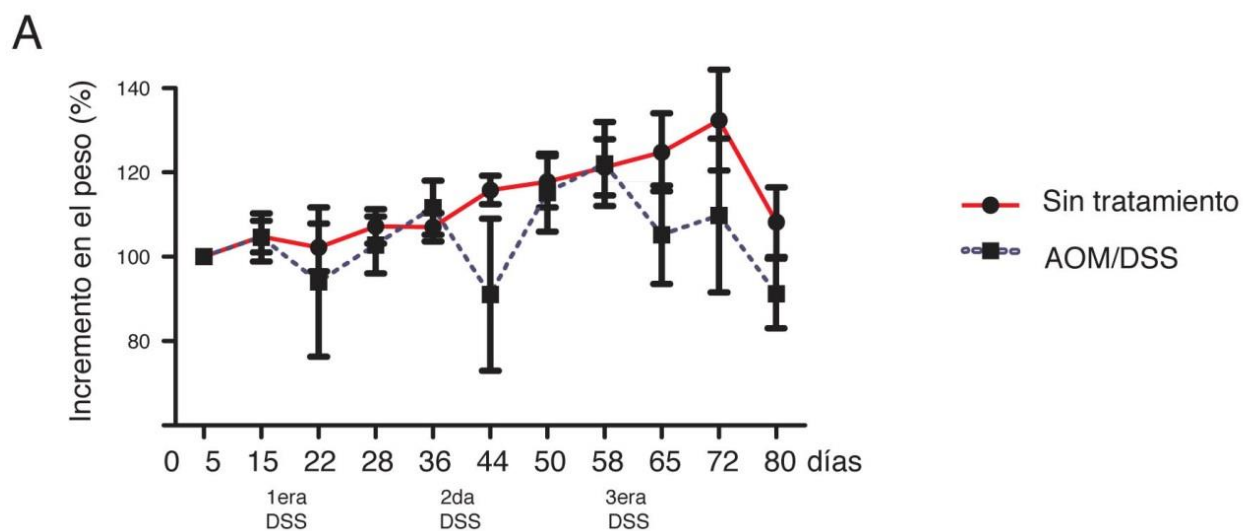


Figura 12a. Representación de la ganancia y/o pérdida de peso durante el desarrollo de CCR en el modelo *in vivo*

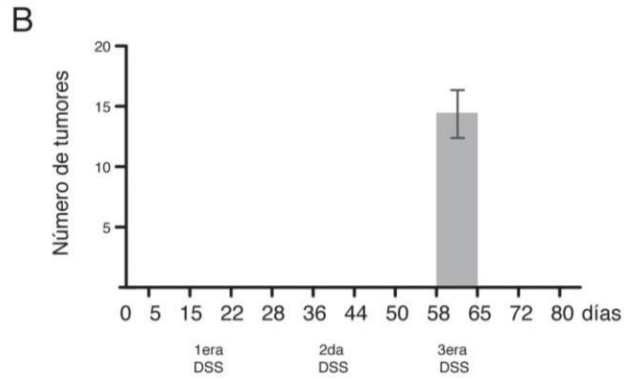


Figura 12b. Número de tumores promedio que desarrolló cada ratón durante el modelo de carcinogénesis (n=12).

En el tejido se observó que después de la 1era dosis de DSS aún no se desarrollan tumores y que sigue teniendo el mismo aspecto morfológico que el grupo control. Posterior a la 2da dosis de DSS se observa que el tejido se torna rojizo debido al proceso inflamatorio, además comienzan a formarse los primeros tumores. Pero es hasta la 3era dosis de DSS donde se desarrollan los tumores (Figura 13).

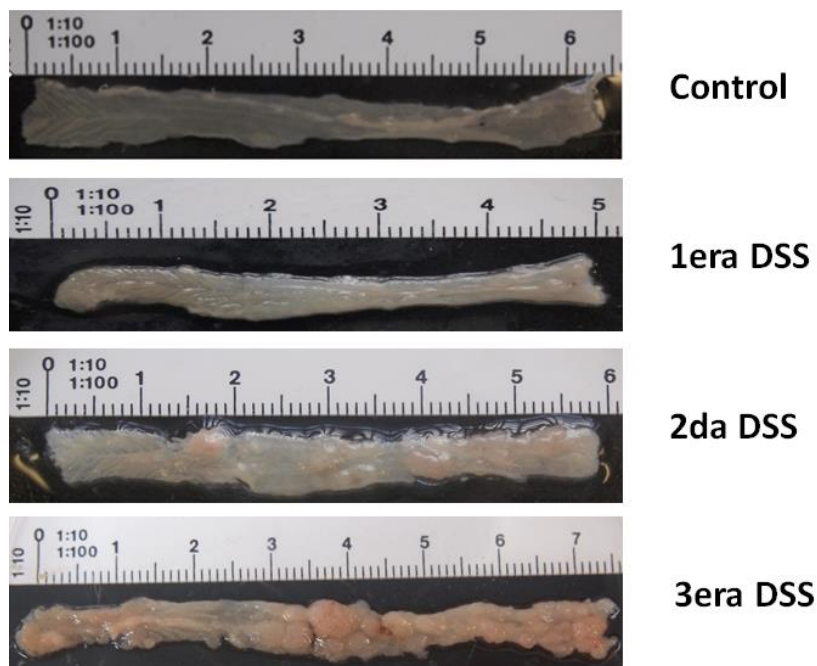


Figura 13. Cortes longitudinales obtenidos del modelo de CCR de los diferentes grupos experimentales. Se aprecia notablemente la formación de tumores en la 3era DSS.

Para determinar si estos crecimientos celulares eran de origen tumoral se realizaron cortes histológicos de la región media del colon (debido a que en esta zona se observó la mayor cantidad de tumores), se tiñeron con Hematoxilina y Eosina (H&E) y se evaluaron basándonos en el criterio descrito por Riddell et al (1983). En la figura 14, en la imagen **a**, podemos observar la mucosa normal del colon (Grado 0); en la imagen **b**, el tejido corresponde a la 1era dosis de DSS y se observa un acortamiento de las criptas del colon con leve inflamación debido a la infiltración de células inmunes (Grado 1), por otra parte en la imagen **c** que corresponde a la 2da dosis de DSS es evidente la pérdida de la estructura basal de las criptas con leves indicios de inflamación en la mucosa (Grado 2). En la imagen **d** se puede apreciar la pérdida completa en la morfología de las criptas. La superficie del epitelio muestra una severa inflamación en la mucosa y submucosa, también se observan lesiones displásicas graves y ulceraciones en la mucosa (Grado 3).

Los tumores fueron diagnosticados como adenoma tubular por patólogos del Instituto Nacional de Cancerología.

