



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA**

**MIR-26A, REGULADOR POST-TRANSCRIPCIONAL ASOCIADO A LA
PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE LINEAS CELULARES DERIVADAS DE
CÁNCER COLORRECTAL**

**TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:
JOSSIMAR CORONEL HERNANDEZ**

**DIRECTOR DE TESIS
DR. CARLOS PEREZ PLASENCIA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
COMITÉ TUTOR
DRA. MARCELA LIZANO SOBERON
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO DEL 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 y en el Instituto Nacional de Cancerología bajo la dirección del Dr. Carlos Pérez Plasencia.

Durante el desarrollo del trabajo, Jossimar Coronel Hernández fue becario del CONACYT con el número de apoyo 402278.

Dedicatoria

A Catalina:

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

Agradecimientos

A ciencia cierta, nunca sabré si la marca que dejaron todas las circunstancias que viví, o bien todo el empeño y coraje que empleé por querer salir de ellas, fue lo que me trajo hasta aquí, a la cima de los grados académicos. Solo sé, que, sumado a mis ganas de sobresalir, de ponerle fin a esas circunstancias, mucho de lo que he logrado y de lo que soy hoy en día, se lo debo también a muchas personas; personas que jamás esperas que te sucedan, que llegan justo en los momentos indicados, no sabes si es suerte, casualidad o destino; te cambian completamente la vida

He buscado una forma de contarles a ustedes cuan importantes han sido en toda mi formación, como humano y profesionista y creo que la encontré.

Les diré que la época que más me gusta de mi vida es mi vida en la preparatoria. Era genial ir a la escuela, aprender cosas nuevas, salir con chicas, ver a tus amigos e ir por cervezas y no preocuparte por el dinero (dado que mi amada madre siempre hizo hasta lo imposible por sacarme adelante). Era todo lo que necesitaba para estar bien y olvidarme por completo de aquellas cosas que en ese tiempo me hubiesen confundido. Pero siempre hubo algo que disfrute más, algo que manipulaba brutalmente mis emociones, que me elevaba en un segundo y con la misma facilidad podía azotarme, era tan basta, tan amplia y diferente consigo misma, que lo único que quería era seguir conociéndola más, hablo de la música. Ahora, ya contextualizado, imaginemos mi vida **HOY** en día como un concierto, el concierto de una prestigiada banda de Rock. Yo estaría ahí parado en el escenario, al centro, tocando mi éxito más vendido, eso representa haber culminado con mi doctorado. Ustedes son todo el conjunto de elementos presentes en el escenario, ustedes son el concierto.

Mamá, tú serías la razón principal de todo y mi fuente de inspiración para componer nuevos éxitos día con día, la fe con la que saldría al escenario a ganarlo todo y no dejar nada para después, porque la vida raramente da segundas oportunidades. Doctor Carlos, sin duda alguna usted representa a todos los instrumentos de la banda. Usted nos da esa

identidad como grupo, es ese sonido fuerte y vibrante, o bien, ese sonido tranquilo y armonioso, ha sido capaz de conquistarlo todo, de llegar a dónde nadie creía que se podía, de emitir las mejores notas en los lugares menos pensados, amigo incondicional, en las buenas y malas.

Rebeca, Izamary, Oliver, Carlingui, Samuel, David, Ceci, Toño, Ericka, Dulce y Deivid, sin titubear ustedes son los mejores músicos. Bien podríamos haber formado una *big band*, dado que las habilidades que poseen son excepcionales y nos dan para ello, pero quisimos ser parte de una banda de rock; por otra parte, Misael, Luis, LuisMa, Osvaldo, Ely y Héctor, serían los músicos que estuvieron con nosotros y que forman parte del legado. Seguramente y lo espero de todo corazón, algún día volveremos a tocar juntos.

Sumado a los integrantes de la banda, hay más gente que nos permitió asegurar el éxito: los colaboradores, los managers, los autores de canciones y la gente involucrada en el performance. Este lugar le pertenece a Verito, Gabyfu, Eduardo, la doctora Alma y al doctor Terrazas.

Además, siempre hay gente de suma importancia que no está asociada de manera directa a la banda, pero son piezas fundamentales para la trascendencia de esta. Principalmente agradezco a Aniela mi novia por darme el soporte emocional para superar las adversidades que surgieron (en una banda, no todo siempre es miel sobre hojuelas), por haber tolerado mis excesos y malos ratos y enseñarme a sacar lo mejor de mí en situaciones adversas, he disfrutado mucho estos momentos a tu lado. Elías, Ernesto y Johnny, aunque las giras y presentaciones con la banda evitan que los vea seguido, ustedes son mis mejores amigos de la vida, valoro en demasía el tiempo que he pasado a su lado. Ustedes son un pilar importante en mi formación.

Para finalizar, basta decir que me siento sumamente feliz con el impacto que hemos generado en la sociedad, nuestro grupo ha trascendido gracias al esfuerzo que han puesto en cada canción que han escrito, en cada presentación que han dado, en cada gira a la que han asistido y en cada vínculo que han formado. ¿Cuántos más éxitos tendremos? Depende de NOSOTROS, **Genómica Funcional del Cáncer.**

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 - Cáncer Colorrectal

CDK4,5,6 - Cinasas dependiente de ciclinas

CDKN1A – Inhibidor de cinasas dependientes de ciclinas 1A

ChIP – Chromatin immunoprecipitation

CK1A - Casein Kinase 1A

c-myc - Avian Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog

COX2 - Ciclo-oxigenasa 2

CTDSPL - CTD Small Phosphatase Like

CTDSP2 - CTD Small Phosphatase 2

CyclinD1,E - CiclinaD1, E

DEPC - Diethyl pyrocarbonate

DSS - Dextran Sulfato de Sodio

DMOG – Dimethyloxaloylglycine

DMSO -Dimetilsulfóxido

DUSP4/5 – Dual specificity protein phosphatase 4/5

Dvl - Dishevelled

EII - Enfermedad inflamatoria intestinal

FFPE - Formalin-Fixed Paraffin-Embedded

FL – Full Length

GAPDH - Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Glut1 - Glucose transporter 1

GSK3 β - Glycogen synthase kinase-3 beta

HIF-1 α - Factor 1 Inducible por Hipoxia

HRE – Elemento de respuesta a hipoxia

HRP - Horseradish peroxidase

IARC - International Agency for Research on Cancer

IGFR1 - Insulin-like growth factor 1

K-Ras - Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

miRNA - MicroRNA

MMR - Mismatch repair

MTT - 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OMS - Organización Mundial de la Salud

PDVF - Polifluoruro de vinilideno

PDHX - Pyruvate Dehydrogenase Complex Component X

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

PIP2 - Fosfatidil-inositol-bifosfato

PIP3 - Fosfatidil-inositol-trifosfato

PTEN - Phosphatase and tensin homolog

qPCR - Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Rb1 - Retinoblastoma 1

RISC - Complejo inductor de silenciamiento de RNA

RTCA – Real time cell analyzer

RTK - Receptor de cinasas de tirosina

SDS-PAGE - Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

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

TCGA – The Cancer Genome Atlas

ULK1 - Unc-51 like autophagy activating kinase

UTR - Untranslated

VEGF - Factor de crecimiento endotelial vascular

VEGFR – Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular

Wnt - Wingless protein

Índice general

| | |
|---|-----------|
| Resumen | 14 |
| Abstract | 16 |
| I. Introducción..... | 18 |
| 1. Cáncer colorrectal | 18 |
| 1.1 Etiología del CCR..... | 20 |
| 1.1.1 Factores Hereditarios..... | 20 |
| 1.1.2 Factores ambientales | 21 |
| 1.2 Mecanismos moleculares del CCR..... | 22 |
| 1.2.1 <i>PTEN</i> , regulador clave de la proliferación y migración..... | 23 |
| 1.2.2 <i>GSK3β</i> y <i>APC</i> , reguladores de la vía Wnt/ β -catenina | 25 |
| 1.2.3 Rb1, controlador maestro del ciclo celular..... | 26 |
| 2. MicroRNAs reguladores clave de la expresión génica | 28 |
| 2.1 El papel de los microRNAs en el desarrollo del cáncer..... | 30 |
| 2.1.1 MiRNAs en CCR | 31 |
| 3. Antecedentes..... | 34 |
| Justificación..... | 36 |
| Hipótesis | 36 |
| Objetivos | 37 |
| Objetivo General | 37 |
| Objetivos Particulares..... | 37 |
| II. Materiales y Métodos..... | 38 |
| Cultivo celular..... | 38 |
| Diseño de Oligonucleótidos..... | 38 |
| Modelo <i>in vivo</i> AOM/DSS | 40 |
| Análisis histológico | 41 |
| Extracción de RNA | 41 |
| Extracción de RNA de tejidos embebidos en parafina..... | 42 |
| Retrotranscriptasa Reversa y Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)..... | 43 |
| Extracción de Proteínas | 44 |
| Western Blot | 45 |

| | |
|---|-----------|
| Construcción de vectores p-MIR-Report y ensayo de luciferasa..... | 46 |
| Ensayo MTT | 51 |
| Ensayo de proliferación y migración en tiempo real..... | 51 |
| Ensayo TOP Flash..... | 52 |
| Ensayo de migración celular por cierre de la herida | 52 |
| Meta-análisis <i>in silico</i> de expresión | 53 |
| Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)..... | 53 |
| Análisis estadísticos | 54 |
| III. Resultados..... | 55 |
| 1. Mir-26a se encuentra sobreexpresado en líneas celulares derivadas de CCR..... | 55 |
| 2. <i>PTEN</i> , <i>Rb1</i> , <i>APC</i> y <i>GSK3β</i> son regulados directamente por mir-26a..... | 57 |
| 3. mir-26a promueve la proliferación sostenida y potencia la migración en la línea celular HCT116 | 64 |
| 4. <i>PTEN</i> , <i>GSK3β</i> y <i>Rb1</i> se encuentran disminuidos en un modelo <i>in vivo</i> de CCR..... | 68 |
| 5. Mir-26a se encuentra sobreexpresado en muestras derivadas de pacientes con CCR | 70 |
| 6. HIF-1 α regula la transcripción de mir-26a en CCR..... | 73 |
| IV. Discusión | 77 |
| V. Conclusiones | 84 |
| VI. Bibliografía | 85 |
| VII. Anexos..... | 92 |

Índice de figuras

| | |
|--|----|
| Figura 1. Hallmarks of cancer | 18 |
| Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer CCR a nivel mundial mundial..... | 20 |
| Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer CCR en México | 20 |
| Figura 4. Factores de riesgo asociados al desarrollo de CCR | 22 |
| Figura 5. Secuencia del modelo genético de carcinogénesis colorrectal propuesto por Vogelstein..... | 23 |
| Figura 6. Vía de señalización PI3K-AKT..... | 24 |
| Figura 7. Vía de señalización Wnt/ β -catenina. | 26 |
| Figura 8. La función principal de Rb1 es regular la progresión del ciclo celular | 27 |
| Figura 9. Biogénesis de microRNAs | 29 |
| Figura 10. Comparación en la expresión de miRNAs expresados en diferentes tipos de cáncer comparados con sus contrapartes normales | 31 |
| Figura 11. Lista de miRNAs asociados a la progresión de CCR..... | 32 |
| Figura 12. Análisis bioinformático de miRNAs sobreexpresados en CCR y sus posibles genes blanco. | 33 |
| Figura 13. Modelo de carcinogénesis de CCR asociado a inflamación, basado en la administración de AOM/DSS.. | 40 |
| Figura 14. Imagen representativa de la integridad del RNA de las muestras del modelo de CCR AOM/DSS. | 42 |
| Figura 15. Imagen representativa de Oligonucleotidos en cadena sencilla (ss) y doble cadena (ds) en electroforesis en gel de agarosa. | 47 |
| Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el desplazamiento electroforético del plásmido p-MIR-Report en el primer carril y desplazamiento electroforético de la digestión enzimática con SpeI y HindIII del mismo plásmido en el segundo carril. | 48 |
| Figura 17. Ligación de las moléculas de doble cadena (provenientes de los alineamientos de APC, Rb1, PTEN y GSK3B) en plásmido p-MIR-Report..... | 49 |
| Figura 18. Validación por secuenciación tipo Sanger de la ligación de la molécula de doble cadena de APC, Rb1, PTEN y GSK3 β en plásmido p-MIR-Report..... | 50 |
| Figura 19. mir-26a se encuentra sobreexpresado en líneas celulares derivadas de CCR. | 56 |
| Figura 20. Proteínas blanco de mir-26a se encuentran disminuidos en líneas celulares de CCR. | 56 |
| Figura 21. mir-26a se une a la región semilla de sus genes blancos..... | 58 |
| Figura 22. Transfección del mimic de mir-26a y su respectivo inhibidor en líneas celulares derivadas de CCR (HCT116, SW480 Y SW620) | 59 |

| | |
|--|----|
| Figura 23. Expresión relativa de PTEN, Rb1, APC y GSK3 β cuantificada por qPCR, en la línea celular HCT116 (carril 1) transfectadas con las moléculas control (carril 2 y 3) mimic de mir-26a (carril 4) y su respectivo inhibidor (carril 5), | 60 |
| Figura 24. Expresión relativa de <i>PTEN</i> , <i>Rb1</i> , <i>APC</i> y <i>GSK3β</i> cuantificada por qPCR, en la línea celular SW480 (carril 1) transfectadas con las moléculas control (carril 2 y 3) mimic de mir-26a (carril 4) y su respectivo inhibidor (carril 5) | 61 |
| Figura 25. Detección de PTEN, Rb1, APC y GSK3 β en células HCT116 y SW620 transfectadas con mir-26a y su respectivo inhibidor | 61 |
| Figura 26. APC no es regulado por mir-26a en líneas derivadas de CCR. | 63 |
| Figura 27. mir-26a promueve la proliferación sostenida y potencia la migración celular en líneas derivadas de CCR. | 65 |
| Figura 28. La proliferación y migración celular en CCR es regulado por el eje mir-26a/PTEN/AKT..... | 67 |
| Figura 29. Mir-26a se encuentra sobreexpresado en un modelo <i>in vivo</i> de CCR. | 69 |
| Figura 30. mir-26a se encuentra sobreexpresado en muestras de pacientes con CCR y en datos obtenidos del TCGA..... | 71 |
| Figura 31. PTEN, GSK3 β y Rb1 se encuentran disminuidos en muestras de pacientes tomadas de “The Human Protein Atlas”1..... | 72 |
| Figura 32. HIF-1 α regula directamente la expresión de mir-26a en CCR..... | 74 |
| Figura 33. HIF-1 α regula directamente la expresión de mir-26a en CCR..... | 74 |
| Figura 34. HIF-1 α se encuentra ocupando la región promotora de mir-26a-1 en CCR. | 75 |
| Figura 35. Mir-26a, regulador post-transcripcional asociado al desarrollo de cáncer colorrectal. | 76 |
| Figura 36. Análisis densitométrico de las proteínas GSK3 β , APC, PTEN y Rb1 correspondientes a la figura 20 del apartado de resultados..... | 92 |
| Figura 37. Análisis densitométrico de las proteínas GSK3 β , APC, PTEN y Rb1 correspondientes a la figura 28, HCT116 del apartado de resultados | 93 |
| Figura 38. Análisis densitométrico de las proteínas GSK3 β , APC, PTEN y Rb1 correspondientes a la figura 28, SW480 del apartado de resultados | 93 |
| Producción científica | 95 |

Índice de tablas

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Listado de oligonucleótidos obtenidos mediante el software CLC Sequence Viewer 6.0 | 39 |
| Tabla 2. Condiciones de amplificación de mir-26a | 44 |
| Tabla 3. 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. | 44 |
| Tabla 4. Listado de anticuerpos utilizados para Westen Blot | 46 |
| Tabla 5. Diagnóstico clínico patológico de pacientes con CCR utilizados en este estudio. | 92 |

Resumen

Mir-26a, Regulador epigenético asociado a cáncer colorrectal

El cáncer colorrectal (CCR) es la cuarta causa más común de muerte relacionada con cáncer a nivel mundial. Diversos estudios han mostrado disminución en la expresión de los genes supresores de tumor *p53*, *GSK3 β* , *APC*, *CDKN1A*, *PTEN* y *Rb1* en tejidos derivados de CCR. Por otra parte, nueva evidencia sugiere que los microRNAs tienen un papel oncológico y promueven la progresión tumoral al regular el crecimiento celular, proliferación, angiogénesis y metástasis. Mediante un análisis bioinformático, identificamos a mir-26a como un posible regulador potencial de *GSK3 β* , *APC*, *PTEN* y *Rb1*. Con la finalidad de evaluar la relación entre mir-26a y sus genes blancos, se midió la expresión de los genes en líneas celulares derivadas de CCR, encontramos que mir-26a estaba sobrexpresado, mientras que *GSK3 β* , *APC*, *PTEN* y *Rb1* mostraron una correlación inversa tanto en RNA como en proteína. Para determinar si mir-26a regulaba a estos genes, se diseñó un ensayo reportero de luciferasa, la región 3' UTR de los genes blanco fue clonada en el plásmido pMIR-Report y co-transfectada con mir-26a. La actividad de luciferasa disminuyó en todas las construcciones, demostrando que mir-26a regula directamente a *GSK3 β* , *APC*, *PTEN* y *Rb1*. También encontramos que la sobreexpresión de mir-26a incrementa la proliferación y la migración. Por otra parte, desarrollamos un modelo *in vivo* de CCR asociado a inflamación crónica basado en el método de Azoxymetano/Dextran Sulfato de Sodio (AOM/DSS). Encontramos sobreexpresión de mir-26a con la correspondiente disminución de *GSK3 β* , *APC*, *PTEN* y *Rb1*. Los resultados fueron similares en tejidos embebidos en parafina de pacientes

con CCR. Se demostró que la expresión de mir-26a está regulada por la actividad del factor de transcripción HIF-1 α

Abstract

mir- 26a, epigenetic regulator associated with colorectal cancer

Colorectal cancer (CRC) is the fourth most common cause of death cancer-related worldwide. Many studies have shown decreased in the expression of tumor suppressor genes such as p53, *GSK3B*, *APC*, *CDKN1A*, *PTEN* and *Rb1*. Moreover, new evidence suggests that microRNAs have an oncogenic role and they could promote cancer through regulate tumor growth, proliferation, angiogenesis and metastasis. Through bioinformatic analysis, we identified mir-26a as a potential regulator of *GSK3B*, *APC*, *CDKN1A*, *PTEN* and *Rb1*. To analyze the relation between mir-26a and its potential target genes, we measured them in several CRC cell lines and a non-tumoral cell line CRL1790, and we just found mir-26a overexpression in CRC cell lines and an inverse correlation with *GSK3 β* , *APC*, *PTEN* and *Rb1* mRNA and protein expression. To determine whether mir-26a regulated to these genes, we designed luciferase reporter assays cloning the specific mir-26a interaction region from each 3'UTR into the pMIR-Report plasmid. Luciferase expression was decreased in all constructs, more significantly in *PTEN* and *GSK3 β* . Finally, we found that overexpression of mir-26a increased proliferation and migration in CCR cells. We developed an inflammation-associated mouse CRC model by the method of Azoxymethane / Dextran Sodium Sulfate; neoplasia development was validated through histological sections. We found overexpression of mir-26a corresponding with decreased *GSK3 β* , *PTEN* and *Rb1*. Besides, we observed the same results in Mexican CRC paraffin embedded tissues. On the other hand, HIF-1 α stability seems increase mir-26a expression and *PTEN* downregulation,

this fact suggests HIF-1 α is a specific transcription factor of mir-26a and it could be an “hypoxi-mir”. In conclusion, mir-26a promotes CCR development by inhibition of *GSK3 β* , *PTEN* and *Rbl*. These signaling molecules constitute tantalizing targets for prevention or treatment of CCR.