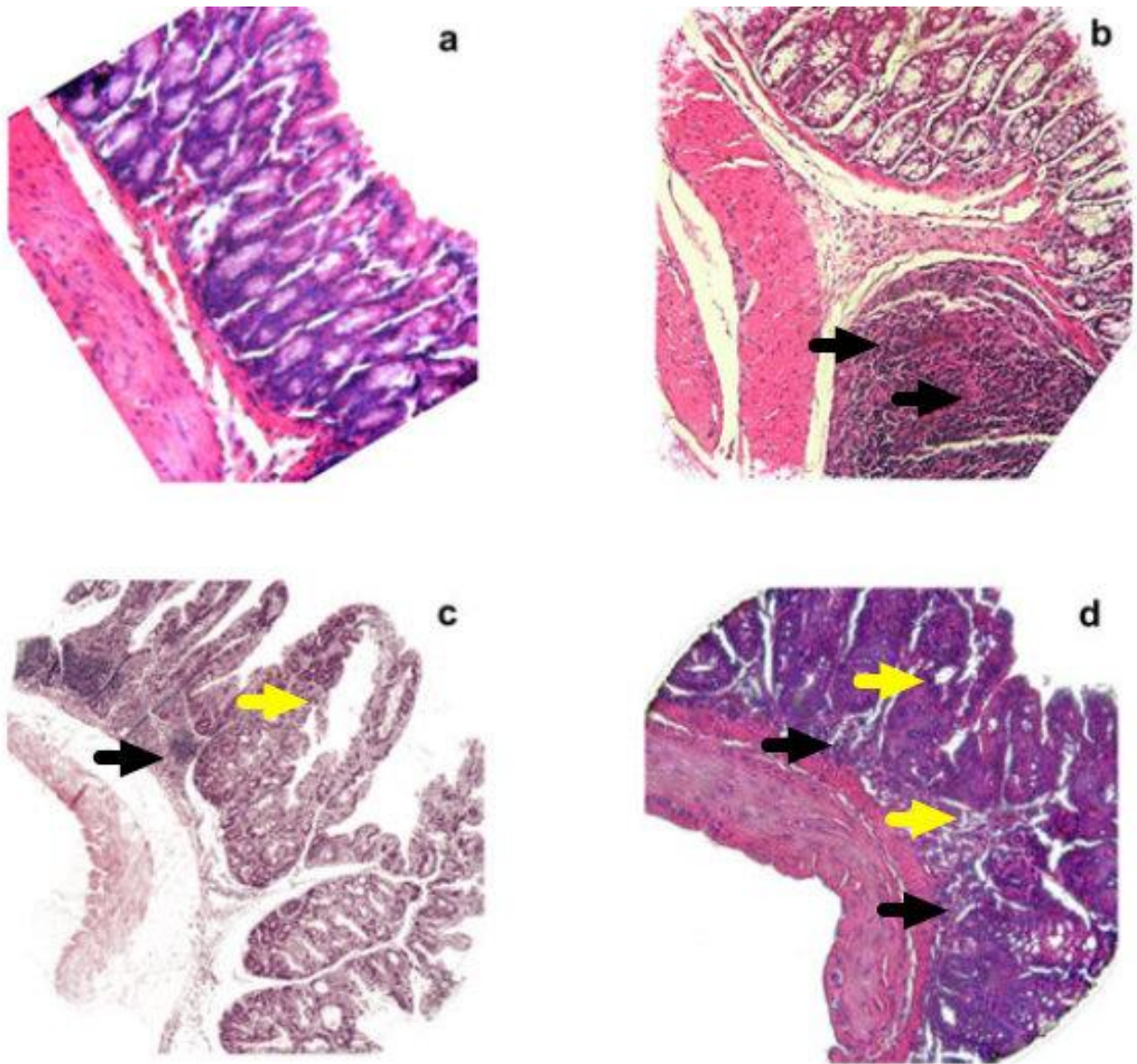


Figura 14. Secciones histológicas de la región media del colon teñidas con H&E. (Aumento 4X) a) Grupo Control b) 1era DSS c) 2da DSS y d) 3era DSS. Las flechas negras indican infiltración de células inmunes y regiones con inflamación. Las flechas amarillas indican pérdida de la morfología de las criptas, siendo en la 3era dosis de DSS donde se observa mayor índice de displasia.

Una vez establecido el modelo de CCR, se midió el perfil de inflamación compuesto por diversas citocinas, la expresión de mir-26a y sus genes blancos. Para ello, se realizó la extracción de RNA de las distintas muestras y se verificó su integridad mediante una electroforesis en gel de agarosa (Figura 15).

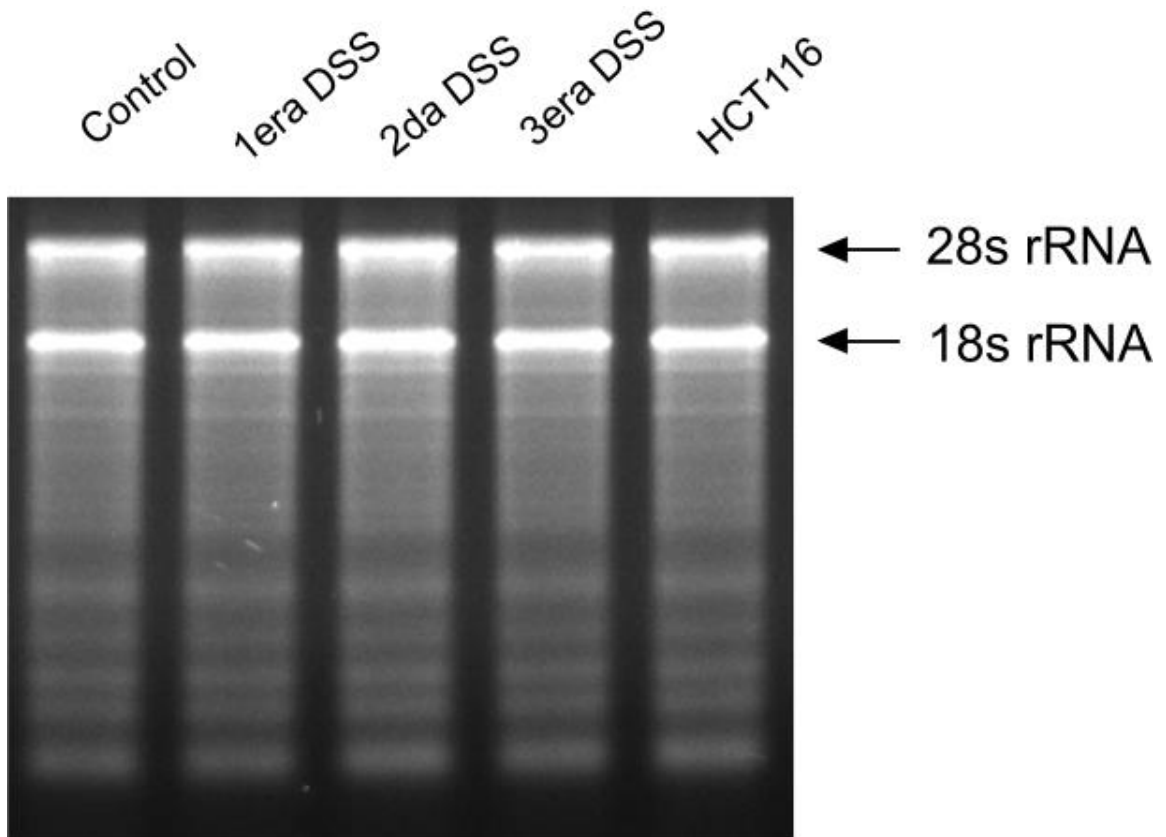


Figura 15. Imagen representativa de la integridad del RNA de las muestras del modelo de CCR AOM/DSS. Bandas ribosomales 28s y 18s que muestran una buena integridad del RNA.

Mediante RT-PCR se sintetizó DNA complementario de las muestra del modelo de CCR y de la línea celular HCT116. Esto se hace con el fin de generar cDNA usando como molde RNA maduro, es decir, libre de intrones, ya que los oligonucleótidos fueron diseñados para amplificar RNA mensajero (mRNA). Posteriormente, por PCRpf se estandarizaron las condiciones de amplificación de PTEN, APC, GSK-3 β , Rb1, IFN- γ , TNF- α , IL - 4, IL - 10 β -catenina y GAPDH. Para asegurarse que se obtuvo la amplificación de un producto único, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 2% (Figura 16a y b).

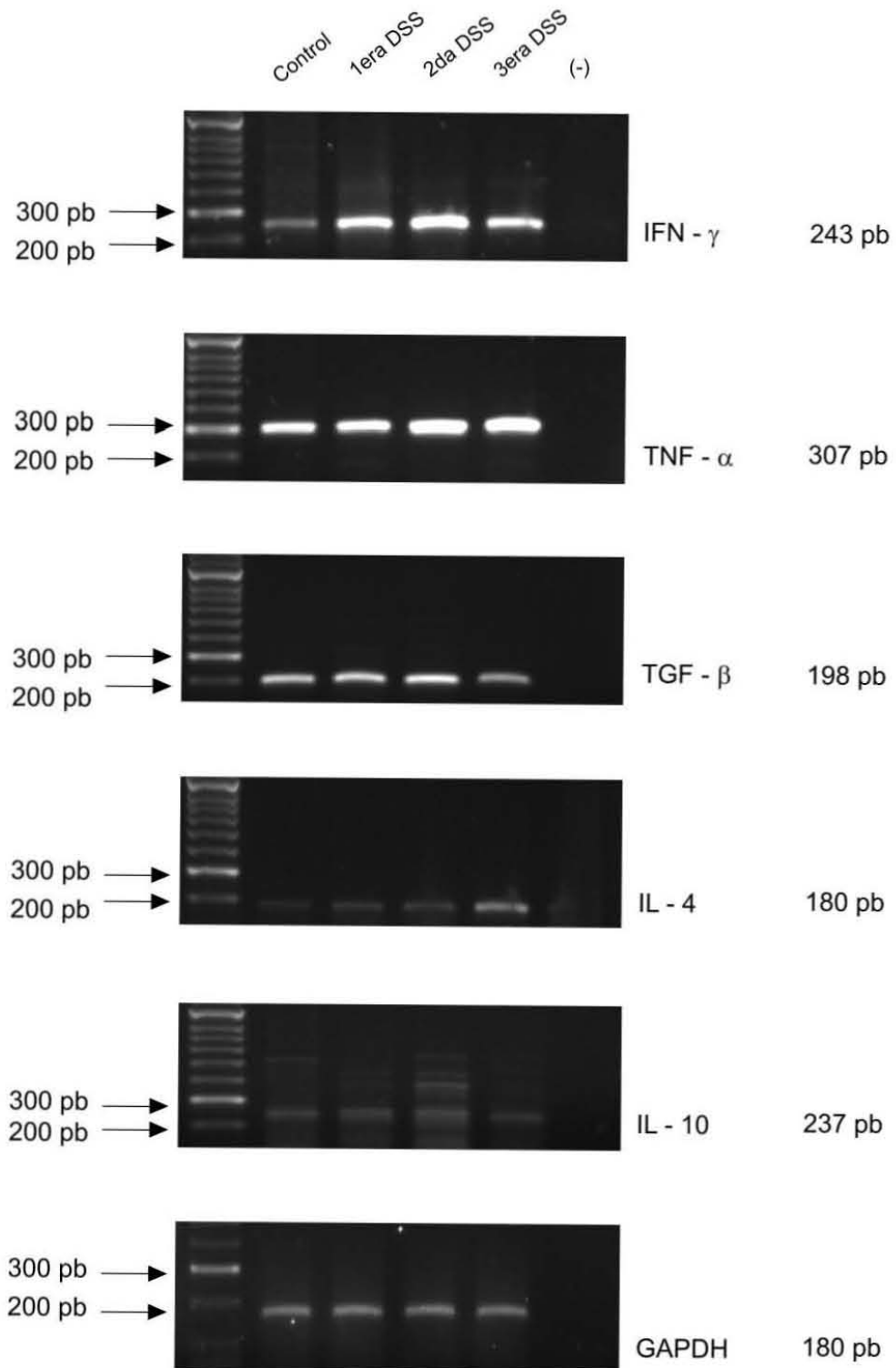


Figura 16a. Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR pf de los genes involucrados en la respuesta inflamatoria

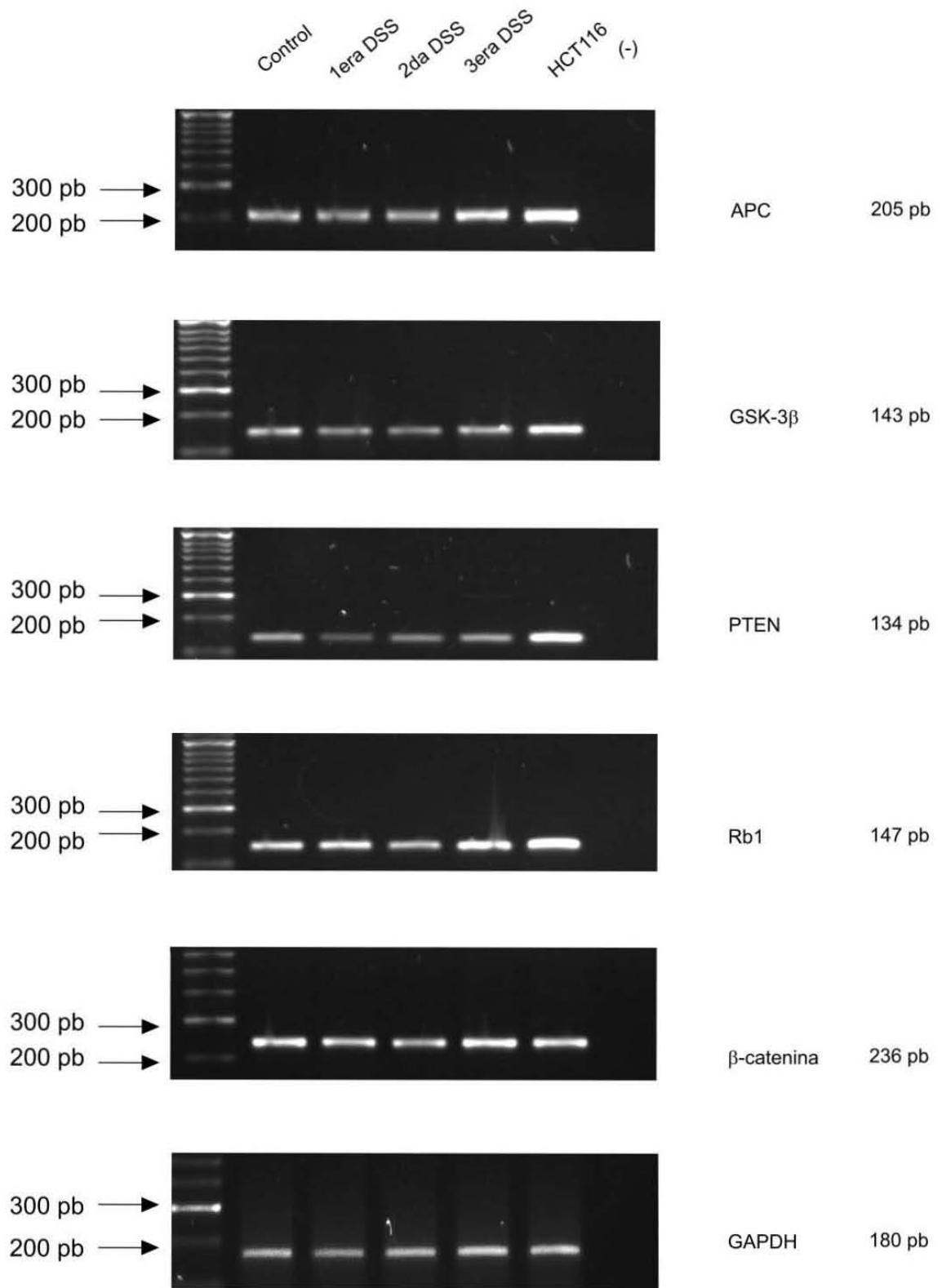


Figura 16b. Estandarización de las condiciones de amplificación por PCR pf de los posibles genes regulados por mir-26a.

Una vez estandarizadas las condiciones de amplificación, se midió la expresión relativa de las citocinas más representativas del proceso inflamatorio utilizando GAPDH como gen constitutivo para normalizar la expresión. Se observó que de las citocinas pro-inflamatorias (IFN- γ y TNF- α) la que muestra un aumento significativo en la 3era dosis de DSS con respecto al grupo control es TNF- α , lo que sugiere que la respuesta pro-inflamatoria está siendo mediada por la sobreexpresión de esta citocina. De manera contraria se observó una disminución gradual de IL-4 que desempeña un papel anti-inflamatorio al igual que la IL-10 que de la misma forma disminuye su expresión (Figura 17).