I. Introducción

1. Cáncer colorrectal

Se define como cáncer a una serie de múltiples cambios moleculares tanto a nivel genético como epigenético que inducen la transformación de células normales en células altamente proliferativas, sin función específica, capaces de obtener sus propios nutrientes y con propiedades invasivas (Hanahan & Weinberg, 2011; Weinberg, 2000) (Figura 1).



Figura 1. Hallmarks of cancer (Hanahan & Weinberg, 2000)

Con base en la clasificación de la IARC (International Agency for Research on Cancer, 2018), el cáncer colorrectal (CCR) es la cuarta causa más común de muerte relacionada con

cáncer en ambos sexos, en todo el mundo. En el 2018 se presentaron 1,849,518 casos de los cuales 880,792 fueron decesos. Es el tercero más común en hombres y el segundo en mujeres a nivel mundial (Ferlay, 2018) (Figura 2).

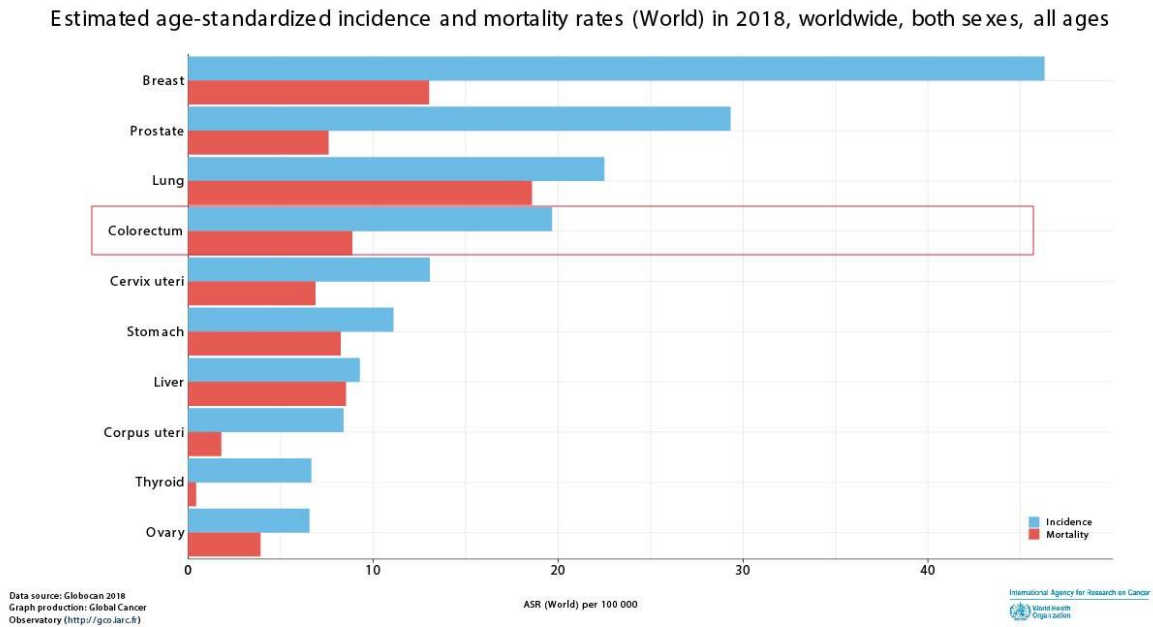


Figura 2. Incidencia y mortalidad de cáncer CCR a nivel mundial mundial (GLOBOCAN 2018).

En México, el CCR es la cuarta causa de muerte por cáncer y el tercero más frecuente dentro de la patología oncológica en la población, afectando en igual proporción a hombres y mujeres. Tan solo en el año 2018, se presentaron 14,900 casos, de los cuales 7,084 fueron decesos; y 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 (Ferlay, 2018) (Figura 3).

Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, Mexico, both sexes, all ages

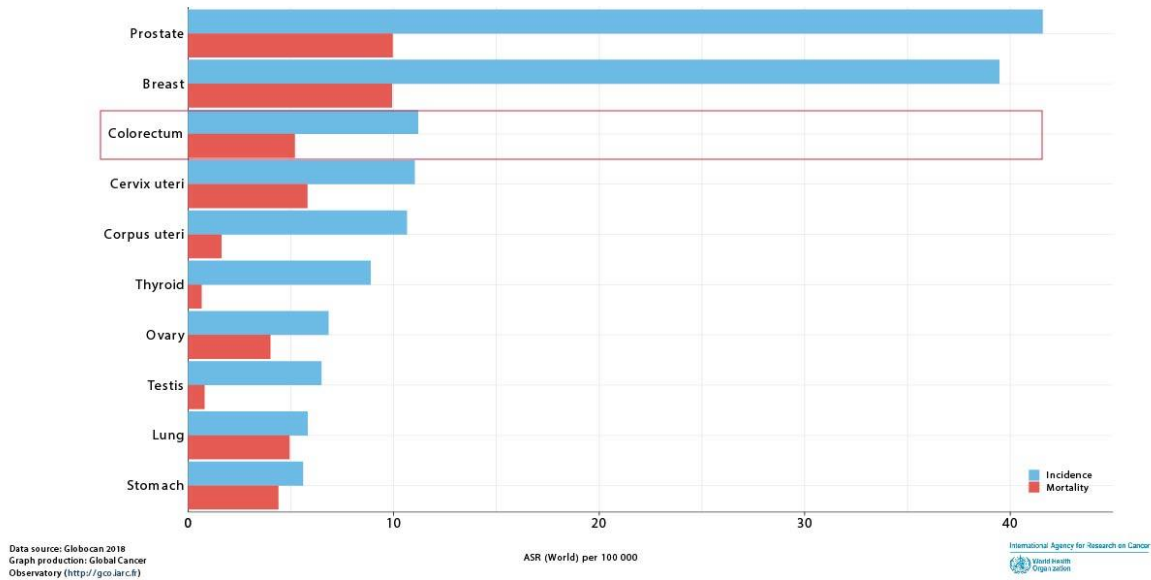


Figura 3. Incidencia y mortalidad de cáncer CCR en México (GLOBOCAN 2018).

1.1 Etiología del CCR

1.1.1 Factores Hereditarios

Se han descrito varios procesos de predisposición hereditaria que se relacionan con la presencia de polimorfismos proteicos, tales como: la poliposis adenomatosa familiar, que representa tan solo el 1% del CCR y se asocia a una mutación germinal en el gen *APC* (Adenomatous polyposis coli) que se hereda de forma autosómica dominante; se caracteriza por la presencia de cientos de pólipos. Este tipo de síndrome presenta manifestaciones extracolónicas benignas tales como osteomas y adenoma de suprarrenales (Boman & Fields, 2013). Por otra parte, el síndrome de Lynch es una condición hereditaria en la que se presentan mutaciones germinales en los genes *MSH2* y *MLH1* que forman parte del complejo mismatch repair (MMR) y están involucradas en la identificación y reparación de errores en

el DNA. Los pacientes con Síndrome de Lynch presentan cambios moleculares conocidos como inestabilidad microsatélite, es decir, 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 y al desarrollo de cáncer colorrectal (Lynch et al., 2009). Existe otro grupo de síndromes asociados al desarrollo de CCR, 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) (Bosserhoff et al., 2006).

1.1.2 Factores ambientales

Dentro de los factores ambientales 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 proinflamatorias induce inestabilidad y mutaciones en genes supresores de tumores, y consecuentemente promueve la formación del carcinoma (Figura 4).



Figura 4. Factores de riesgo asociados al desarrollo de CCR. Figura modificada de Qatar Cancer Society, (2019-2020), Risk factors of colorectal cancer. Qatar. Tomado de <https://www.qcs.qa/en/colorectal-cancer/>

1.2 Mecanismos moleculares del CCR

Para explicar el desarrollo progresivo del CCR, Vogelstein propuso el modelo “*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 (Finlay, 1993). 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* (Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog, por sus siglas en ingles), que envía continuamente señales mitóticas y de supervivencia (Fearon & Vogelstein, 1990). 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 (Figura 5).

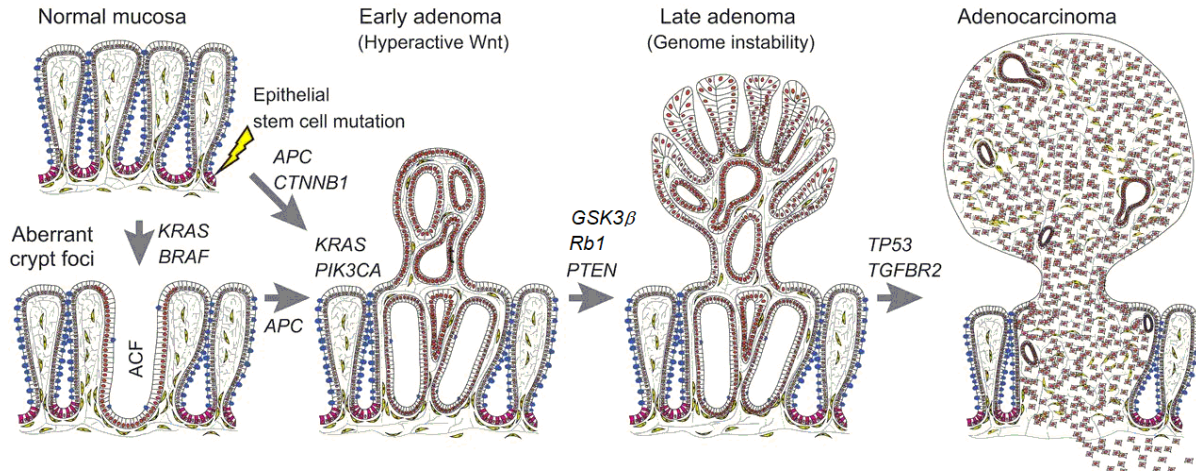


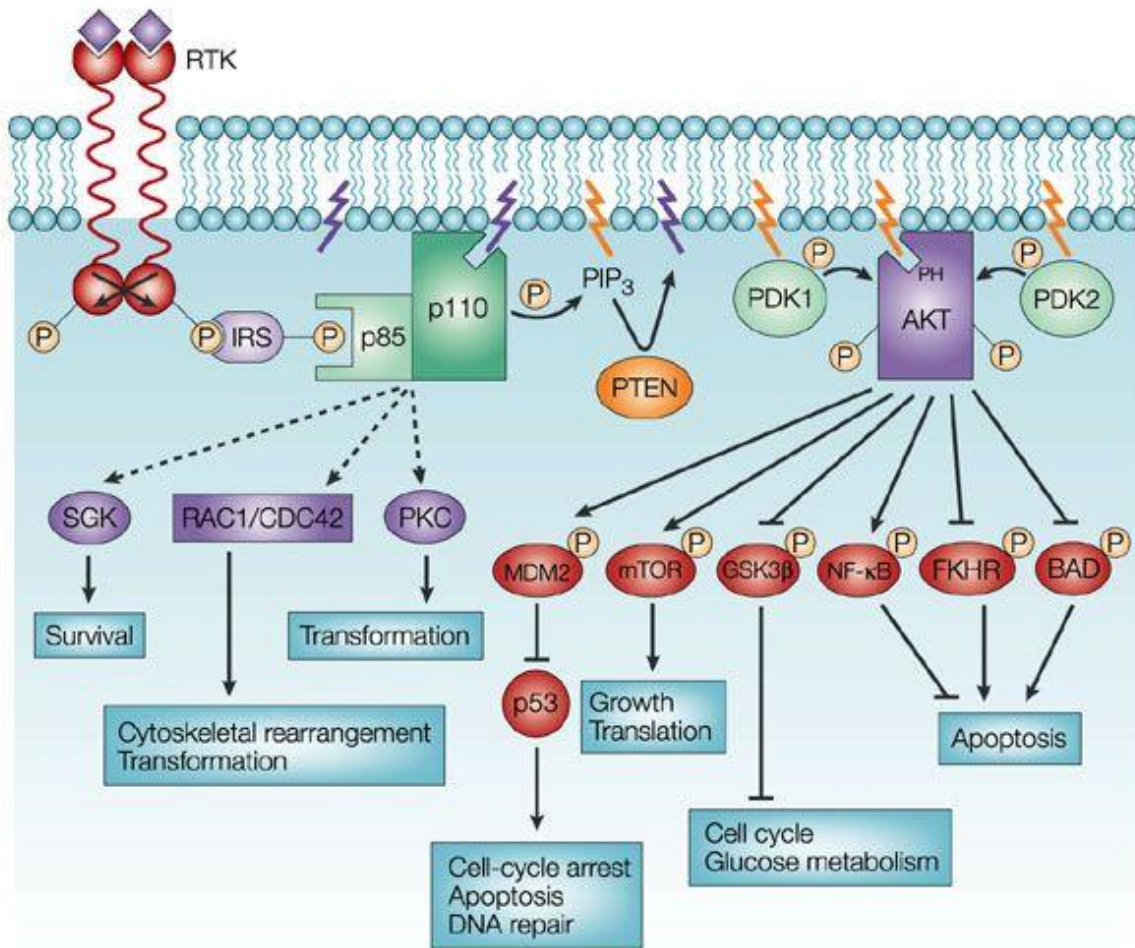
Figura 5. Secuencia del modelo genético de carcinogénesis colorrectal propuesto por Vogelstein. Explica la progresión del CCR desde la mucosa normal del colon hasta el carcinoma. La mutación de APC permite la sobreexpresión de β -catenina ((Strubberg & Madison, 2017)

En su conjunto, trabajos recientes han logrado identificar algunos genes relacionados directamente con los mecanismos moleculares que originan el CCR; entre ellos destacan *PTEN*, *GSK3 β* , *APC* y *Rb1* (Ahmed et al., 2013)(Binghe Chen et al., 2017)(Näthke, 2004)(Parisi, Bronson, & Lees, 2015).

1.2.1 *PTEN*, regulador clave de la proliferación y migración

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. *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 y migración celular (Papandreou & Logothetis, 2004) (Figura 6). Agarwal demostró que en líneas celulares derivadas de CCR, la inhibición de *PTEN* permite la activación de la vía PI3K-AKT, promoviendo la invasión

y migración celular (A. Agarwal et al., 2005). Además, Mao y colaboradores, evaluaron la expresión de PTEN en 69 tumores de pacientes de origen chino con CCR, y encontraron disminución de PTEN del 42% y un incremento en la concentración de PIP-3 e hiperactivación de la vía PI3K-AKT (Mao et al., 2012).



Nature Reviews | Cancer

Figura 6. 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 (Vivanco & Sawyers, 2002).

1.2.2 *GSK3 β* y *APC*, reguladores de la vía Wnt/ β -catenina

El gen *GSK3 β* codifica para una proteína serina/treonina cinasa que regula diversas vías de señalización, mediante la fosforilación de sus sustratos, y tiene un papel primordial en la vía Wnt/ β -catenina marcando mediante fosforilación a β -catenina para su posterior degradación (Shakoori et al., 2005) (Figura 7).

Por otra parte la proteína APC además de formar parte del complejo de 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).

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 promoviendo inestabilidad genética (Fodde, 2002).