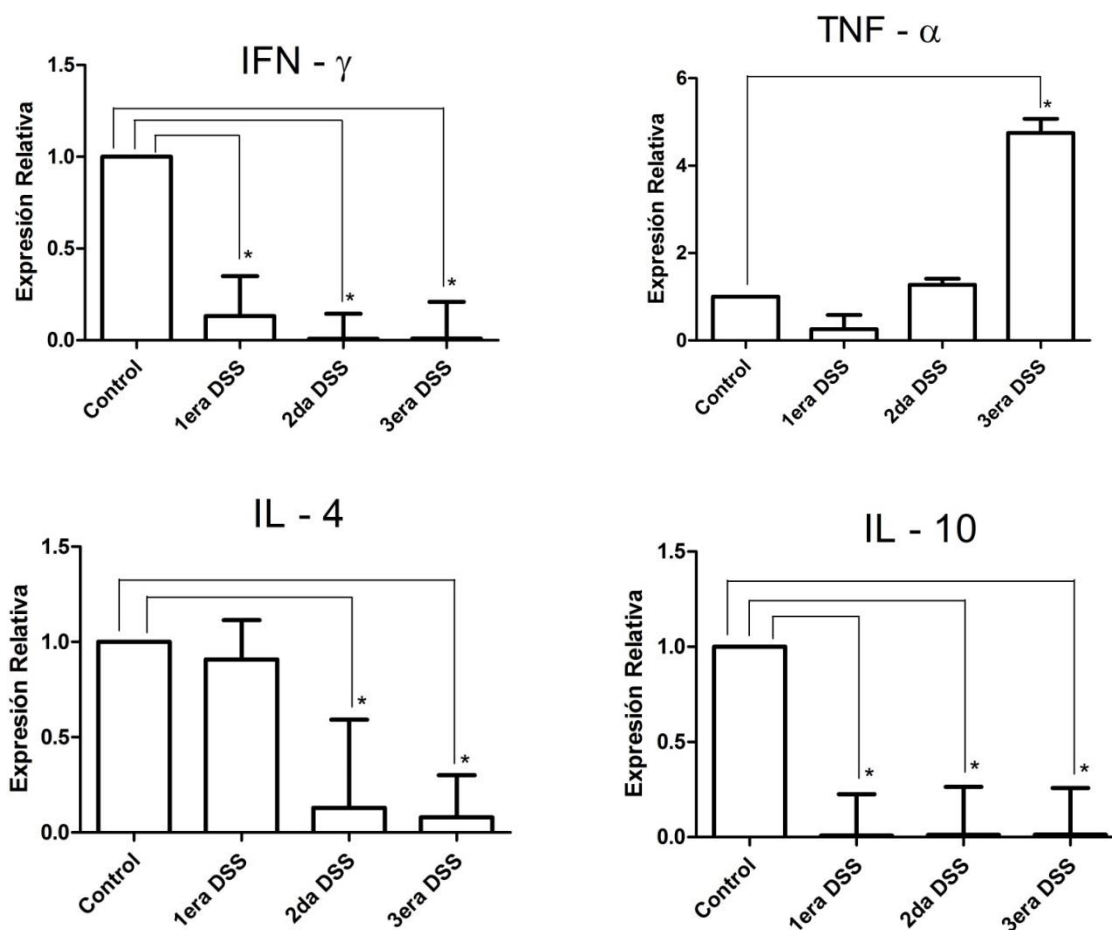


Figura 17. Nivel de expresión relativo de citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias medidas por qRT-PCR durante la progresión del CCR en el modelo *in vivo* (n=12) *p < .001.

Una vez obtenido el perfil inflamatorio de nuestro modelo de CCR, se midió la expresión relativa de mir-26a normalizada con la expresión del gen RNU6. Se observa que durante las primeras dos dosis de DSS aumenta de una a dos veces la expresión de este microRNA pero no es significativo, sin embargo, es hasta la 3era dosis de DSS cuando se sobreexpresa 8 veces más comparado con el grupo control. Además, también se midió la expresión de mir-26a en la línea celular HCT116, e igualmente se observa un aumento de hasta 3 veces (Figura 18). Esta línea celular no está asociada a procesos inflamatorios, porque lo se puede suponer que, en el modelo *in vivo*, TNF- α participa en la sobreexpresión de mir-26a.

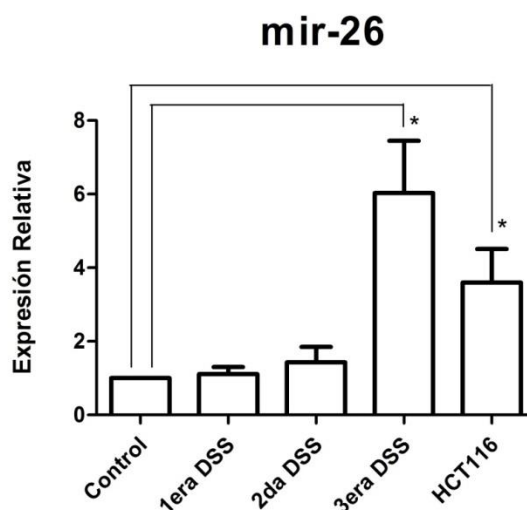


Figura 18. Sobreexpresión de mir-26a durante la progresión del CCR en el modelo *in vivo* y en la línea celular HCT116 (n=12)

*p <.001.

Sabiendo que mir-26a se sobreexpresa durante la progresión del CCR, era necesario evaluar la expresión de sus genes blanco. Se observó disminución significativa en APC, GSK-3 β , PTEN y Rb1 tanto en el modelo *in vivo* como en la línea celular HCT116. Es notable que la expresión de estos genes en la 3era dosis de DSS es menor comparada con la línea HCT116, lo que sugiere que el aumento de TNF- α podría regular negativamente a estos

genes supresores de tumor en modelos asociados a inflamación. Se muestra que la expresión de PTEN y Rb1 no disminuye gradualmente; en la 1era dosis de DSS, PTEN se mantiene igual que el grupo control, mientras Rb1 aumenta durante la 1era dosis de DSS. La amplitud de la desviación estándar se debe a la respuesta individual de cada ratón al tratamiento inductor de cáncer, sin embargo, después la 2da dosis de DSS, PTEN y Rb1 disminuyen su expresión 0.5 unidades, y es hasta la 3era dosis de DSS cuando disminuye hasta 0.9 unidades; esto significa que una vez desarrollado el cáncer la expresión de los genes se vuelve homogénea y disminuye (Figura 19).

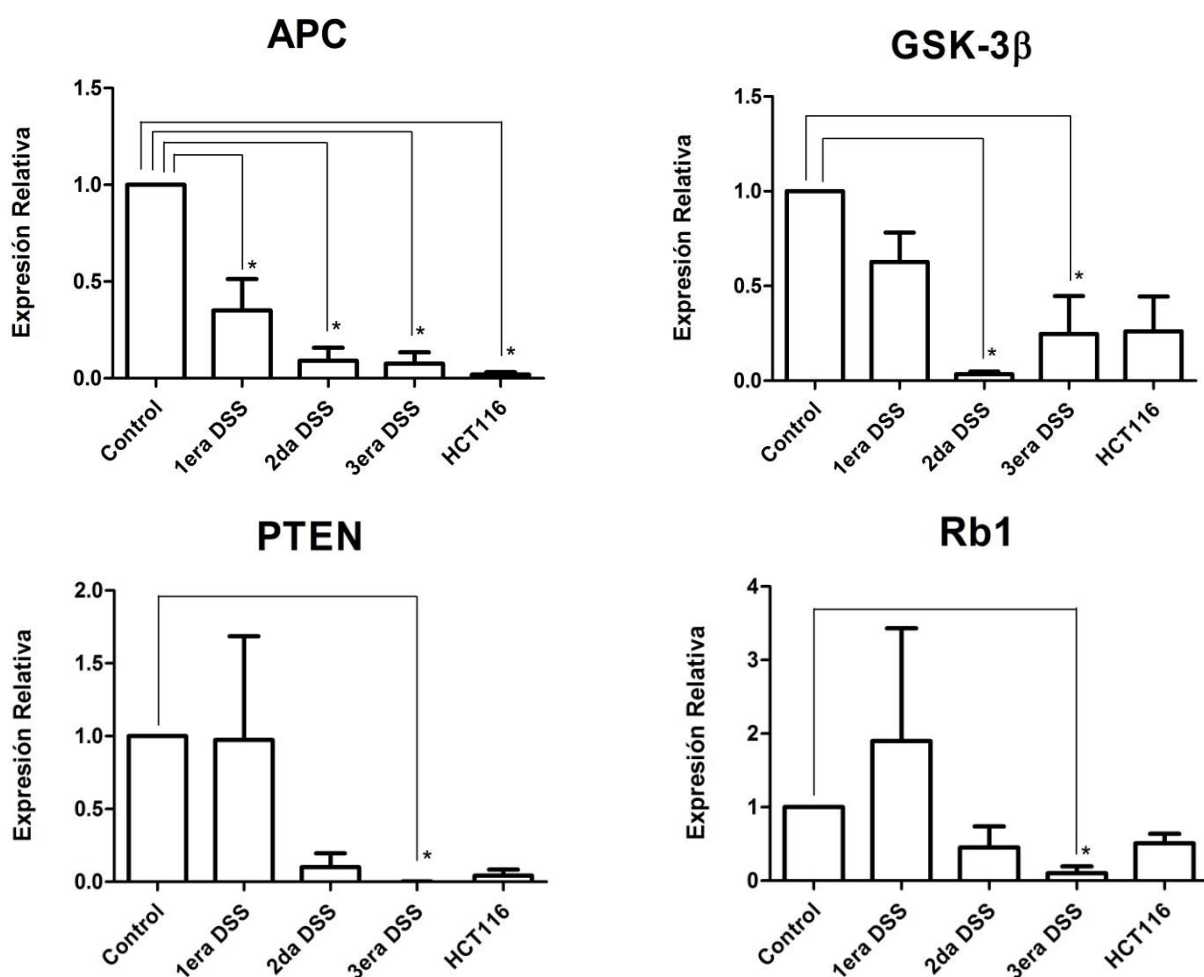


Figura 19. Disminución en la expresión de los posibles genes regulados por mir-26a en el modelo *in vivo* y en la línea HCT116 (n=12)

*p < .001.

Por otra parte β -catenina se sobrexpresas 35 veces más en el modelo *in vivo* con respecto al grupo control y en la línea celular HCT116 no muestra cambios significativos (Figura 20).

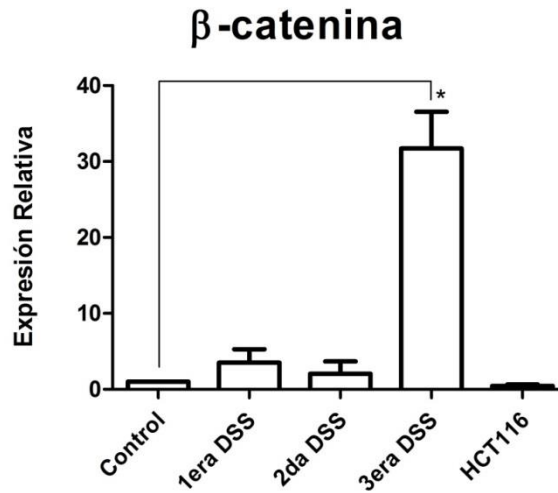


Figura 20. Aumento de β -catenina durante el desarrollo del modelo *in vivo* (n=12) *p <.001.

Para conocer si la expresión de proteínas seguía el mismo patrón de expresión que el de los mensajeros, se evaluó mediante Western Blot el nivel de expresión de GSK-3 β , APC, Rb1 y PTEN. También, se evaluaron dos proteínas que sirven como indicadores de la progresión del cáncer, β -catenina y AKT.

La expresión de GSK-3 β fue indetectable en el grupo control, y se observa un aumento de la misma al desarrollo del modelo. En la transición de la 2da dosis de DSS a la 3era dosis de DSS, GSK-3 β disminuyó. Por otra parte, la expresión de APC muestra disminución desde el grupo control hasta la 2da dosis DSS, pero es hasta la 3era dosis de DSS cuando disminuye notablemente. Con respecto a la expresión de PTEN se puede observar que no disminuyó durante la progresión de la neoplasia. De manera similar a la expresión de GSK-3 β , Rb1 muestra disminución en la transición la 2da dosis de DSS a la 3era dosis de DSS.

Atribuimos estas disminuciones a la sobreexpresión de mir-26a. Con base en el análisis densitométrico del Western Blot, la expresión de β -catenina aumenta hasta 5 veces su concentración en la 3era DSS con respecto al grupo control, de la misma forma, podemos apreciar que la proteína AKT aumenta hasta 9 veces más comparada con el grupo control (Figura 21a y b).