Kucherlapati y colaboradores evaluaron diferentes mutaciones en APC en un modelo *in vivo*, y observaron que en algunos ratones desarrollaron gran cantidad de adenomas en el intestino delgado (Kucherlapati et al., 2008). Además, una mutación adicional en el gen *Rb1* confiere un mayor potencial de invasión del tumor, demostrando que la correcta función de APC y *Rb1* es crucial para evitar el desarrollo de la neoplasia.

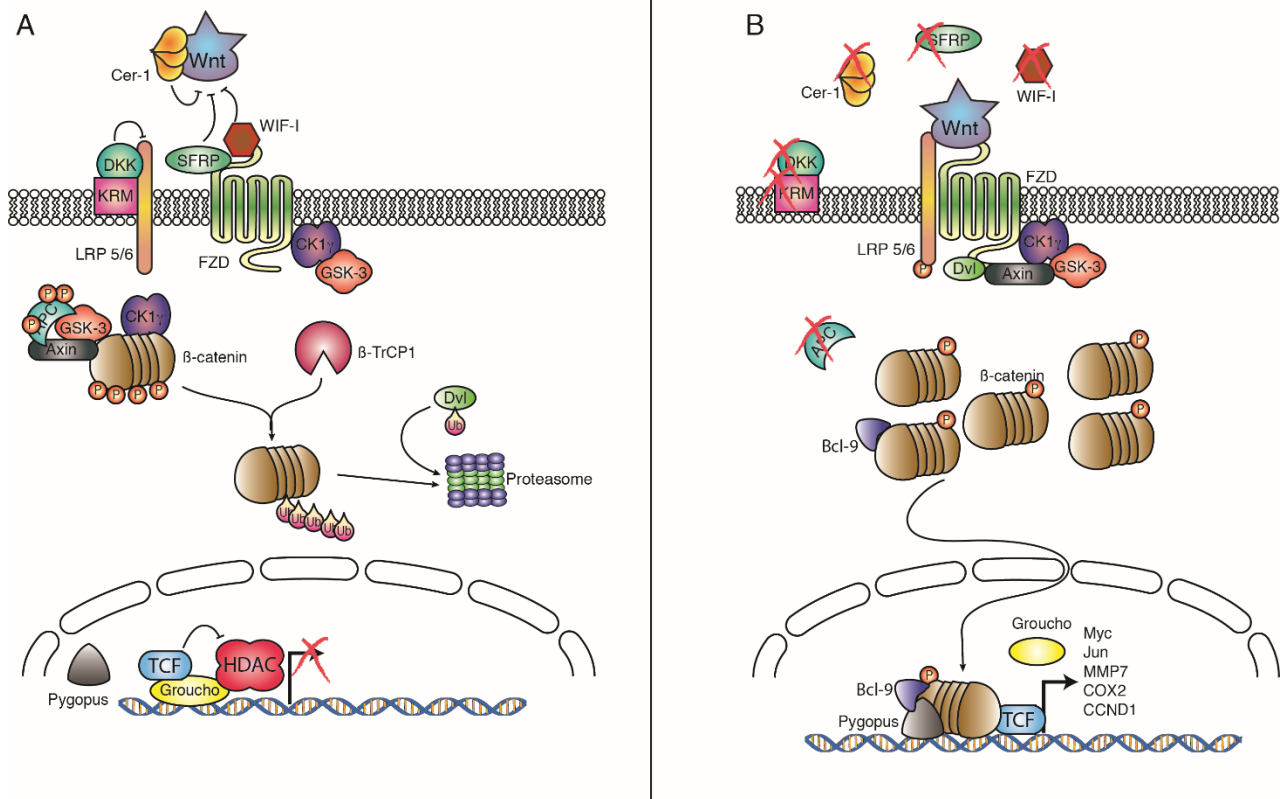


Figura 7. Vía de señalización Wnt/β-catenina. a) En ausencia de la señalización activada por Wnt, β-catenina es secuestrada por un complejo formado por APC, Axina, CK1a y GSK3β. APC reconoce la estructura proteica de β-catenina y la incorpora al complejo, posteriormente GSK3β fosforila los residuos amino-terminal de β-catenina, facilitando que sea ubiquitinada por β-TrCP1 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 (Barker & Clevers, 2006).

1.2.3 Rb1, controlador maestro del ciclo celular

La proteína Rb1 controla 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, D'Anneo, Tesoriere, & Vento, 2013). Diversos estudios han demostrado que la inactivación de Rb1 promueve la proliferación excesiva y la inestabilidad genómica (Manning & Dyson, 2011) (Figura 8).

Soletti reportó que en CCR esporádico existe sobreexpresión de mRNA de *Rb1* pero inversamente, existe una disminución a nivel de proteína (Soletti et al., 2013); esto lo atribuyen a la sobreexpresión de mir-106a, el cual puede regular negativamente la traducción de la proteína Rb1 (Catela Ivkovic, Aralica, Cacev, Loncar, & Kapitanovic, 2013). Adicionalmente, estudios recientes indican que diversos eventos moleculares asociados a la carcinogénesis colorrectal podrían estar sujetos a regulación post-transcripcional ejercida por microRNAs (Tili, Michaille, & Croce, 2013)(Danese et al., 2017).

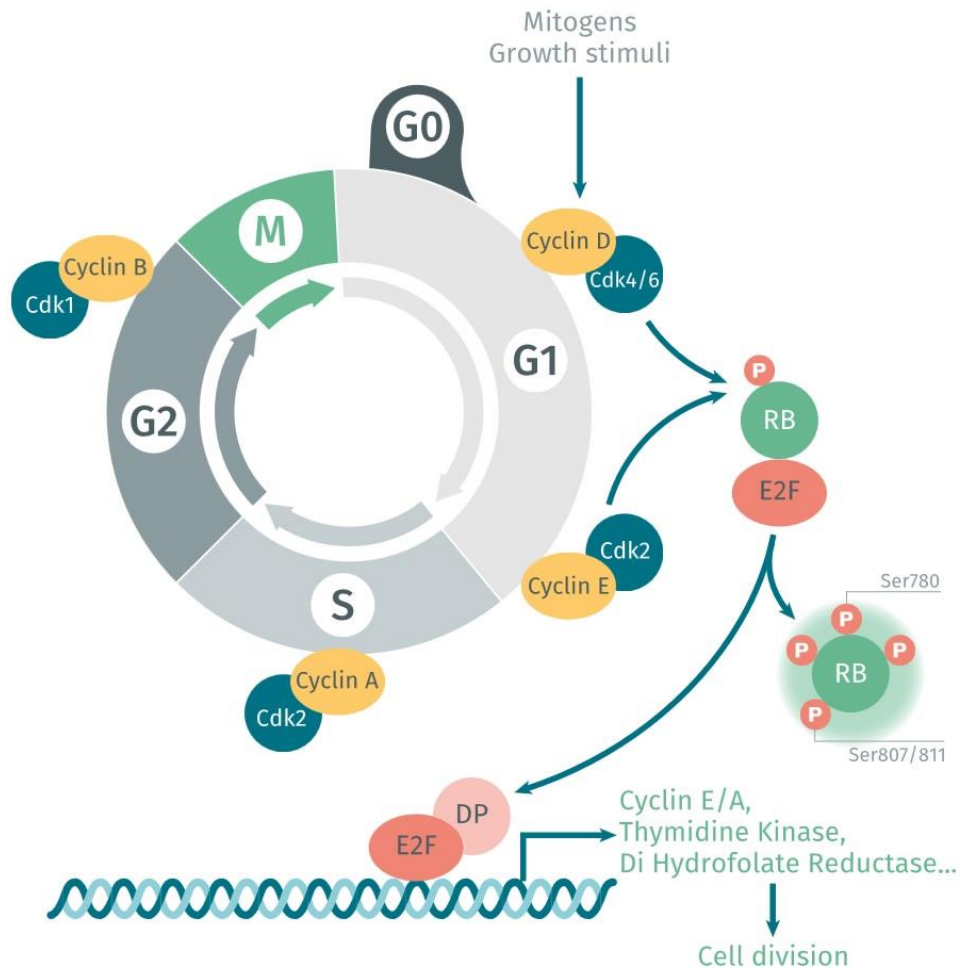


Figura 8. La función principal de Rb1 es regular la progresión del ciclo celular. La transición de G1 a S se activa por la fosforilación de Rb1 mediante el complejo de ciclinas (Cyclin D1,E) y las cinasas dependiente de ciclinas (CDK4,6 y 2). La hiperfosforilación de Rb1 está asociada con la liberación del factor de transcripción E2F1-3, el cual activa genes requeridos para la progresión del ciclo celular (Coller, 2007)

2. 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 del RNA mensajero o la inhibición de la traducción. Un solo miRNA puede regular múltiples genes, actuando, así como un control maestro de la expresión génica (Carthew & Sontheimer, 2009)(Bentwich et al., 2005).

Para la maduración de un miRNA es necesario que se lleven a cabo 3 pasos: (1) la transcripción de un RNA precursor conocido como pri-microRNA que es una molécula de cientos de bases de longitud compuesta por varias horquillas sintetizado a partir de DNA por una RNA polimerasa tipo II, (2) su procesamiento en el núcleo por una RNAsa llamada Drosha que da como resultado un segundo intermediario llamado pre-microRNA de aproximadamente 70 bases de longitud y que es exportado al citoplasma por la exportina 5 y finalmente (3) su maduración en el citoplasma, donde 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., 2003)(X. Zhang & Zeng, 2010)(Siomi & Siomi, 2010). Posteriormente, DICER junto con las proteínas Argonautas forman un complejo conocido como RISC en donde los miRNAs maduros son incorporados en dirección 5' a 3'; Argonauta tiene actividad de endonucleasa, lo que permite la degradación del mRNA complementario al miRNA (Lee et al., 2003) (Figura 9).

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 y solo hay

complementariedad de al menos 6-8 nucleótidos (región semilla) ocurre represión en el proceso de traducción ocasionado por modificaciones en la estructura del mRNA blanco (Gu & Kay, 2010)(Ha & Kim, 2014). Se ha descrito que, en mamíferos el tipo de interacción miRNA-mRNA es parcial, mientras que en plantas la complementariedad es del 100%, este evento permite que en mamíferos un miRNA tenga múltiples mRNA blancos, convirtiéndolos en reguladores maestros de la expresión génica.

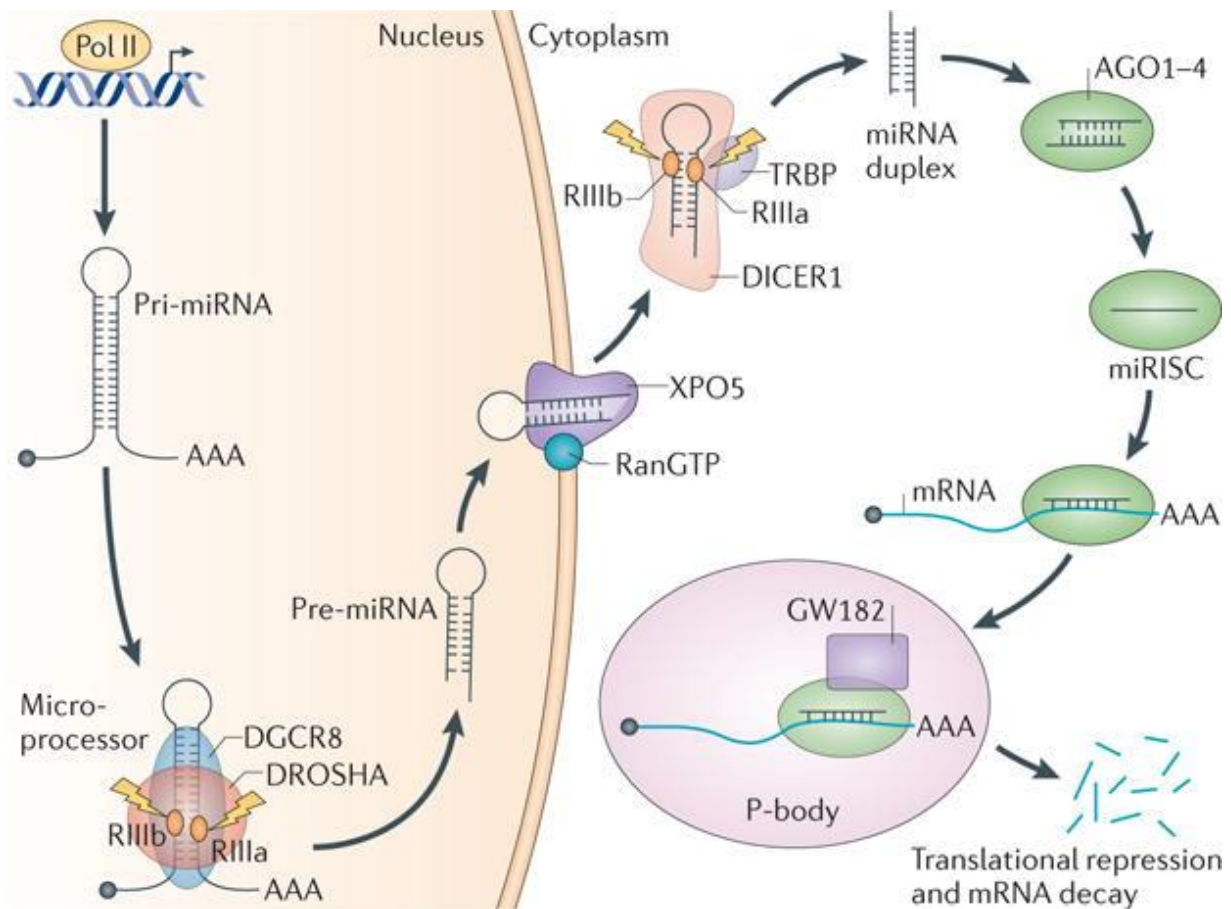


Figura 9. Biogénesis de microRNAs (S. Lin & Gregory, 2015). Esta figura muestra como los microRNAs son transcritos por la RNA polimerasa 2 e inmediatamente procesados por el complejo microprocesador DROSHA, son exportados del núcleo al citoplasma en donde terminarán de ser procesados por el complejo RISC. Una vez que el microRNA es incorporado al complejo de degradación podrá ejercer su función de represores post-transcripcionales.

2.1 El papel de los microRNAs en el desarrollo del cáncer

En la década pasada se demostró que los miRNAs pueden ser herramientas muy útiles para la caracterización de algunos tipos de cáncer ya que están relacionados directamente con la regulación de procesos de diferenciación, progresión del ciclo celular, apoptosis, angiogénesis y metástasis (Yang, Belaguli, & Berger, 2009). Los miRNAs dependiendo al gen blanco que regulen, pueden ser considerados como genes supresores tumorales u oncogenes. Si la sobreexpresión de un miRNA regula negativamente la actividad de un gen supresor de tumor, el miRNA será considerado como **oncomir** y *viceversa*, si la disminución en la expresión de un miRNA promueve un aumento en la expresión de un oncogén, el miRNA será un **supresor de tumor**. Evidencia experimental ha demostrado que existe desregulación en la expresión de miRNAs en diferentes tipos de cáncer comparados con sus contrapartes sanas (Figura 10) (Lu et al., 2005). Se ha reportado que esta desregulación afecta directamente los *hallmarks* del cáncer, haciendo de ellos potenciales biomarcadores para diagnosis, prognosis e inclusive como blancos terapéuticos (Volinia et al., 2006).

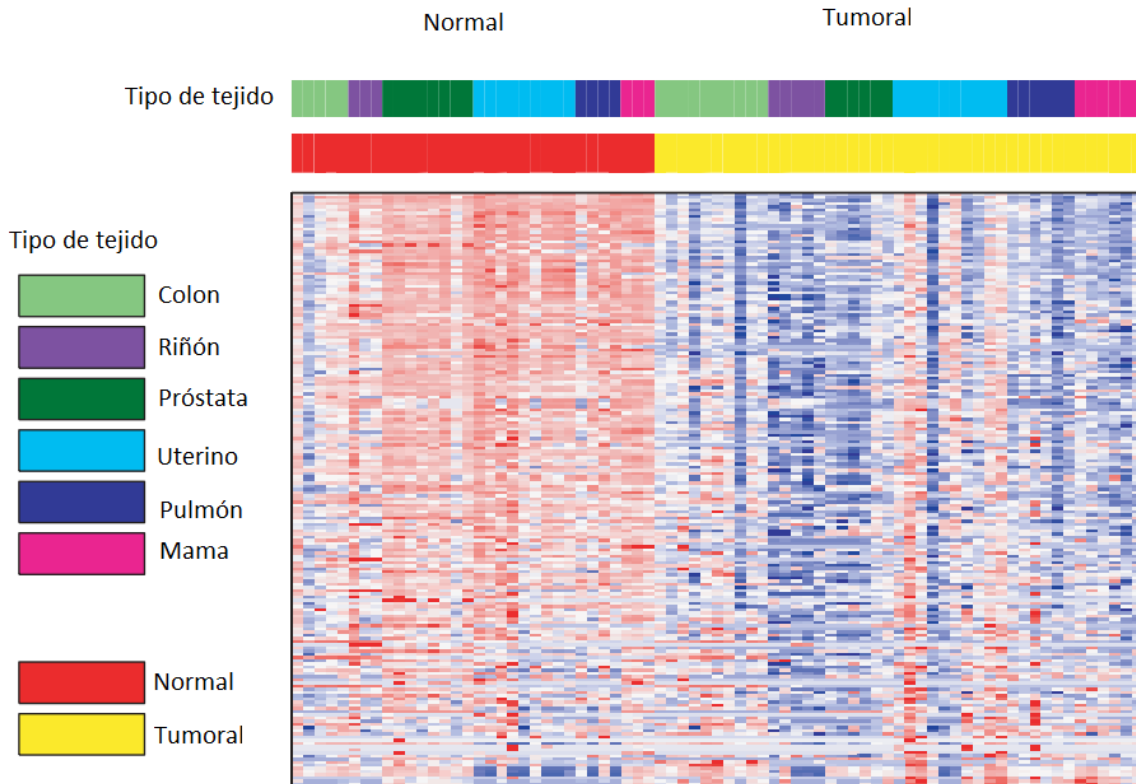


Figura 10. Comparación en la expresión de miRNAs expresados en diferentes tipos de cáncer comparados con sus contrapartes normales (Lu et al., 2005) . Este mapa de calor muestra como los miRNAs se expresan de manera diferencial en tejido normal (rojo) comparado con tejido tumoral (amarillo) en diferentes tipos de cáncer, lo que sugiere que cada tipo de cáncer tiene un perfil de expresión distinto .