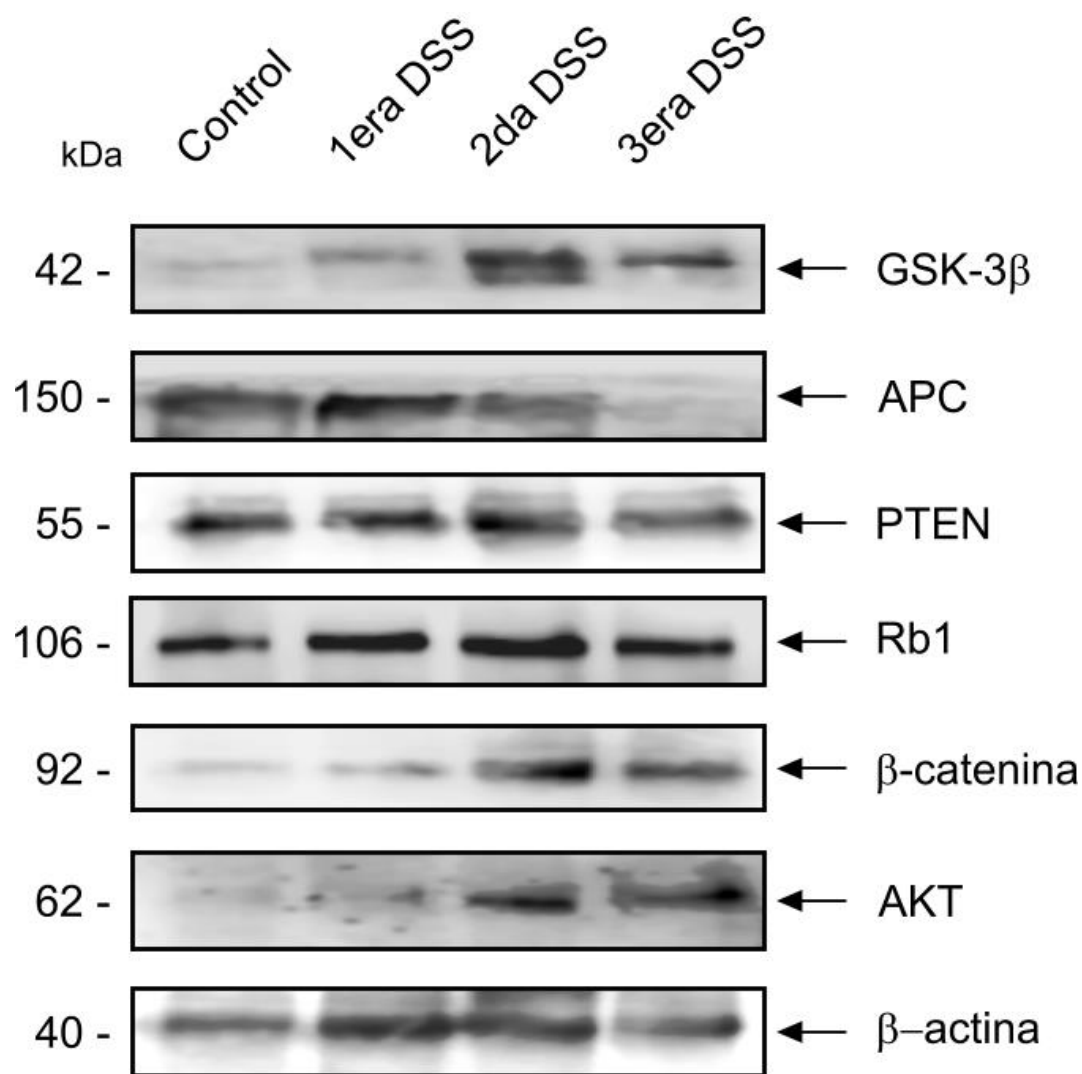


Figura 21a) Expresión de las de las proteínas reguladas por mir-26a mediante Western Blot,. Se observa disminución en la expresión de GSK-3 β , APC y Rb1 en la 3era dosis de DSS. Aumento significativo de β -catenina y AKT.

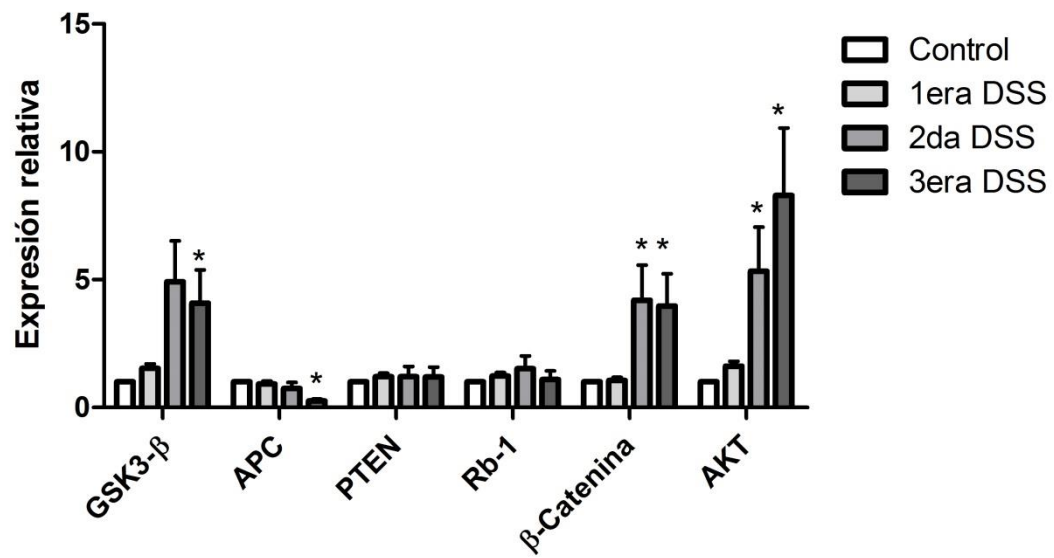


Figura 21b) Análisis densitométrico de Western Blot

De esta forma podemos establecer que la disminución de la expresión de GSK-3β, APC y Rb1 podría estar condicionada por la sobreexpresión de mir-26a y TNF-α.

8.- Discusión

Los resultados mostraron que mir-26a se sobreexpresa en la línea celular HCT116 hasta 3 veces más comparado con el grupo control, mientras que en el modelo *in vivo* se observó sobreexpresión de hasta 8 veces más. Por su parte, los genes GSK-3 β , PTEN y Rb1 disminuyen su expresión a nivel de mensajero, siendo en el modelo *in vivo* donde se observó mayor decremento; sin embargo, el transcrito de APC muestra mayor disminución en HCT116 debido a que presenta mutaciones de línea germinales en APC.

A nivel proteico se observó que GSK-3 β , APC y Rb1 presentan disminución en su expresión en la 3era dosis de DSS. Sin embargo la expresión de PTEN se mantiene constante durante la progresión del modelo.

Como se mostró en los resultados; la 3era dosis de DSS provoca un aumento en la expresión del mRNA de TNF- α de hasta siete veces. Esta sobreexpresión se debe a la infiltración masiva de células del sistema inmune, ya que son las principales productoras y liberadoras de TNF- α (Charles et al., 2009); de manera consistente, nuestras histologías muestran que la mayor infiltración de estas células también ocurre en la 3era dosis de DSS. Por otra parte, se ha reportado que el IFN- γ también tiene función pro-inflamatoria, sin embargo, los resultados muestran disminución gradual en su expresión, debido a que el DSS rompe el balance en la respuesta inmune Th1/Th2 y ocasiona disminución en la expresión de IFN- γ en la mucosa del colon (Peng et al., 2013).

Con respecto a la expresión de IL-4, se observó que disminuye gradualmente de la 1era dosis de DSS a la 3era dosis. De la misma forma, IL-10 reduce su expresión

significativamente desde la 1era dosis de DSS. Estas citocinas tienen la capacidad de inhibir la liberación de citocinas pro-inflamatorias y mantienen en buen estado la mucosa del colon para regular los procesos inflamatorios (Gooch et al., 2002). Sin embargo, la sobreexpresión de TNF- α promueve la constante activación de la vía señalización MYD88 que regula negativamente el proceso de transcripción de IL-4 e IL-10 (Hoshi et al., 2012), ocasionando que la mucosa del colon sea dañada por el DSS con más facilidad, permitiendo el aumento de la inflamación (Toi et al., 1992).

Recientemente, los procesos pro-inflamatorios han sido asociados con la sobreexpresión de microRNAs. Raisch y colaboradores (2013) mencionan que en pacientes con colitis ulcerosa, el proceso inflamatorio mediado por la vía de señalización de TNF- α genera un aumento en la expresión de mir-26a, -29a, -29b, -30c, -126 y -196a. Nuestros resultados son consistentes con este planteamiento, ya que observamos que mir-26a se sobreexpresa más en el modelo *in vivo* que en la línea celular.

Mediante análisis bioinformático encontramos que PTEN, APC, GSK-3 β y Rb1 pueden ser posibles blancos de mir-26a. Huse (2009) demostró que en pacientes con Glioma la sobreexpresión de mir-26a promueve el desarrollo de la tumorigénesis por la inhibición de PTEN. Nuestros resultados muestran que aunque existe un aumento considerable de mir-26a en la 3era dosis de DSS y disminución gradual en la expresión del mRNA de PTEN, no se afecta el proceso traduccional, porque no se observan cambios significativos en la expresión proteica durante la progresión del modelo *in vivo*; este resultado sugiere que el proceso de regulación ejercido por mir-26a sobre PTEN no se está llevando a cabo. Se esperaría que la expresión constante de la proteína PTEN inhibiera la vía de señalización mediada por AKT, sin embargo, ésta aumentó de manera gradual en el modelo *in vivo*

debido al proceso inflamatorio. Una posible explicación es la activación de AKT por EGFR, el cual se sobrexprende por el incremento de la glucólisis y la producción de factores de crecimiento mediados por TNF- α (Straus, 2013).

Con respecto a la expresión de APC Y GSK-3 β a nivel de mRNA, se observa que disminuyen gradualmente conforme progresa el modelo *in vivo*, sin embargo, la única que mantiene esta relación a nivel de proteína es APC; por el contrario, GSK-3 β incrementa su concentración proteica durante las primeras dosis de DSS pero es hasta la 3era dosis cuando disminuye, momento en que mir-26a se sobrexprende. Zhang y colaboradores (2012) demostraron que mir-26a promueve el crecimiento de colangiocarcinoma por la inhibición de GSK-3 β y subsecuentemente incrementa la actividad de β -catenina. Sin embargo, se ha reportado que en procesos inflamatorios GSK-3 β fosforilada estimula la producción de TNF- α (Jope et al., 2007), mediante la activación de NF- κ B, un factor clave para la transcripción de genes involucrados en la producción de citocinas pro-inflamatorias (Whittle et al., 2006). A su vez, la señalización mediada por TNF- α induce fosforilaciones en GSK-3 β que le permiten activar a NF- κ B (Park et al., 2011). Podemos especular que la regulación ejercida por mir-26a sobre GSK-3 β se está llevando a cabo; sin embargo, puede existir acumulación de la proteína GSK-3 β en su estado fosforilado (evitando así su degradación) y promoviendo la transcripción de genes pro-inflamatorios, es por eso que se sigue detectando en la 3era dosis de DSS independientemente de la sobrexpresión de mir-26a.

En el modelo *in vivo*, la detección de β -catenina incrementa de manera gradual, tanto en el mRNA como en la proteína. Voloshanenko (2013) demostró que la disminución en la

expresión de APC es suficiente para mantener activa a β -catenina, independientemente del nivel de expresión de GSK-3 β . Esto es consistente con nuestros resultados, ya que se observa expresión de GSK-3 β en la 3era dosis de DSS, y al estar presente se estaría fosforilando a β -catenina y degradando por la vía del proteasoma; sin embargo, al no expresarse la proteína APC, no se lleva a cabo el ensamble del complejo de degradación y esto permite que se detecten niveles más altos de β -catenina. Se observó que APC disminuye drásticamente su expresión proteica en la 3era dosis de DSS y esto lo atribuimos a la regulación ejercida por mir-26a, pero, a la fecha no existe alguna publicación que haya estudiado esta relación.

Por otra parte, Rb1 muestra una notable disminución durante el desarrollo del modelo a nivel de mRNA, pero se mantiene constante a nivel de proteína, y es durante la 3era dosis de DSS cuando se aprecia una ligera disminución. Kim y colaboradores (2010) observaron que cuando mir-26a se sobreexpresa en glioblastoma también lo hacen CDK4 y CENTG1 debido a que comparten la misma localización genómica y sufren un proceso de coamplificación cromosómica. Además, demostró que mir-26a regula directamente a Rb1 y de manera coordinada, la coexpresión de CDK4 fosforila e inhibe la expresión de aquellos productos de Rb1 que no fueron regulados por mir-26a. Por otra parte, la expresión del gen CENTG1 tiene como consecuencia la producción de la proteína PIKE, que activa directamente la vía de señalización AKT. Esto sugiere que Rb1 está siendo regulado tanto por mir-26a como por CDK4, y de la misma forma, la expresión de CENTG1 y TNF- α promueven la activación directa de la proteína AKT independientemente de la expresión estable de PTEN.

De esta forma, la sobreexpresión de mir-26 podría estar favoreciendo la progresión del ciclo celular (mediante la regulación negativa de Rb1), la proliferación y la evasión de la apoptosis (mediante la regulación negativa de GSK-3 β), y de manera indirecta promueve la activación de la vía de señalización AKT y Wnt/ β -catenina. Además, el proceso pro-inflamatorio mediado por la sobreexpresión de TNF- α aumenta la expresión de mir-26a. Sin embargo, aún se requieren más estudios que validen la relación entre mir-26a y sus genes blancos.

9.- Conclusiones

1. El proceso inflamatorio mediado por TNF- α juega un papel importante en el desarrollo del CCR; activa la sobreexpresión de citocinas pro-inflamatorias e inhibe la transcripción de las citocinas IL-4 e IL-10; de manera indirecta, potencia vías de señalización implicadas en la progresión y proliferación celular.
2. mir-26a se sobreexpresa hasta 8 veces más, durante la progresión del modelo *in vivo*. Su nivel de expresión es proporcional al incremento del proceso inflamatorio mediado por TNF- α .
3. Los genes supresores de tumor PTEN, GSK-3 β , APC y Rb1 disminuyen considerablemente su expresión a nivel de mRNA durante la progresión del CCR y la sobreexpresión de mir-26a presenta un patrón consistente con la disminución de estos genes, por lo que se presume una posible regulación ejercida por mi-26a, sin embargo es necesario validarlo.
4. La disminución en la expresión de la proteína APC se relaciona con el incremento de β -catenina lo que promueve la progresión tumoral. La vía de señalización de AKT se activa debido al aumento en la expresión TNF- α .

10.- Perspectivas

Para validar los resultados obtenidos es necesario evaluar el efecto de miR-26a sobre las regiones 3'-UTR aisladas de los mensajeros de Rb1, APC y GSK-3 β mediante un sistema de expresión de luciferasa.

Sobrexpresar mir-26a a través de la transfección de mimic-mir26a y mediante Western Blot observar la expresión de las proteínas Rb1, APC y GSK-3 β . Hacer pruebas de viabilidad celular.

Inhibir mir-26a transfectando anti-mir26a y mediante Western Blot observar la expresión de las proteínas Rb1, APC y GSK-3 β . Hacer pruebas de viabilidad celular.

Clonar el ORF de Rb1, APC y GSK-3 β en un vector de expresión que contenga una región 3'-UTR propia y mediante Western Blot observar la expresión de las proteínas Rb1, APC y GSK-3 β .

Determinar cuál de los dos *loci* de miR-26a se encuentra activo en CCR, generando, a partir de la línea celular HCT-116, líneas celulares *knockout* para ambos *loci* de miR-26 (miR-26a-1^{-/-} y miR-26a-2^{-/-}) y *knockdown* para ambos genes hospederos (CTDSPL- y CTDSP2-) mediante el método de Crispr/Cas9.

11.- Bibliografía

Agarwal, A., Das, K., Lerner, N., Sathe, S., Cicek, M., Casey, G., and Sizemore, N. (2004). The AKT/I κ B kinase pathway promotes angiogenic/metastatic gene expression in colorectal cancer by activating nuclear factor- κ B and β -catenin. *Oncogene* 24, 1021–1031.

Bandres, E., Cubedo, E., Agirre, X., Malumbres, R., Zarate, R., Ramirez, N., Abajo, A., Navarro, A., Moreno, I., and Monzo, M. (2006). Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol. Cancer* 5, 29.

Barker, N., and Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5, 997–1014.

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat. Genet.* 37, 766–770.

Boman, B.M., and Fields, J.Z. (2013). An APC:WNT Counter-Current-Like Mechanism Regulates Cell Division Along the Human Colonic Crypt Axis: A Mechanism That Explains How APC Mutations Induce Proliferative Abnormalities That Drive Colon Cancer Development. *Front. Oncol.* 3, 244.

Bosserhoff, A.-K., Grussendorf-Conen, E.-I., Rübber, A., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., Buettner, R., and Merkelbach-Bruse, S. (2006). Multiple colon carcinomas in a patient with Cowden syndrome. *Int. J. Mol. Med.* 18, 643–647.

Carthew, R.W., and Sontheimer, E.J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136, 642–655.

Catela Ivkovic, T., Aralica, G., Cacev, T., Loncar, B., and Kapitanovic, S. (2013). miR-106a overexpression and pRB downregulation in sporadic colorectal cancer. *Exp. Mol. Pathol.* 94, 148–154.

Charles, K.A., Kulbe, H., Soper, R., Escorcio-Correia, M., Lawrence, T., Schultheis, A., Chakravarty, P., Thompson, R.G., Kollias, G., Smyth, J.F., et al. (2009). The tumor-promoting actions of TNF- α involve TNFR1 and IL-17 in ovarian cancer in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 119, 3011–3023.

Coller, H.A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 667–670.

Coussens, L.M., and Werb, Z. (2002). Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860–867.

Cross, A.J., Ferrucci, L.M., Risch, A., Graubard, B.I., Ward, M.H., Park, Y., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A., and Sinha, R. (2010). A large prospective study of meat consumption

and colorectal cancer risk: an investigation of potential mechanisms underlying this association. *Cancer Res.* 70, 2406–2414.