2.1.1 MiRNAs en CCR

El primer estudio acerca de miRNAs en CCR se debe al trabajo de Michael O'Connor y colaboradores en el 2003, ellos identificaron que mir-145 y mir-143 muestran un patrón de expresión diferencial en las muestras derivadas cáncer colorrectal comparada con tejido sano (Michael, O' Connor, van Holst Pellekaan, Young, & James, 2003). Por otra parte el grupo de trabajo de Xi realizó un análisis de expresión de miRNAs en células HCT116 derivadas de CCR y encontraron que existe desregulación en 10 miRNAs, donde mir-200 tienen la capacidad de regular a la proteína supresora de tumor p53 (Xi et al., 2006). 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) publicó una lista en la que resume el nivel de expresión de miRNAs con expresión diferencial en CCR (Figura 11).

| Expression and targets of microRNA in colorectal cancer | Up-regulated microRNA | Proposed targets | Down-regulated microRNA | Proposed targets |
|---|-----------------------|------------------|-------------------------|--------------------|
| | let-7b | | let-7a | |
| | let-7 g | TGFR2 | miR-10a | |
| | miR-9 | TCF4, MSH2 | 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 | K-Ras | miR-107 | |
| | miR-124b | MLH1 | miR-124a | CDK6, Rb |
| | miR-132 | | miR0125a | |
| | miR-135a | MSH2 | miR-125b | VEGF, IGFR1, VEGFR |
| | miR-135b | | miR-127 | |
| | miR-141 | APC, MSH2 | miR-130a | TGFR2 |
| | miR-142-3p | APC | miR-133a | BAX, K-Ras |
| | miR-142-5p | | miR-133b | K-Ras |

Figura 11. Lista de miRNAs asociados a la progresión de CCR publicada por Yang en el 2009

Con los datos de esta lista y mediante un análisis bioinformático utilizando los algoritmos de TargetScan (V. Agarwal, Bell, Nam, & Bartel, 2015), MirDataBase (Griffiths-Jones, Saini, van Dongen, & Enright, 2007) y Starbase (J. H. Li, Liu, Zhou, Qu, & Yang, 2014) (los algoritmos calculan la probabilidad de unión entre la región semilla de un microRNA y la región 3 UTR del RNA mensajero, tomando como base la probabilidad de apareamiento de bases tipo Watson y Crick y datos experimentales de inmunoprecipitación de RNA asociado secuenciación masiva), nuestro grupo de trabajo encontró que mir-26a podría ser un potencial oncomir regulador de los genes supresores *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β* en CCR (Figura 12).

| | | 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 | | |

Figura 12. Análisis bioinformático de miRNAs sobreexpresados en CCR y sus posibles genes blanco. Para elegir el miRNA a estudiar, se seleccionaron los primeros 10 miRNAs mayormente expresados en CCR basándonos en la lista publicada por Yang 2009. Usando los algoritmos bioinformáticos TargetScan (V. Agarwal et al., 2015), MirDataBase (Griffiths-Jones et al., 2007) y Starbase (J. H. Li et al., 2014) detectamos que algunos genes supresores de tumores asociados al desarrollo del CCR (tales como *PTEN*, *p53*, *APC*, *GSK3 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 de interacción en el gen *APC*, *GSK3 β* y *Rb1* y tres sitios de interacción en *PTEN*

3. Antecedentes

Usando la técnica de microarreglos, el grupo de investigación de Huse encontró que mir-26a se encuentra sobrexpresado en pacientes con glioma avanzado, y que en cultivo celular puede reprimir la expresión de *PTEN*. La relevancia fisiológica de mir-26a en la gliomagénesis fue demostrada usando un modelo *in vivo*, donde al sobrexpresar mir-26a mediante transducción retroviral dirigido específicamente hacia las células gliales, se observó el desarrollo de gliomas de alto grado y disminución de la proteína PTEN (Huse et al., 2009). Kim y colaboradores reafirmaron la relevancia de mir-26a en glioblastoma al demostrar que la proteína Rb1 también es regulada por este miRNA, y el resultado de dicha regulación es el incremento en la proliferación y la sobre-activación de la vía PI3K-AKT (Kim et al., 2010). Por otra parte, Zhang observó que en células derivadas de colangiocarcinoma la sobrexpresión de mir-26a está asociada a la disminución de *GSK3 β* , resultando en la activación de β -catenina y por consiguiente, aumento en la transcripción de los oncogenes *C-myc*, *Ciclina D1* y *COX2* (Jinqiang Zhang, Han, & Wu, 2012). Recientemente el grupo de Chen encontró sobrexpresión de mir-26a en líneas derivadas de CCR, y concluyeron que este miRNA tiene función oncogénica al regular el metabolismo de la glucosa vía *PDHX* (B Chen et al., 2014), proteína que inhibe la conversión de piruvato a Acetil-CoA en el ciclo de Krebs, promoviendo que la glucosa sea oxidada en su mayor parte a lactato, fenómeno causante del efecto Warburg.

En nuestro grupo de investigación, en trabajos anteriores, modelamos exitosamente el cáncer colorrectal, mediante una modificación del modelo de CCR asociado a inflamación en ratones reportado por Tanaka y colaboradores (Tanaka et al., 2003). Detectamos expresión

creciente de mir-26a a lo largo del desarrollo del modelo y paralelamente, detectamos disminución en el mRNA de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β*. De esta forma nos es posible especular que mir-26a ejerce regulación negativa sobre estos genes en CCR.

Justificación

El CCR constituye una importante causa de mortalidad en nuestro país. 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 específicos de esta enfermedad. En este trabajo pretendemos esclarecer la regulación ejercida por mir-26a sobre genes de importancia para el desarrollo de CCR.

Hipótesis

mir-26a regula directamente a los transcritos de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3 β* favoreciendo los procesos de proliferación y migración celular en líneas celulares de cáncer colorrectal.

Objetivos

Objetivo General

Analizar la relación entre mir-26a y la expresión de los genes *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3 β* en líneas celulares derivadas de CCR.

Objetivos Particulares

1. Medir la expresión de mir26a mediante qPCR en líneas celulares de CCR y medir la expresión de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3 β* mediante qPCR y Western Blot en líneas celulares de CCR.
2. Validar la interacción de mir-26a con sus respectivos genes blanco por medio de un ensayo de luciferasa.
3. Medir la expresión de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3 β* mediante qPCR y Western Blot en un modelo con expresión diferencial de mir-26a.
4. Realizar ensayos de proliferación y migración en un modelo con expresión diferencial de mir-26a.
5. Medir la expresión de mir-26a mediante qPCR en tejidos de pacientes con cáncer colorrectal y realizar análisis de la expresión de mir-26a y de los genes blanco en la base de datos del The Cancer Genome Atlas y The Human Protein Atlas.
6. Esclarecer el motivo de la sobreexpresión de mir-26a

II. Materiales y Métodos

Cultivo celular

Las líneas celulares derivadas de cáncer colorrectal HCT116, SW480 y SW620 y la línea CRL1790 inmortalizada no tumoral fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Cancerología, y fueron sembradas en placas Petri de 100 x 20 mm, las células HCT116 y CRL1790 fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen, 22400071) mientras que las células SW480 Y SW620 en medio DMEM-F12 (GIBCO, Invitrogen, 11320033), ambos medios suplementados con Suero Fetal Bovino (SFB bioWEST) al 10%. Las células fueron incubadas bajo condiciones de 5% de CO₂ a una temperatura de 37°C en un incubador (Thermo Scientific 8000 WJ). Para los ensayos de ChIP, las células HCT116 fueron tratadas con Cloruro de Cobalto (CoCl₂, Sigma Aldrich, 7646-79-9) y dimethylxaloylglycine (DMOG, Sigma Aldrich, 89464-63-1) por 24 horas para estabilizar la actividad de HIF-1a.

Diseño de Oligonucleótidos

Para medir la expresión de los genes blanco de mir-26a se diseñaron oligonucleótidos específicos para alinearse únicamente en las regiones con exon junctions del RNAm de *PTEN*, *Rb1*, *APC*, *GSK3β* y *actina* empleando el software CLC Sequence Viewer 6.0. Para medir la expresión de mir-26a y RNU6 se utilizaron sondas taqman compradas directamente con el fabricante. Por otra parte, las secuencias de los oligonucleótidos usados para el experimento de interacción por luciferasa fueron tomadas del algoritmo MirDataBase (Griffiths-Jones et al., 2007) y se les añadió la secuencia de reconocimiento para la enzima

de restricción SpeI en el primer forward mientras que en el primer reverse se añadió la secuencia HindIII, esto con el fin de facilitar la ligación al vector de luciferasa. Los oligonucleótidos usados para el ChIP fueron diseñados 100 nucleótidos río arriba (para el caso del primer forward) y 100 nucleótidos río abajo (para el caso del primer reverse) de la secuencia HRE de los promotores de los genes *CTDSPL* y *CTDSP2*. Las secuencias empleadas se muestran en la Tabla 1.

| Gen | Secuencia | Tm | (GenBank ID) |
|------------------------|--|------|----------------|
| PTEN F | AGGCACAAGAGGCCCTAGAT | 58.1 | NM_000314.4 |
| PTEN R | AACTGAGGATTGCAAGTTCCG | 55.5 | NM_000314.4 |
| Rb1 F | CACCAGGCTCCTACCTTGT | 59 | NM_000321.2 |
| Rb1 R | GGTGTGGCAGACCTTCTGA | 57.3 | NM_000321.2 |
| GSK3 β F | CGAGACACACCTGCACTCTT | 57.1 | NM_001146156.1 |
| GSK3 β R | TTAGTATCTGAGGCTGCTGTGG | 56.3 | NM_001146156.1 |
| APC F | GTTGCCAACAAGGCTACGC | 57.4 | NM_000038.5 |
| APC R | ACATCTGCTCGCCAAGACAA | 57 | NM_000038.5 |
| 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 |
| pPTENmir26 F | CTAGTAACTGTTAGGGAATTTACTTGAAA | - | - |
| pPTENmir26a R | AGCTTTTCAAGTAAAATTCCTAACAGTTAA | - | - |
| pRb1mir26a F | CTAGTAAAGTACCC TCTAGTACTTGAAA | - | - |
| pRb1mir26a R | AGCTTTTCAAGTACTAGATGGGTACTTTA | - | - |
| pGSK3 β mir26a F | CTAGTATAACATATTACTACTTGAAA | - | - |
| pGSK3 β mir26a R | AGCTTTTCAAGTAGTAATAATGTTATA | - | - |
| pAPCmir26a F | CTAGTTGTGTAACATTACTACTTGAAA | - | - |
| pAPC mir26a R | AGCTTTTCAAGTAGTAATGTTACACAA | - | - |
| PromCTDSPL F | ACAGCACCCGAAAATGCCAC | 58.3 | - |
| PromCTDSPL R | GGATCGGGAGTGATCTGTGC | 57.6 | - |
| PromCTDSP2 F | AGCGGCTTGTCTTGGTCACC | 59 | - |
| PromCTDSP2 R | CTAACAAACATTCCAGGCGCCA | 57.5 | - |

Tabla 1. Listado de oligonucleótidos obtenidos mediante el software CLC Sequence Viewer 6.0

Modelo *in vivo* AOM/DSS

El establecimiento del modelo *in vivo* de CCR ha sido previamente reportado por Tanaka y colaboradores (Tanaka et al., 2003). En este modelo, el Azoximetano (AOM, Sigma Aldrich, 25843-45-2) funciona como un agente carcinógeno al inducir la formación de aductos en el DNA, mientras que el Dextran-Sulfato de Sodio (DSS, Sigma Aldrich, 75027) 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. Después de 5 días se les administró 2.0% de DSS 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 13). 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.

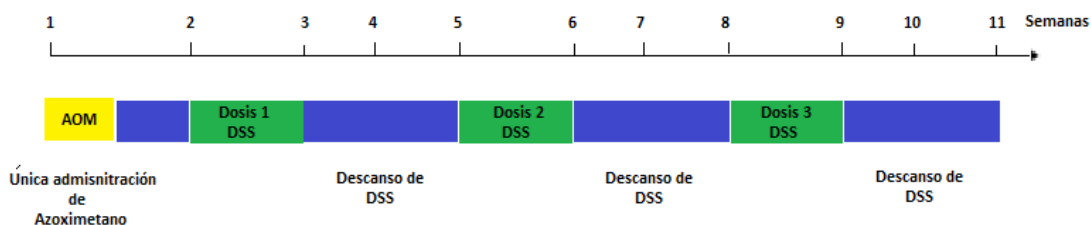


Figura 13. Modelo de carcinogénesis de CCR asociado a inflamación, basado en la administración de AOM/DSS. Los recuadros verdes indican las fases en las que se realizaron los análisis, morfo-histológico, moleculares y epigenéticos.

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) (Armed Forces Institute of Pathology (U.S.), 1994). Se realizó un corte de aproximadamente 5mm³ en el colon de los ratones. Las muestras fueron fijadas con formol al 4% y se mantuvieron así, hasta que fueron procesadas. El tejido fijado fue lavado y deshidratado para posteriormente ser incluido en parafina histológica. Las muestras fueron examinadas usando cortes de 5 µm de grueso y teñidos con H & E (Hematoxilina y Eosina).

Extracción de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo por el método de TRIzol (Life Technologies, 15596026). Se utilizó 1 ml de TRIzol para las placas Petri de 100 x 20 mm, y para las placas de 6 pozos se utilizaron 500 µl. La fase acuosa fue obtenida con 200 µl de cloroformo (por cada mililitro de trizol) a 12, 000 r.p.m. a 4 ° C por diez minutos, se precipitó con 500 µl de isopropanol al 100% (por cada mililitro de trizol) por 4 horas a -20 ° C, seguido de 20 minutos de centrifugación a 12, 000 r.p.m. a 4 ° C. La pastilla fue lavada con 1 ml de etanol al 70% (por cada mililitro de trizol). El RNA obtenido se resuspendió en 50µl y 30µl de agua milliQ (Millipore) respectivamente. La cuantificación del RNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una absorbancia de 260 nm. La integridad de este se analizó mediante un gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt (bromuro de etidio). Para el caso del modelo AOM/DSS, se utilizaron 100 mg de tejido, el cual fue homogenizado con el 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, previamente descrito. La integridad de este se analizó mediante un gel de agarosa al 2 % teñido con BrEt (Figura 14).

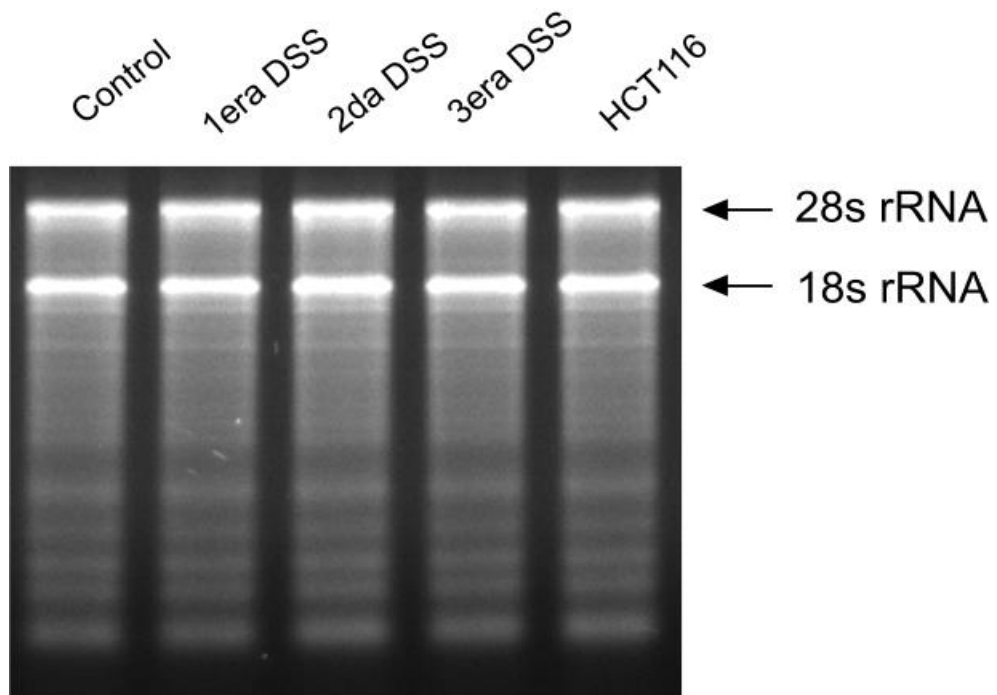


Figura 14. Imagen representativa de la integridad del RNA de las muestras del modelo de CCR AOM/DSS. Bandas ribosomales 28s y 18s que muestran una buena integridad del RNA.