Feagins, L.A., Souza, R.F., and Spechler, S.J. (2009). Carcinogenesis in IBD: potential targets for the prevention of colorectal cancer. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 6, 297–305.

Fearon, E.R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759–767.

Di Fiore, R., D’Anneo, A., Tesoriere, G., and Vento, R. (2013). RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *J. Cell. Physiol.* 228, 1676–1687.

Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 38, 867–871.

Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C.C., Burchard, J., Linsley, P.S., and Krichevsky, A.M. (2008). MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase Regulators. *Mol. Cell. Biol.* 28, 5369–5380.

Gooch, J.L., Christy, B., and Yee, D. (2002). STAT6 Mediates Interleukin-4 Growth Inhibition in Human Breast Cancer Cells. *Neoplasia* 4, 324–331.

Gu, S., and Kay, M.A. (2010). How do miRNAs mediate translational repression? *Silence* 1, 11.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.

Hoshi, N., Schenten, D., Nish, S.A., Walther, Z., Gagliani, N., Flavell, R.A., Reizis, B., Shen, Z., Fox, J.G., Iwasaki, A., et al. (2012). MyD88 signalling in colonic mononuclear phagocytes drives colitis in IL-10-deficient mice. *Nat. Commun.* 3, 1120.

Huse, J.T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S.H., Sohn-Lee, C., le Sage, C., Agami, R., Tuschl, T., et al. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev.* 23, 1327–1337.

Hyun, Y.S., Han, D.S., Lee, A.R., Eun, C.S., Youn, J., and Kim, H.-Y. (2012). Role of IL-17A in the development of colitis-associated cancer. *Carcinogenesis* 33, 931–936.

Jope, R.S., Yuskaitis, C.J., and Beurel, E. (2007). Glycogen Synthase Kinase-3 (GSK3): Inflammation, Diseases, and Therapeutics. *Neurochem. Res.* 32, 577–595.

- Kanaan, Z., Rai, S.N., Eichenberger, M.R., Roberts, H., Keskey, B., Pan, J., and Galandiuk, S. (2012). Plasma miR-21: a potential diagnostic marker of colorectal cancer. *Ann. Surg.* *256*, 544–551.
- Kara, O., Duman, B.B., Kara, B., Erdogan, S., Parsak, C.K., and Sakman, G. (2012). Analysis of PTEN, VEGF, HER2 and P53 Status in Determining Colorectal Cancer Benefit from Bevacizumab Therapy. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* *13*, 6397–6401.
- Kim, H., Huang, W., Jiang, X., Pennicooke, B., Park, P.J., and Johnson, M.D. (2010). Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 200909896.
- Kucherlapati, M.H., Yang, K., Fan, K., Kuraguchi, M., Sonkin, D., Rosulek, A., Lipkin, M., Bronson, R.T., Aronow, B.J., and Kucherlapati, R. (2008). Loss of Rb1 in the gastrointestinal tract of Apc1638N mice promotes tumors of the cecum and proximal colon. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 15493–15498.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.
- Lynch, H., Lynch, P., Lanspa, S., Snyder, C., Lynch, J., and Boland, C. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin. Genet.* *76*, 1–18.
- Manning, A.L., and Dyson, N.J. (2011). pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence. *Trends Cell Biol.* *21*, 433–441.
- Mao, C., Zhou, J., Yang, Z., Huang, Y., Wu, X., Shen, H., Tang, J., and Chen, Q. (2012). KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations and the Loss of PTEN Expression in Chinese Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE* *7*, e36653.
- Michael, M.Z., Connor, S.M.O., Pellekaan, N.G. van H., Young, G.P., and James, R.J. (2003). Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. Note: Susan M. O' Connor and Nicholas G. van Holst Pellekaan contributed equally to this work. *Mol. Cancer Res.* *1*, 882–891.
- Näthke, I.S. (2004). The adenomatous polyposis coli protein: the Achilles heel of the gut epithelium. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *20*, 337–366.
- Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M.T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C.G., Santoro, M., Negrini, M., et al. (2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* *13*, 497–508.

- Papandreou, C.N., and Logothetis, C.J. (2004). Bortezomib as a Potential Treatment for Prostate Cancer. *Cancer Res.* *64*, 5036–5043.
- Park, S.H., Park-Min, K.-H., Chen, J., Hu, X., and Ivashkiv, L.B. (2011). Tumor necrosis factor induces GSK3 kinase-mediated cross-tolerance to endotoxin in macrophages. *Nat. Immunol.* *12*, 607–615.
- Peng, X., Li, X., Wang, W., Li, N., Ma, J., and Shen, S. (2013). [Expression of Th1/Th2 inflammatory cytokines in rat treatment model of ulcerative colitis]. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* *38*, 1020–1028.
- Shakoori, A., Ougolkov, A., Yu, Z.W., Zhang, B., Modarressi, M.H., Billadeau, D.D., Mai, M., Takahashi, Y., and Minamoto, T. (2005). Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *334*, 1365–1373.
- Soletti, R.C., Rodrigues, N.A.L.V., Biasoli, D., Luiz, R.R., de Souza, H.S.P., and Borges, H.L. (2013). Immunohistochemical Analysis of Retinoblastoma and β -Catenin as an Assistant Tool in the Differential Diagnosis between Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *PLoS ONE* *8*.
- Straus, D.S. (2013). TNF α and IL-17 cooperatively stimulate glucose metabolism and growth factor production in human colorectal cancer cells. *Mol. Cancer* *12*, 78.
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., and Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Sci.* *94*, 965–973.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., and Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology* *138*, 2101–2114.e5.
- Tili, E., Michaille, J.-J., and Croce, C.M. (2013). MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunol. Rev.* *253*, 167–184.
- Toi, M., Bicknell, R., and Harris, A.L. (1992). Inhibition of colon and breast carcinoma cell growth by interleukin-4. *Cancer Res.* *52*, 275–279.
- Valastyan, S., Reinhardt, F., Benaich, N., Calogrias, D., Szász, A.M., Wang, Z.C., Brock, J.E., Richardson, A.L., and Weinberg, R.A. (2009). A pleiotropically acting microRNA, miR-31, inhibits breast cancer metastasis. *Cell* *137*, 1032–1046.
- Vivanco, I., and Sawyers, C.L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nat. Rev. Cancer* *2*, 489–501.
- Voloshanenko, O., Erdmann, G., Dubash, T.D., Augustin, I., Metzsig, M., Moffa, G., Hundsrucker, C., Kerr, G., Sandmann, T., Anchang, B., et al. (2013). Wnt secretion is required to maintain high levels of Wnt activity in colon cancer cells. *Nat. Commun.* *4*.

Whittle, B.J.R., Varga, C., Posa, A., Molnar, A., Collin, M., and Thiemermann, C. (2006). Reduction of experimental colitis in the rat by inhibitors of glycogen synthase kinase-3 β . *Br. J. Pharmacol.* *147*, 575–582.

Xi, Y., Formentini, A., Chien, M., Weir, D.B., Russo, J.J., Ju, J., Kornmann, M., and Ju, J. (2006). Prognostic values of microRNAs in colorectal cancer. *Biomark. Insights* *1*, 113.

Yang, L., Belaguli, N., and Berger, D.H. (2009). MicroRNA and Colorectal Cancer. *World J. Surg.* *33*, 638–646.

Zhang, J., Han, C., and Wu, T. (2012). MicroRNA-26a Promotes Cholangiocarcinoma Growth by Activating β -catenin. *Gastroenterology* *143*, 246–256.e8.

Zhu, X.-C., Dong, Q.-Z., Zhang, X.-F., Deng, B., Jia, H.-L., Ye, Q.-H., Qin, L.-X., and Wu, X.-Z. (2012). microRNA-29a suppresses cell proliferation by targeting SPARC in hepatocellular carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* *30*, 1321–1326.