Extracción de RNA de tejidos embebidos en parafina

Se obtuvieron 13 muestras de tejidos embebidos en parafina derivadas de CCR y 13 muestras de tejido sano adyacente proporcionados por el Instituto Nacional de Cancerología. El diagnóstico clínico patológico se encuentra en la tabla 5 del apartado de Anexos. Cabe mencionar que no hubo criterios de exclusión ni inclusión para este estudio. El RNA total y los microRNAs fueron aislados de usando el kit mirRNeasy FFPE kit (Qiagen, 217504)

siguiendo las recomendaciones del fabricante. El RNA obtenido fue purificado por la técnica de fenol-cloroformo y finalmente resuspendido en agua DEPC. La cuantificación del RNA se llevó a cabo en un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek) a una absorbancia de 260 nm

Retrotranscriptasa Reversa y 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 Retrotranscriptasa Reversa para sintetizar DNA utilizando como molde una al RNA. El DNA obtenido se utilizó para la técnica de PCR en tiempo real (qPCR), que es empleada para amplificar y simultáneamente cuantificar de forma absoluta o relativa el producto de la amplificación empleando como molde DNA. La retrotranscriptasa se llevó a cabo utilizando 100 ng de RNA total para la cuantificación de mir-26a y 2 µg de RNA total para la cuantificación de los genes blancos. Se utilizó el kit Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) y el kit High Capacity Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) respectivamente. La qPCR se realizó en el termociclador BioRad CFX96 (BioRad), utilizando el kit Taqman Universal Master Mix II (Applied Biosystems) para mir-26a y RNU6, y el kit SYBR Select Master Mix for CFX96 (Applied Biosystems) para los genes regulados por mir-26a (Tabla 2 y 3). RNU6 y Actina fueron usados para normalizar la expresión de mir-26a y de los mensajeros respectivamente. Se calculó el valor relativo de expresión de los genes utilizando el método de $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ (Applied Biosystems).

Las condiciones de retrotranscriptasa y de amplificación fueron las siguientes:

| Paso | Temperatura C° | Duración | Repetición |
|---------------------------|----------------|----------|------------|
| Desnaturalización Inicial | 95 | 10 min | 1 |
| Desnaturalización | 95 | 10 s | 40x |
| Alineamiento/Extensión | 60 | 1 m | |
| Enfriamiento | 4 | 1m | 1 |

Tabla 2. Condiciones de amplificación de mir-26a.

| Paso | Temperatura C° | Duración | Repetición |
|---------------------------|----------------|----------|------------|
| Síntesis de cDNA | 50 | 2 horas | 1 |
| Desnaturalización Inicial | 94 | 2 min | 1 |
| Desnaturalización | 94 | 10 s | 40x |
| Alineamiento | 45-65 * | 30 s | |
| Elongación | 72 | 45 s | |
| Elongación Final | 72 | 7 min | 1 |
| Enfriamiento | 37 | 2 min | 1 |

Tabla 3. 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.

Extracción de Proteínas

La extracción se realizó bajo la técnica de buffer RIPPA suplementado con un coctel de proteasas Complete (Roche, #11697498001). Para todos los experimentos de western blot, se sembraron 5×10^5 células/pozo placas de 6 pozos. Por cada pozo, se agregó 50 μ l de buffer RIPPA y las células fueron lisadas con ayuda de un *scraper*. El sobrenadante se recuperó en un tubo eppendorff de 600 μ l y fue agitado 15 segundos cada 5 minutos durante media hora con un Vortex-Genie 2. Posteriormente, los conglomerados celulares fueron disgregados manualmente con ayuda de una jeringa de 1ml. Para finalizar, el lisado celular fue centrifugado por 20 minutos a 12,000 rpm a 4°C, el sobrenadante fue recuperado en otro tubo de 600 μ l y la cuantificación de 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. Para el caso del modelo AOM/DSS, el tejido fue homogenizado con ayuda de un Polytron. La extracción se realizó con 250 µl de buffer RIPPA, siguiendo las instrucciones mencionadas anteriormente.

Western Blot

Con el objetivo de detectar y medir el nivel de expresión de las proteínas PTEN, Rb1, GSK3β y APC se utilizó la técnica de Western Blot. Se emplearon 100 µg de proteínas, las cuales fueron separadas mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando el equipo Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad) a 80 volts por 2 horas. Posteriormente las proteínas fueron transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PDVF) con un poro de 0.45 µm 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 % (Tris 20mM, NaCl 150mM) por 2 horas. Posteriormente se hicieron 3 lavados con TBS-Tween 0.1% y se incubó durante toda la noche con el anticuerpo (Ab) primario correspondiente a la proteína a detectar (Tabla 4). Una vez transcurrido el tiempo de incubación del Ab primario, se realizaron tres lavados con TBS-Tween 0.1% y se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente, acoplado a peroxidasa 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-GSK3β | Sc-9166 | Anti-rabbit |

| | | |
|----------------------------|----------|-------------|
| Anti-Rb1 | Sc-50 | Anti-rabbit |
| Anti-PTEN | Sc-7974 | Anti-mouse |
| Anti-HIF | Sc-8312 | Anti-rabbit |
| Anti- β -Actina | Sc-47778 | Anti-mouse |
| Anti-APC | Sc-896 | Anti-rabbit |
| Anti-AKT | Sc-8312 | Anti-rabbit |
| Anti-pAKT | SC-7985 | Anti-rabbit |
| bovine anti-mouse IgG-HRP | sc-2371 | n/a |
| bovine anti-rabbit IgG-HRP | sc-2370 | n/a |

Tabla 4. Listado de anticuerpos utilizados para Westen Blot

Construcción de vectores p-MIR-Report y ensayo de luciferasa

Se utilizo el plásmido pMIR-Report (Ambion) que permite clonar una región 3'UTR de interés para su expresión junto con el marco abierto de lectura de la luciferasa; la disminución de la fluorescencia resultante en comparación con la emisión de Renilla como control, indica la degradación del RNA mensajero mediada por el miRNA que reconozca la región 3'UTR clonada. Tomando en cuenta los sitios específicos de reconocimiento de mir-26a presentes en las regiones 3'UTR *GSK3 β* , *APC*, *PTEN* y *Rb1* identificadas mediante análisis bioinformático usando el algoritmo TargetScan (V. Agarwal et al., 2015) y MirDataBase (Griffiths-Jones et al., 2007) y con la finalidad de facilitar la ligación al vector de luciferasa utilizando una molécula de doble cadena generada por alineamiento, se diseñaron oligonucleótidos (de aproximadamente 25 y 30 pares de bases) que contaban con extremos de reconocimiento para enzimas de restricción, Spe1 en el oligonucleótido forward y HindIII en el oligonucleótido reverso. Se tomaron 2 μ g de oligonucleótido forward y reverso (para cada construcción), y fueron desnaturalizados a 95° C por 5 minutos e incubados a 37° C por 2 horas en buffer de alineamiento (Ambion, HEPES 30mM, CH₃CO₂K 100mM y

Mg(CH₃COO)₂. Posteriormente, se realizó una electroforesis para purificar las moléculas de doble cadena empleando el kit de purificación S.N.A.P gel purification (Invitrogen) (Figura 15).

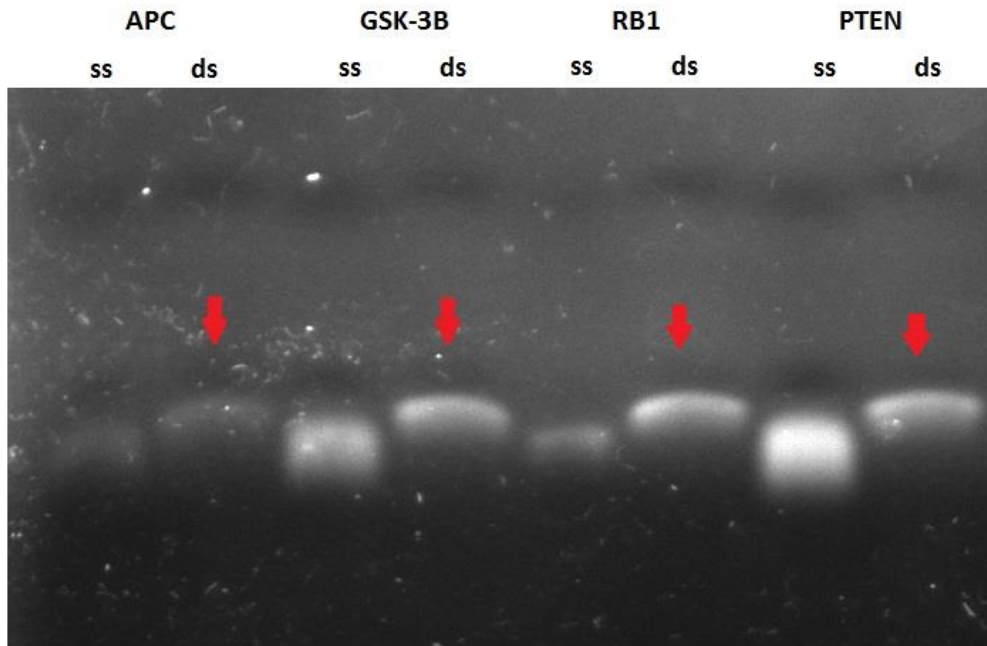


Figura 15. Imagen representativa de Oligonucleotidos en cadena sencilla (ss) y doble cadena (ds) en electroforesis en gel de agarosa. Esta electroforesis ejemplifica el desplazamiento electroforético de un oligonucleótido en cadena sencilla (25-30 pares de bases) y el desplazamiento electroforético de la molécula en doble cadena después de que el oligonucleótido forward y reverse específicos de cada construcción fueron alineados por 2 horas.

De manera paralela, 2 µg del plásmido pMIR-Report (Ambion) fueron digeridos con las enzimas de restricción HindIII y SpeI (New England Biolabs) a 37° C por 4 horas. Las enzimas fueron inactivadas a 80°C por 5 minutos. Para verificar que el plásmido fue digerido exitosamente, realizamos una electroforesis en gel de agarosa. Se observó una banda de 6300 (Figura 16) (correspondiente al peso del plásmido digerido) y fue purificada con el kit de purificación S.N.A.P gel purification (Invitrogen).

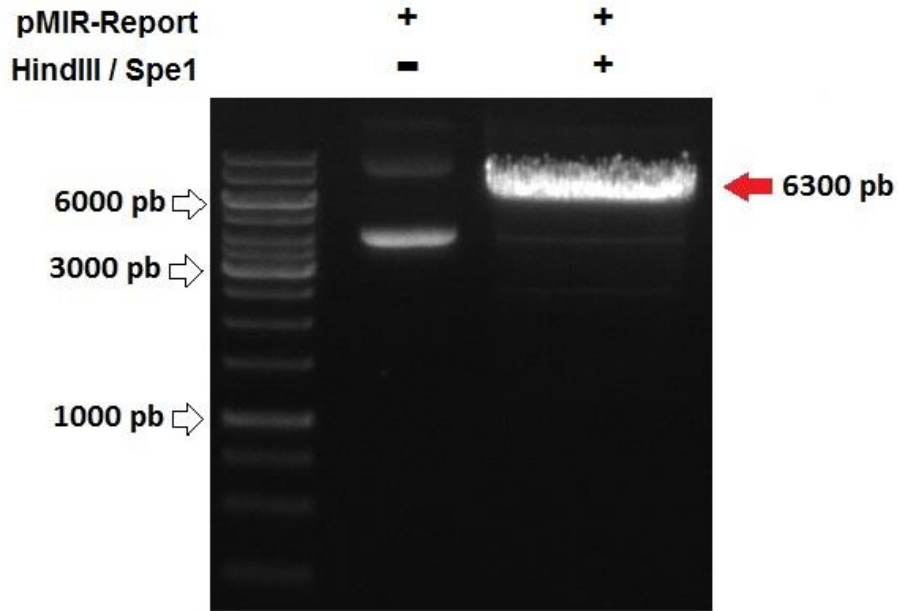


Figura 16. Electroforesis en gel de agarosa que muestra el desplazamiento electroforético del plásmido p-MIR-Report en el primer carril y desplazamiento electroforético de la digestión enzimática con Spe1 y HindIII del mismo plásmido en el segundo carril. En el primer carril se observa una banda de 5000 pb y otra de 8000 pb correspondientes al plásmido p-MIR-Report en su forma super enrollada y enrollada respectivamente. En el segundo carril se muestra un fragmento de 6300 pb, producto de una digestión enzimática exitosa.

Una vez purificado el plásmido y la molécula de doble cadena, se realizó una ligación con la enzima Ligasa T4 (Invitrogen) 1 hora a temperatura ambiente, utilizando 50 ng de plásmido y 15 ng de molécula de doble cadena para cada construcción, quedando una relación de ligación de 1:100. Posteriormente, bacterias de la cepa XL10-Gold fueron transformadas con 30 ng de ligación. Las colonias que crecieron fueron seleccionadas y puestas a crecer en medio LB (Invitrogen) en agitación a 37° C durante 14 horas. Acto seguido, el DNA bacteriano fue purificado con el kit PureLink™ Quick Plasmid Miniprep (Invitrogen). Para verificar que la molécula de doble cadena fue ligada exitosamente, realizamos una electroforesis en gel de agarosa. Se observaron dos bandas, una de 5000 pb y otra de 8000 pb (Figura 17) correspondientes al peso del plásmido en su forma super enrollada y enrollada respectivamente, esto significa que el plásmido fue ligado con éxito. Como segundo método

de validación, se envió 1 μg de plásmido al Instituto Nacional de Medicina Genómica para ser secuenciado mediante la técnica de Sanger. Los electroferogramas resultantes de la secuenciación fueron analizados con el programa CLC Sequence Viewer 6.0 (Figura 18). Se encontró que todas las moléculas de doble cadena fueron ligadas con éxito en el vector p-MIR-Report.

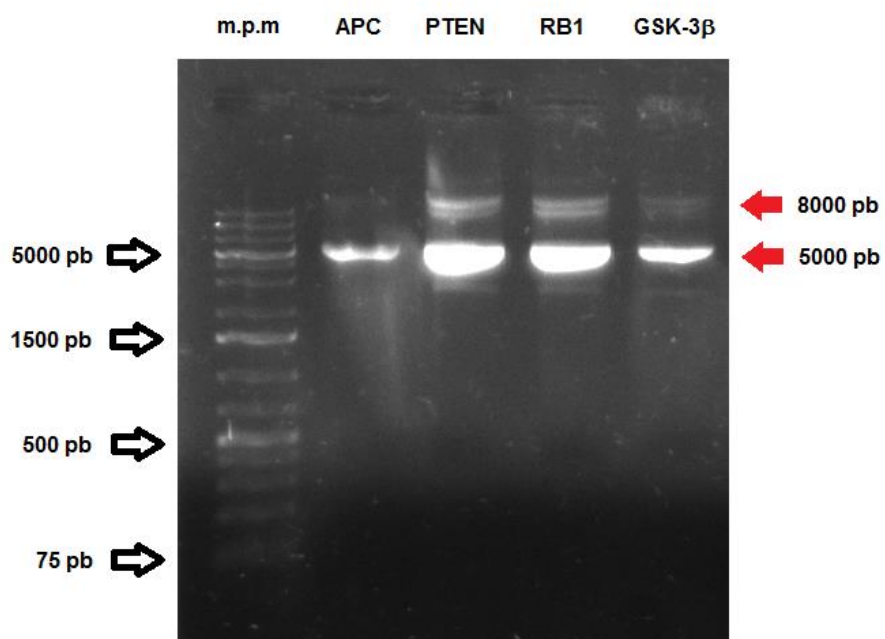


Figura 17. Ligación de las moléculas de doble cadena (provenientes de los alineamientos de APC, Rb1, PTEN y GSK3B) en plásmido p-MIR-Report. En los carriles se observan bandas de 5000 pb y otra de 8000 pb correspondientes al plásmido p-MIR-Report en su forma super enrollada y enrollada respectivamente lo que sugiere que el plásmido fue ligado con éxito.



Figura 18. Validación por secuenciación tipo Sanger de la ligación de la molécula de doble cadena de *APC*, *Rb1*, *PTEN* y *GSK3β* en plásmido p-MIR-Report

Sin embargo, con la finalidad de esclarecer el resultado de la Figura 25, ubicada en el apartado de resultados, también se clono la región 3'UTR completa de los mensajeros *APC* y *Rb1* amplificada con la enzima GoTaq (Promega). Para todos los experimentos de las construcciones de luciferasa, se co-transfectarán con un símil de mir-26a mirVana miRNA mimic (Ambion) cuya función es análoga a la sobreexpresión de mir-26a, mir-1 utilizado como microRNA control negativo, una secuencia scrambled como segundo control negativo y un anti-mir-26a como inhibidor de mir-26a, en la línea celular HCT116. Se sembraron 5×10^5 células por cada grupo experimental en placas de seis pozos y fueron transfectadas con 5 μ l. de Lipofectamina 2000 por 24 horas. Para el caso de los plásmidos, se transfectaron 2.5 μ g y para los microRNAs se transfectó el volumen necesario para obtener una concentración final de 100 nm por cada pozo. En cada grupo, se co-transfectó el plásmido de Renilla PGL4.74 (Promega) para normalizar la emisión de luminiscencia. La lectura de luminiscencia se llevó a cabo 24 horas post-transfección con el kit Dual-Light Luciferase

Assay System (Promega, E1910) utilizando el luminómetro Glomax 96 microplate luminometer (Promega).

Ensayo MTT

Las células HCT116 fueron sembradas en placas de 96 pozos con una confluencia de 1×10^4 por pozo y fueron transfectadas con el volumen necesario de mimic-mir-26a, mir-1-control, scrambled y anti-mir-26a para obtener una concentración final de 100 nM por cada grupo, por 48 horas. Posteriormente se adiciono 5mg/ml del reactivo de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Abcam, ab211091) y se incubo por 4 horas a 37°C, después se agregó 50 µl de DMSO para disolver los cristales de formazan y se midió la absorbancia a 540 nm usando un espectrofotómetro de microplacas (Epoch, Biotek). Los experimentos fueron realizados por triplicado biológico.

Ensayo de proliferación y migración en tiempo real

El instrumento xCELLingence real-time cell analyzer (RTCA DP, ACEA Biosciences) fue usado para analizar y monitorear la proliferación y migración celular. Primeramente, se sembraron células HCT116 en placas de 6 pozos con una confluencia de 5×10^5 células por pozo y fueron transfectadas con el mimic-mir-26a, mir-1-control, scrambled y anti-mir-26a a una concentración final de 100 nM, respectivamente por 24 horas. Al transcurrir este tiempo, las células fueron tripsinizadas y contadas en una cámara de Neubauer seleccionando únicamente 1×10^4 células por cada experimento. Para el caso de la proliferación, las células fueron resuspendidas en 150 µl/pozo de medio y suplementadas con 10% de SFB en una placa tipo E-plate. El RTCA monitoreo los valores de índice celular durante 24 horas con intervalos de 15 minutos. Por otra parte, para el ensayo de migración, las células fueron

sembradas en 150 μL /pozo de medio sin SFB en la cámara superior de la placa tipo CIM-plate mientras que en la cámara inferior fueron agregados 150 μL /pozo suplementadas con 10% de SFB como quimio-atrayente. El índice celular fue monitoreado cada 15 minutos por 24 horas. Estos experimentos fueron realizados por triplicado biológico.

Ensayo TOP Flash

Para medir la actividad de la vía Wnt/ β -catenina se utilizó una medida indirecta basada en la actividad transcripcional del factor de transcripción TCF/LEF, ya que es el efecto final de esta vía. Se utilizaron 2.5 microgramos del vector reportero de luciferasa TOP flash que en su región promotora posee 3 sitios de reconocimiento del factor de transcripción TCF/LEF (Merck, Millipore, 17-285), fue co-transfectado con mimic-mir-26a, mir-1-control, scrambled y anti-mir-26a a una concentración final de 100 nM, por 24 horas en células HCT116. El fármaco PNU-74654 (Sigma Aldrich, 113906277) fue usado como control positivo. La lectura de luminiscencia se llevó a cabo 24 horas post-transección con el kit Dual-Light Luciferase Assay System (Promega) utilizando el luminómetro Glomax 96 microplate luminometer (Promega, E1910). La actividad de luciferasa fue normalizada con la actividad de renilla usando el plásmido pGL4.75/renilla (Promega, E6931). Estos experimentos fueron realizados por triplicado biológico.

Ensayo de migración celular por cierre de la herida

Se utilizó el ensayo de cierre de la herida para medir la migración celular. 5×10^5 células HCT116 fueron transfectadas con mimic-mir-26a, mir-1-control, scrambled y anti-mir-26a con una concentración final de 100nM, en una placa de 6 pozos. Las células fueron sembradas con medio al 2% para eliminar la influencia de la proliferación celular. 24 horas post-

transfección se realizó una herida al desprender la cinta adhesiva que venía adherida a lo largo del pozo, con la finalidad de obtener una herida uniforme. La migración fue monitoreada por microscopio y se obtuvieron imágenes a las 0, 24, 48 y 72 h. El área ocupada por las células que migraron fue calculada en porcentaje con el software Image J. Estos experimentos fueron realizados por triplicado biológico.

Meta-análisis *in silico* de expresión

Los datos de expresión de mir-26a y los mensajeros *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β* fueron obtenidos de The Cancer Genome Atlas (n=424) y fueron normalizados con la herramienta *deseq2* (paquete Bioconductor). Los datos de muestras tumorales fueron comparados contra 41 datos de tejidos normales. Cabe señalar que mir-26a está codificado en dos *loci*, mir-26a1 está localizado en el cromosoma 3 dentro del gen *CTDPSL* y mir-26a2 está en el cromosoma 12 dentro del gen *CTDSP2*. Por otra parte, para la expresión de las proteínas de PTEN, Rb1, APC, GSK3β, los datos proteómicos basados en la intensidad del anticuerpo fueron obtenidos de The Human Protein Atlas; la intensidad de la tinción fue comparada entre todos los datos de tejidos tumorales y sanos.

Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

Con el fin de investigar si HIF-1α se une al promotor de los genes *CTDSPL* y *CTDSP2* se realizaron ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (Merck, Millipore, 17-295). Se sembraron 1×10^6 células por cada grupo experimental (dos grupos experimentales, normoxia e hipoxia) en acarreadores de 60mm y un grupo fue tratado con CoCl_2 por 24 horas para inducir hipoxia. Con la finalidad de mantener la unión proteína-DNA, las células fueron fijadas con 1% de formaldehído por 10 minutos a 37° C; después fueron lisadas y sonicadas

con sonicador manual por 4 ciclos de 10 segundos c/u con un 30 % de intensidad obteniendo fragmentos de DNA de entre 200 a 1000 pares de bases. El DNA fragmentado fue incubado con el anticuerpo de HIF-1 α (Abcam, 8312) por 12 horas y posteriormente se realizó la inmunoprecipitación mediante perlas de agarosa Proteína A/DNA de esperma de salmón por una hora a 4° C. La unión Proteína-DNA fue removida agregando 1 μ l de NaCl 5M e incubando la muestra a 65 ° C por 4 horas. El DNA fue purificado por el método de Fenol-cloroformo y sometido a PCR punto final con el kit Green Go taq (Promega) utilizando los oligonucleótidos para el promotor de *CTDSPL* y *CTDSP2* respectivamente. Este experimento solo fue realizado una sola vez.

Análisis estadísticos

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. Los asteriscos muestran los siguientes niveles de significancia *=p<.05, **=p.01, ***=p<.001

III. Resultados

1. Mir-26a se encuentra sobreexpresado en líneas celulares derivadas de CCR

Con la finalidad de conocer el nivel de expresión de mir-26a en células de CCR, se midió su expresión y la de sus respectivos genes blanco en líneas celulares HCT116, SW480 y SW620, correspondientes a los estadios I, III y metastásico de CCR respectivamente; la línea celular inmortalizada no tumoral CRL1790 fue usada como control. Se encontró un ligero incremento en el nivel de expresión de mir-26a en la línea celular HCT116 sin mostrar diferencia significativa, sin embargo, en las células SW480 y SW620 se observó un alto nivel de expresión de este miRNA, de cuatro y siete veces más ($p < .001$) respectivamente comparada con las células control (Figura 19a). En contraste, los mensajeros de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3 β* se encontraron disminuidos en las células derivadas de CCR, donde dicha disminución resulta más evidente en SW480 y SW620 correspondientes al estadio III y metastásico, correlacionando directamente con la sobreexpresión de mir-26a (Figura 19b).

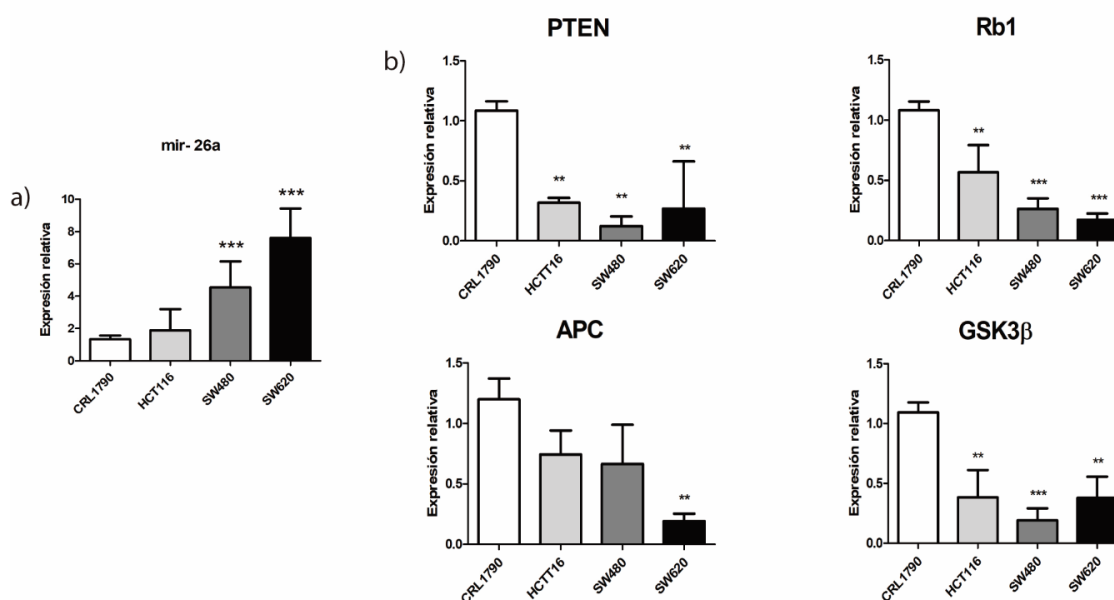


Figura 19. mir-26a se encuentra sobrepresado en líneas celulares derivadas de CCR. a) Expresión relativa de mir-26a normalizada con la expresión de RNU6b b) y sus genes blancos (PTEN, Rb1, APC y GSK3 β normalizados con la expresión de GAPDH). *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

Aunque el nivel de proteína de PTEN, APC y GSK3 β en CRL1790 fue menor comparado con el observado en sus respectivos transcritos, se detectó que en las tres líneas celulares derivadas de CCR, la detección de las proteínas muestra una correlación inversa con los niveles de expresión de mir-26a, para el caso de GSK3 β y PTEN se detectó una disminución gradual (Figura 20) correlacionando totalmente con el incremento gradual de mir-26a; por otra parte, los niveles de proteína de APC son completamente abatidos en SW480. Sin embargo, Rb1 no mostró ningún cambio en la proteína a diferencia de la disminución gradual observada en su RNAm, sugiriendo que mir-26a regula únicamente a nivel de RNAm a *Rb1* o que la vida media de la proteína Rb1 enmascarando esta posible regulación.

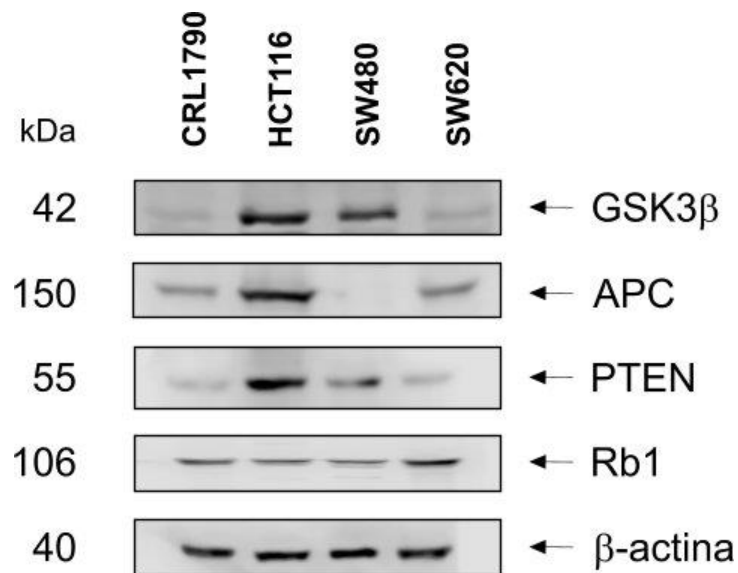


Figura 20. Proteínas blanco de mir-26a se encuentran disminuidos en líneas celulares de CCR.

2. *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β* son regulados directamente por mir-26a

Para confirmar si mir-26a regula directamente los RNAm de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β*, se utilizó el plásmido p-MIR-Report en donde fue clonada la región 3' UTR específica de interacción (obtenido por medio de los algoritmos bioinformáticos microRNA.org y TargetScan) río abajo del gen de luciferasa usado como reportero, generando 4 construcciones distintas: p-PTEN, p-Rb1, p-APC y p-GSK3β. HCT116 mostró mejor capacidad para ser transfectada y menor nivel de expresión endógena de mir-26a (Figura 19), por tal motivo se decidió usar HCT116 para analizar esta posible regulación. Las células HCT116 fueron transfectadas con un mimic exógeno de mir-26a y se midió el nivel de expresión del miRNA por qPCR para estandarizar las condiciones de transfección (Figura 21a). Posteriormente, se co-transfectaron las construcciones de luciferasa, el mimic y sus respectivos controles por 48 horas, dando como resultado una reducción en los niveles de luminiscencia de p-PTEN ($p < .001$), p-Rb1 ($p < .05$), p-APC ($p < .01$) y p-GSK3β ($p < .05$) del 74%, 45%, 40.5% y 67% respectivamente (Figura 21b) comparado con el plásmido vacío. Estos hallazgos indican que mir-26a puede unirse a la región 3' UTR de estos genes blanco.

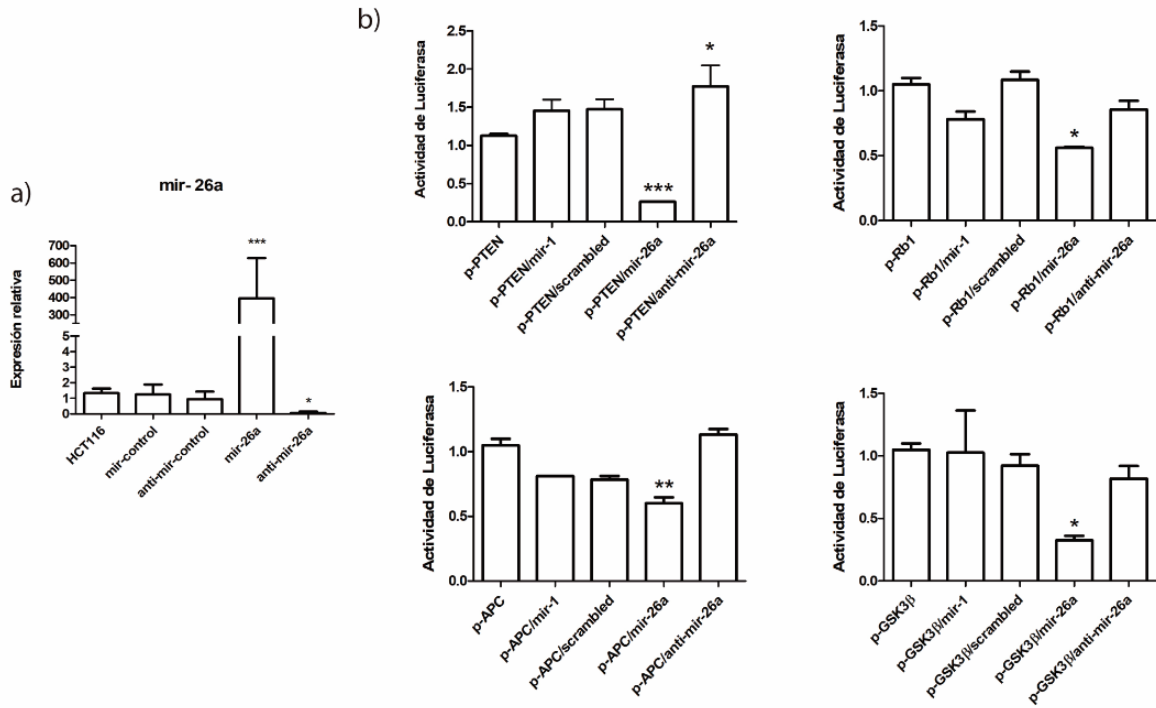


Figura 21. mir-26a se une a la región semilla de sus genes blancos. a) Transfección de mir-26a en la línea celular HCT116 a 24 horas, b) actividad relativa de luciferasa en células HCT116 co-transfectadas con el vector pmir-Report y mir-26a, *=p<.05, **=p.01, ***=p<.001

Para clarificar el efecto que ejerce mir-26a sobre sus genes blanco, se modificó la expresión de mir-26a en HCT116, SW480 y SW620 mediante la transfección de su mimic y su respectivo inhibidor. Se observó un mejor efecto de transfección en HCT116 ($p < .001$) y SW480 ($p < .001$) (Figura 22), debido a esto, los experimentos se realizaron solo en estas líneas celulares.

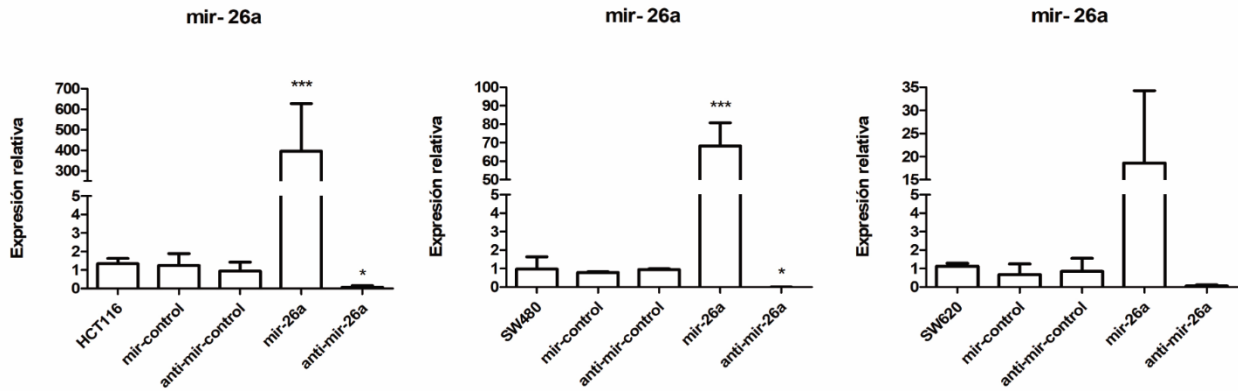


Figura 22. Transfección del mimic de mir-26a y su respectivo inhibidor en líneas celulares derivadas de CCR (HCT116, SW480 Y SW620) *=p<.05, **=p.01, ***=p<.001

Se midió la expresión de los RNAm de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β* por qPCR. En HCT116, se encontró que la sobreexpresión de mir-26a afecta directamente la expresión de todos sus genes blanco al reducir sus niveles en más de un 50%, sin embargo, al utilizar el inhibidor de mir-26a solamente se observó un ligero incremento en la expresión de *PTEN*, los demás RNAm no se vieron afectados por la acción del anti-mir-26a (Figura 23).

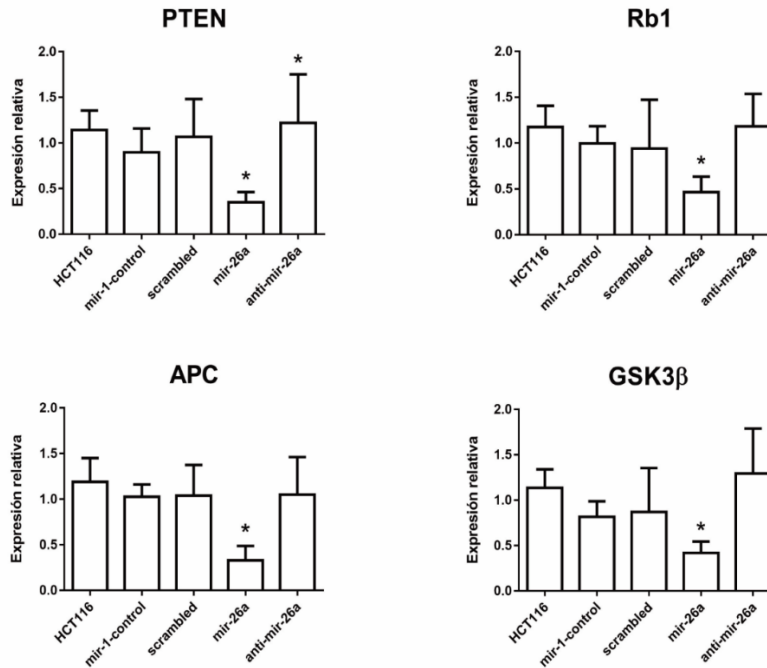


Figura 23. Expresión relativa de PTEN, Rb1, APC y GSK3β cuantificada por qPCR, en la línea celular HCT116 (carril 1) transfectadas con las moléculas control (carril 2 y 3) mimic de mir-26a (carril 4) y su respectivo inhibidor (carril 5), *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

Por otra parte, en la línea celular SW480 el mimic-mir-26a solamente afectó significativamente la expresión de *GSK3β* y *PTEN*, a diferencia de HCT116 donde todos los RNAm fueron afectados por el mimic. Sorpresivamente, en esta línea celular la inhibición de este microRNA generó incremento significativo en *PTEN*, *Rb1* y *APC* (Figura 24), sugiriendo que mir-26a actúa sobre los RNAm de manera distinta dependiendo el linaje celular y estadiaje de CCR.

En cuanto a la expresión a nivel de proteína, se observó que el aumento de mir-26a promueve la disminución en la expresión de Rb1, PTEN y GSK3β en HCT116, sin embargo, la regulación ejercida por este microRNA sobre sus blancos transcripcionales fue distinta en la línea celular SW620 (Figura 25), la sobreexpresión de mir-26a disminuyó únicamente a PTEN

y no tuvo efecto alguno en las demás proteínas: sugiriendo que mir-26a ejerce un efecto totalmente dependiente de la línea celular sobre sus genes blanco.

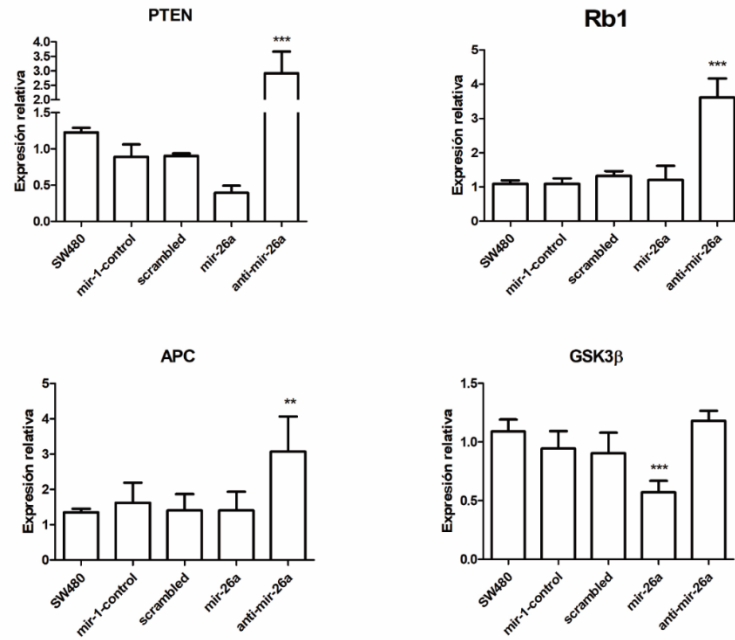


Figura 24. Expresión relativa de *PTEN*, *Rb1*, *APC* y *GSK3β* cuantificada por qPCR, en la línea celular SW480 (carril 1) transfectadas con las moléculas control (carril 2 y 3) mímico de mir-26a (carril 4) y su respectivo inhibidor (carril 5) *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

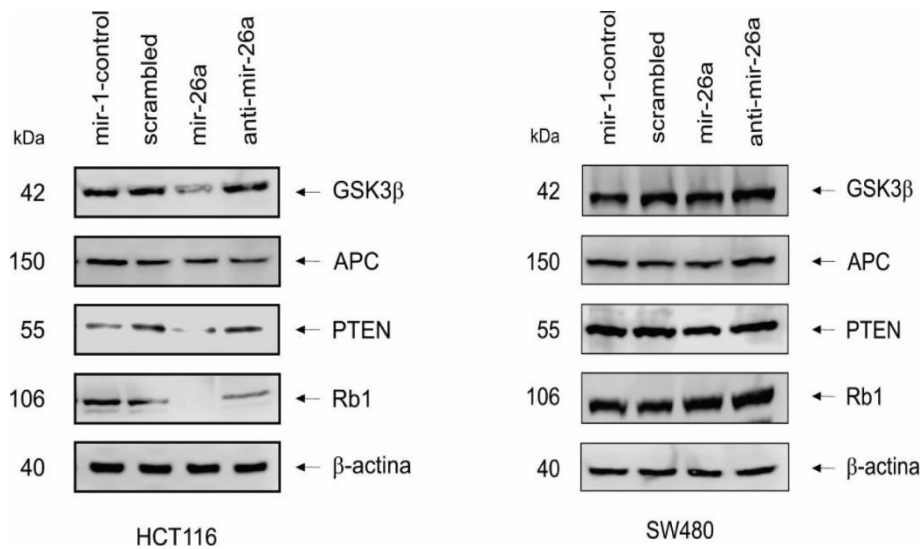


Figura 25. Detección de PTEN, Rb1, APC y GSK3β en células HCT116 y SW620 transfectadas con mir-26a y su respectivo inhibidor

Inesperadamente, en los ensayos de western blot, no se encontró diferencias en la expresión de la proteína APC en ambas líneas celulares (Figura 25), por lo que se desarrolló una serie de experimentos, con la finalidad de explicar que estaba sucediendo con esta proteína. El primer experimento consistió en detectar a APC a las 12, 24 y 48 horas de transfección, no se encontró diferencias en el nivel de expresión en ninguno de los grupos experimentales, sugiriendo que mir-26a no afecta a APC (Figura 26a). Para corroborar el resultado obtenido en los experimentos de luciferasa y descartar un posible error sobre la regulación ejercida por mir-26a (Figura 21b), esta vez, se clonó en el plásmido reportero p-MIR-Report la región completa 3' UTR de *APC* y *de Rb1* (seleccionado al azar), estas construcciones fueron co-transfectadas con el mimic de mir-26a. Se encontró disminución significativa en la actividad de luciferasa en el grupo p-Rb1- FL ($p < .05$) (Figura 26b), siendo consistente con el resultado obtenido previamente al clonar únicamente la región de interacción con mir-26a. Sin embargo, en el grupo p-APC-FL, al ser transfectado con mir-26a, no hubo disminución de la actividad de luciferasa comparada la construcción que contiene la región específica de interacción APC-mir-26a (Figura 21b), estos resultados sugieren que la interacción no se está llevando a cabo cuando la región 3' UTR se encuentra completa. Posteriormente, se utilizó el algoritmo mFold Web Server (Zuker, 2003) para modelar la estructura secundaria de la región 3' UTR de *APC* con la finalidad de localizar el sitio de interacción de mir-26a en un modelo bidimensional (Figura 26d). Se encontró que la región de interacción en la 3 UTR de *APC* (que va del nucleótido 1237 al 1256) (Figura 26c) se encuentra formando una estructura de tallo (doble cadena), lo que dificultaría la interacción con mir-26a (indicado con color rojo), debido a que los nucleótidos no están libres para formar enlaces con el miRNA (Figura 26e). Además, el modelo bidimensional sugiere que el par de nucleótidos A-U ubicado en la estructura de Asa indicados con color verde, pueden interactuar entre si formando una

estructura de pseudoknot, evitando la entrada de mir-26a a la región de interacción (Figura 26e). Con los resultados obtenidos, se sugiere que mir-26a no regula a APC, pero regula directamente a *PTEN*, *Rb1* y *GSK3β* en líneas celulares derivadas de CCR.

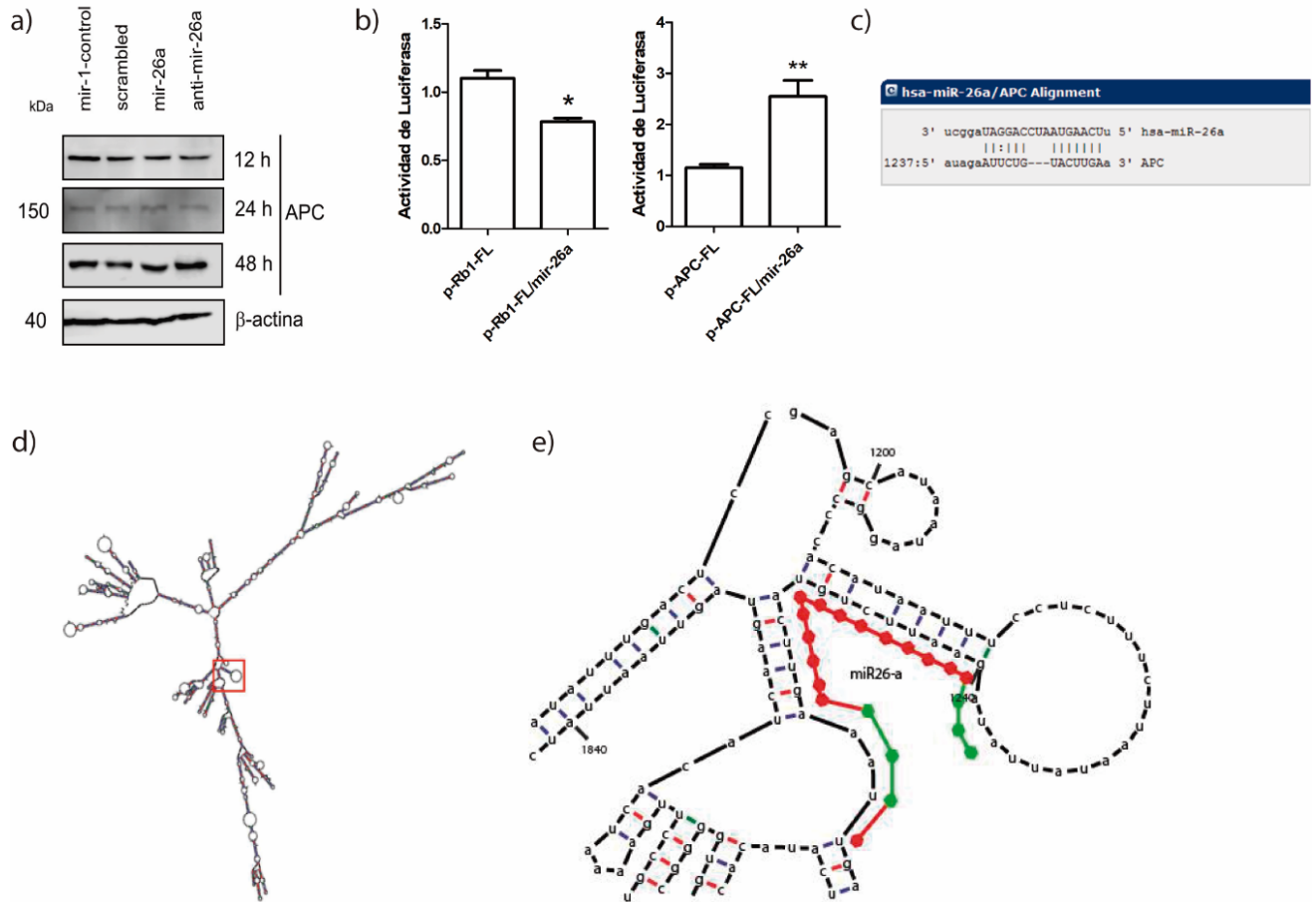


Figura 26. APC no es regulado por mir-26a en líneas derivadas de CCR. a) Detección de APC en células HTC116 transfectadas con mir-26a, b) Actividad de luciferasa de plásmido reportero clonado con la región 3' UTR full de los genes *APC* y *Rb1*, respectivamente co-transfectado con mir-26a, c) Región de interacción mir-26a-APC obtenida del algoritmo mirdb (Griffiths-Jones et al., 2007) y Targetscan (V. Agarwal et al., 2015), d) Estructura secundaria de la región 3' UTR de *APC*, e) Acercamiento de la región de 3' UTR que interactúa con mir-26a, *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

3. mir-26a promueve la proliferación sostenida y potencia la migración en la línea celular HCT116

Dado que las proteínas PTEN, Rb1 y GSK3 β son reguladores negativos de proliferación y migración, hipotetizamos que la sobreexpresión o inhibición de mir-26a afectaría estos procesos. Usamos la técnica de MTT (Figura 27a) y el sistema xCELLingence RTCA (Figura 27b) para medir la proliferación en cada grupo experimental. La sobreexpresión de mir-26a mostró un incremento significativo ($p < .01$) en la proliferación de las células HCT116 con la técnica de MTT, sin embargo, con el sistema xCELLingence no hubo diferencias significativas con respecto al incremento de la proliferación. Sorpresivamente, el dato más significativo lo encontramos al inhibir mir-26a, la proliferación se redujo más del 50% ($p < .01$), sugiriendo que la expresión de mir-26a no incrementa la proliferación celular, pero es necesaria para mantenerla activa. Por otra parte, el proceso de migración fue evaluado con la técnica de cierre de la herida y el sistema xCELLingence RTCA. Encontramos que la transfección de mir-26a promueve el cierre de la herida medido por 72 horas ($p < .01$) (Figura 27c) y en el sistema xCELLingence se detectó un incremento en la migración a partir de las 24 horas ($p < .05$) (Figura 27d). La transfección con el inhibidor de mir-26a no mostró ningún efecto en la migración. De esta manera, demostramos que en CCR mir-26a es necesario para mantener activa la tasa de proliferación y promover la migración.

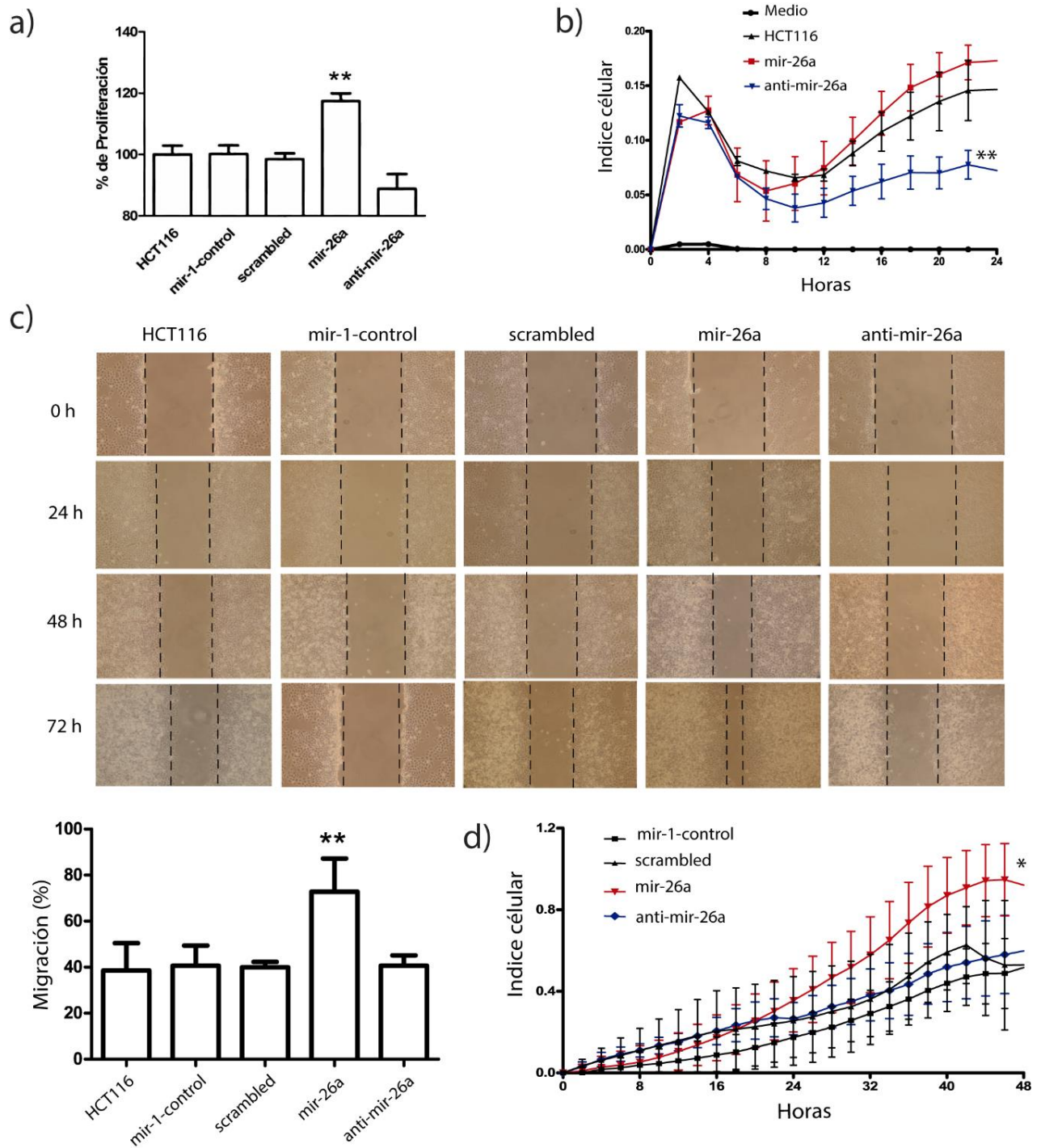


Figura 27. miR-26a promueve la proliferación sostenida y potencia la migración celular en líneas derivadas de CCR. a) Ensayo de proliferación celular por MTT, b) Ensayo de proliferación celular monitoreado con el equipo xCELLingance, c) Ensayo de cierre de la herida para migración celular, d) Migración celular monitoreada con el equipo xCELLingance. Las evaluaciones estadísticas para los datos obtenidos del sistema xCELLingance fueron calculados con el área bajo la curva, para el MTT y el ensayo de cierre de la herida se utilizó ANOVA *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

Se ha reportado que la proteína GSK3 β bloquea la proliferación descontrolada de las células tumorales al regular la fosforilación de β -catenina, marca necesaria para su degradación vía proteasoma. En los resultados presentados previamente, observamos que mir-26a potencia la proliferación, posiblemente por la regulación que mir-26a ejerce sobre GSK3 β . Con la finalidad de validar esta hipótesis, se utilizó el vector reportero TOP/Flash, vector que permite medir la actividad de la vía Wnt/ β -catenina mediante la emisión de luminiscencia, a mayor actividad, mayor emisión de luminiscencia (J. Wang et al., 2013) (R. Li, Quan, & Xia, 2018). Para probar la funcionalidad del vector TOP/Flash, las células HCT116 fueron tratadas con PNU-7.4654 un inhibidor farmacológico de la vía Wnt. Observamos disminución en la emisión de luminiscencia con la concentración de 100 μ M (Figura 28a) ($p < .001$), mostrando que el vector TOP/flash funcionaba de manera correcta. Posteriormente, medimos la actividad de la vía Wnt en 3 líneas celulares, encontramos la mayor actividad en la línea celular SW620 (Figura 28b) ($p < .001$), mostrando una correlación positiva con la sobreexpresión de mir-26a (Figura 19a) y la disminución de GSK3 β (Figura 19b). Sin embargo, la transfección del mimic mir-26a y el inhibidor no afectaron la emisión de luminiscencia de manera significativa (Figura 28c), sugiriendo que este miRNA no ejerce ningún efecto sobre la regulación de la vía Wnt/ β -catenina, por lo que la disminución de la proliferación observada en la figura 26b no está relacionada con el eje mir-26a/ GSK3 β / Wnt/ β -catenina.

Debido a que la transfección de mir-26a no favoreció la actividad de la vía Wnt, hipotetizamos que el aumento de la proliferación y la migración se debía a un desbalance de la vía de señalización PI3K-AKT dado que PTEN es regulado por mi-26a, entonces, decidimos evaluar la fosforilación Thr308 de la proteína AKT, -estado activo de AKT-

Observamos que la sobreexpresión de mir-26a incrementa los niveles de la fosforilación Thr308 de AKT en HCT116 y SW480 sin afectar los niveles AKT basal (Figura 28d), sugiriendo que el aumento en la proliferación y migración se deben a la activación de la vía PI3K/AKT, resultado de la disminución de PTEN vía mir-26a.

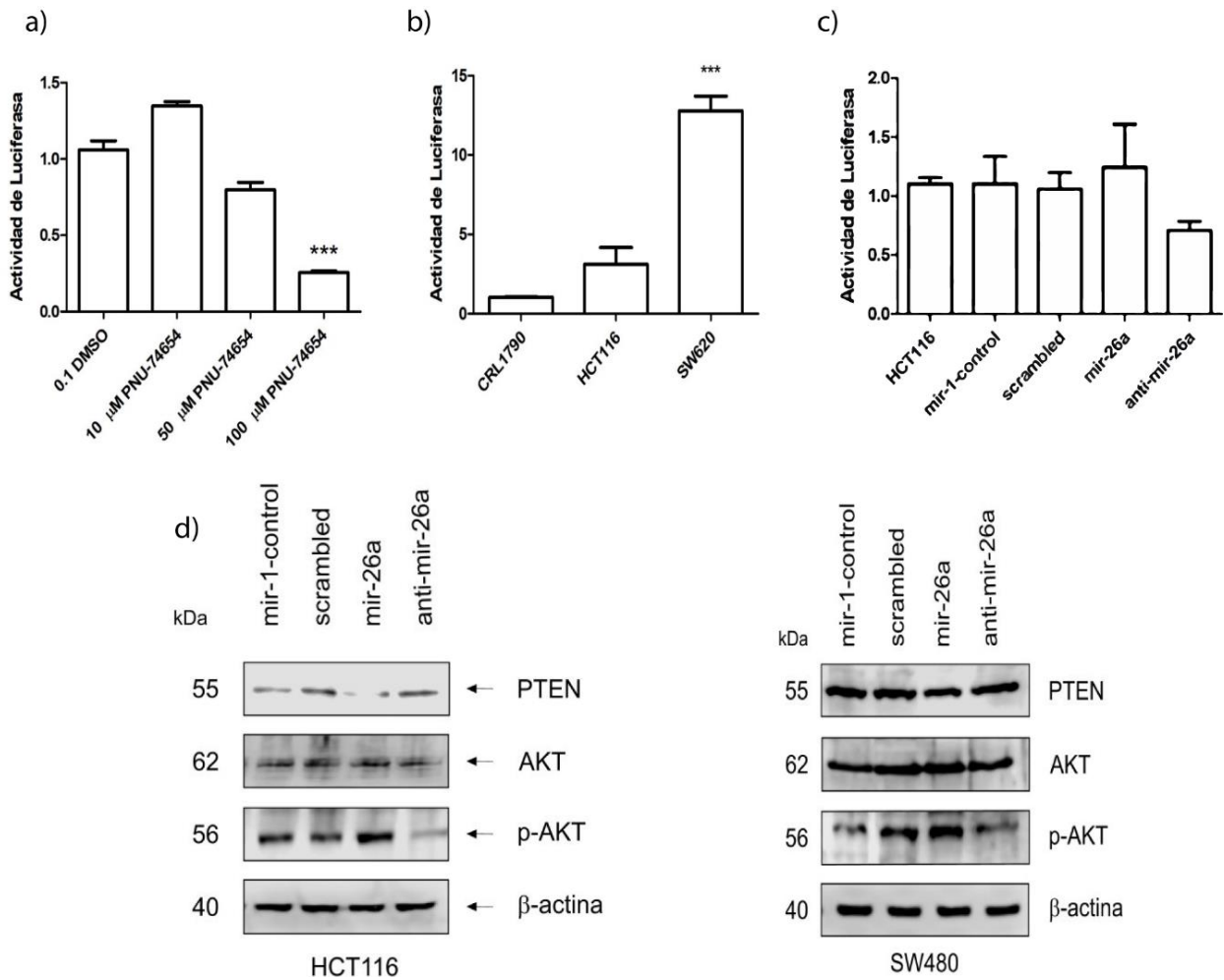


Figura 28. La proliferación y migración celular en CCR es regulado por el eje mir-26a/PTEN/AKT. a) Actividad de Luciferasa del vector TOP FLASH en presencia de un inhibidor de la vía Wnt, b) Actividad de la vía WNT en líneas celulares de CCR medida con el vector reportero TOP FLASH y c) en presencia de mimics e inhibidores de mir-26a, d) Detección de PTEN y AKT en las líneas HCT116 y SW620 en presencia de mimics e inhibidores de mir-26a. *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

4. *PTEN*, *GSK3 β* y *Rb1* se encuentran disminuidos en un modelo *in vivo* de CCR

Con la finalidad de corroborar nuestros hallazgos en un modelo *in vivo* de cáncer colorrectal, utilizamos el modelo murino AOM/DSS descrito ampliamente por Tanaka en el 2003 (Tanaka et al., 2003) . En este modelo, el AOM funciona como un agente carcinogénico al inducir la formación de aductos en el DNA. Observamos que después de la primera dosis de DSS aún no se desarrollaban tumores y el aspecto morfológico era similar al del grupo control. Posterior a la segunda dosis de DSS se observó el tejido rojizo debido al proceso inflamatorio, y la formación de los primeros tumores. Pero es hasta la tercera dosis de DSS donde se desarrollaron los tumores (Figura 29a). Se realizaron cortes histológicos de la región media del colon (debido a que en esta zona se observó la mayor cantidad de tumores), fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E) y evaluados con base en el criterio descrito por Riddell et al (1983). En la figura 29b, en la primera imagen, podemos observar la mucosa normal del colon (Grado 0); en la segunda imagen, el tejido corresponde a la primera 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). La tercera imagen corresponde a la segunda dosis de DSS y es evidente la pérdida de la estructura basal de las criptas con leves indicios de inflamación en la mucosa (Grado 2). En la última imagen se puede apreciar la pérdida completa en la morfología de las criptas. La superficie del epitelio mostró una severa inflamación en la mucosa y submucosa, también se observaron lesiones displásicas graves y ulceraciones en la mucosa (Grado 3). Los tumores fueron diagnosticados como adenoma tubular por patólogos del Instituto Nacional de Cancerología. Posteriormente, se midió la expresión relativa de mir-26a. Se observó que durante las primeras dos dosis de DSS no aumentó su expresión de manera significativa, sin embargo, en la 3era dosis de DSS cuando

se sobreexpresó 8 veces ($p < .001$) (Figura 29c). Por otra parte, *GSK3 β* , *PTEN* y *Rb1* disminuyeron desde la 1era dosis de DSS, sugiriendo que existen otros mecanismos de regulación en etapas iniciales del CCR. Fue hasta la 3era dosis de DSS cuando se observó la mayor disminución de estos genes, correlacionando con la sobreexpresión de mir-26a (Figura 29d). Con los resultados obtenidos, se clarificaba la importancia que tiene mir-26a en el desarrollo de CCR en un modelo *in vivo*, al regular a *GSK3 β* , *Rb1* y principalmente a *PTEN*.

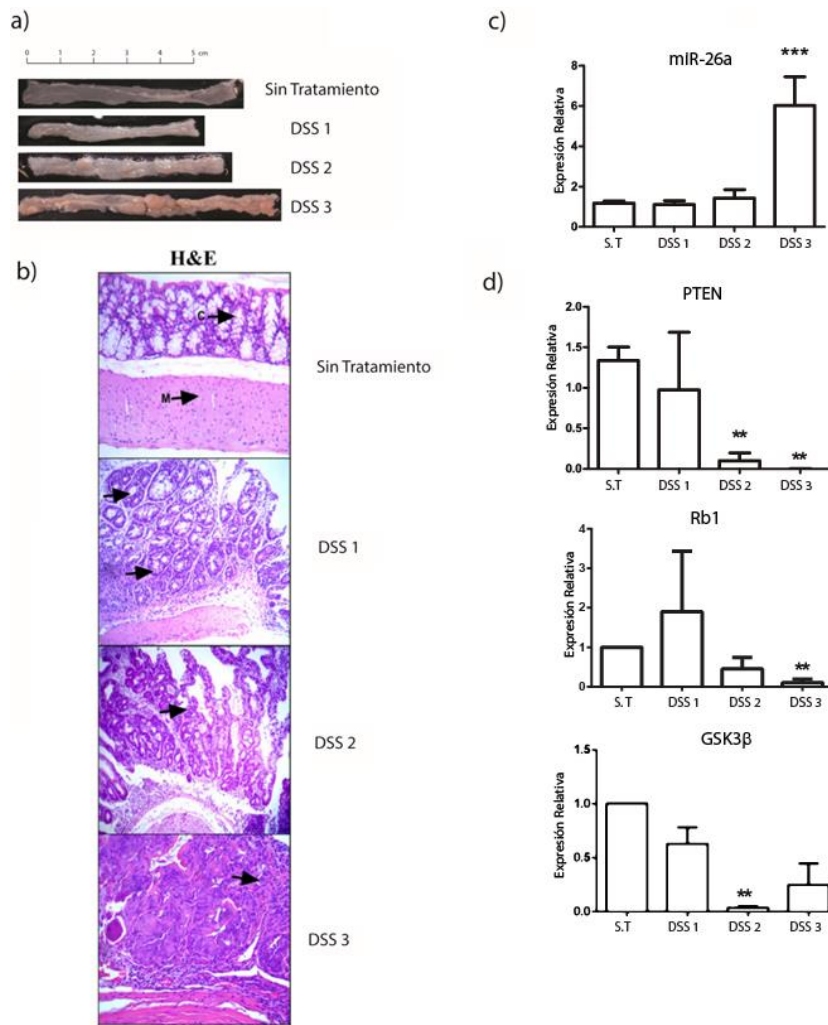


Figura 29. Mir-26a se encuentra sobreexpresado en un modelo *in vivo* de CCR. a) Cortes longitudinales del colon de ratones balb/c tratados con de AOM y diferentes dosis de DSS, b) Cortes histológicas de la región media del colon de los ratones usados en el modelo AOM/DSS, c,d) Expresión de mir-26a y sus respectivos blancos, en el modelo AOM/DSS. *= $p < .05$, **= $p < .01$, ***= $p < .001$

5. Mir-26a se encuentra sobreexpresado en muestras derivadas de pacientes con CCR

Mir-26a está codificado en dos *loci*, mir-26a1 está localizado en el cromosoma 3 dentro del gen *CTDPSL* y mir-26a2 está en el cromosoma 12 dentro del gen *CTDSP2* y estudios previos afirman que mir-26a se encuentra sobreexpresado en pacientes con CCR. Para corroborar estos antecedentes, realizamos una minería de datos utilizando el algoritmo del TCGA (The Cancer Genome Atlas). Encontramos que mir-26a1 y mir-26a2 están sobreexpresados de manera significativa en pacientes con CCR comparado contra tejido sano adyacente. Sin embargo, no existe diferencia en la expresión de mir-26a al ser comparado entre cada uno de los distintos estadios del CCR (Figura 30a), sugiriendo que el incremento de mir-26a se da en etapas iniciales de esta neoplasia. Por otra parte, la expresión de *Rb1* y *GSK3β* no mostraron diferencias entre el tejido sano y el tejido tumoral, siendo *PTEN* el único mensajero que disminuyó (Figura 30b) y que tiene una correlación negativa con respecto a la expresión de mir-26a. Para comparar los resultados obtenidos de la minería de datos, medimos la expresión de mir-26a y sus blancos, ahora en tejidos embebidos en parafina provenientes de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (Tabla 5, apartado de Anexos) y encontramos que mir-26a se encuentra sobreexpresado ($p < .05$) y el único RNAm que se encuentra disminuido es *PTEN* (Figura 30c).

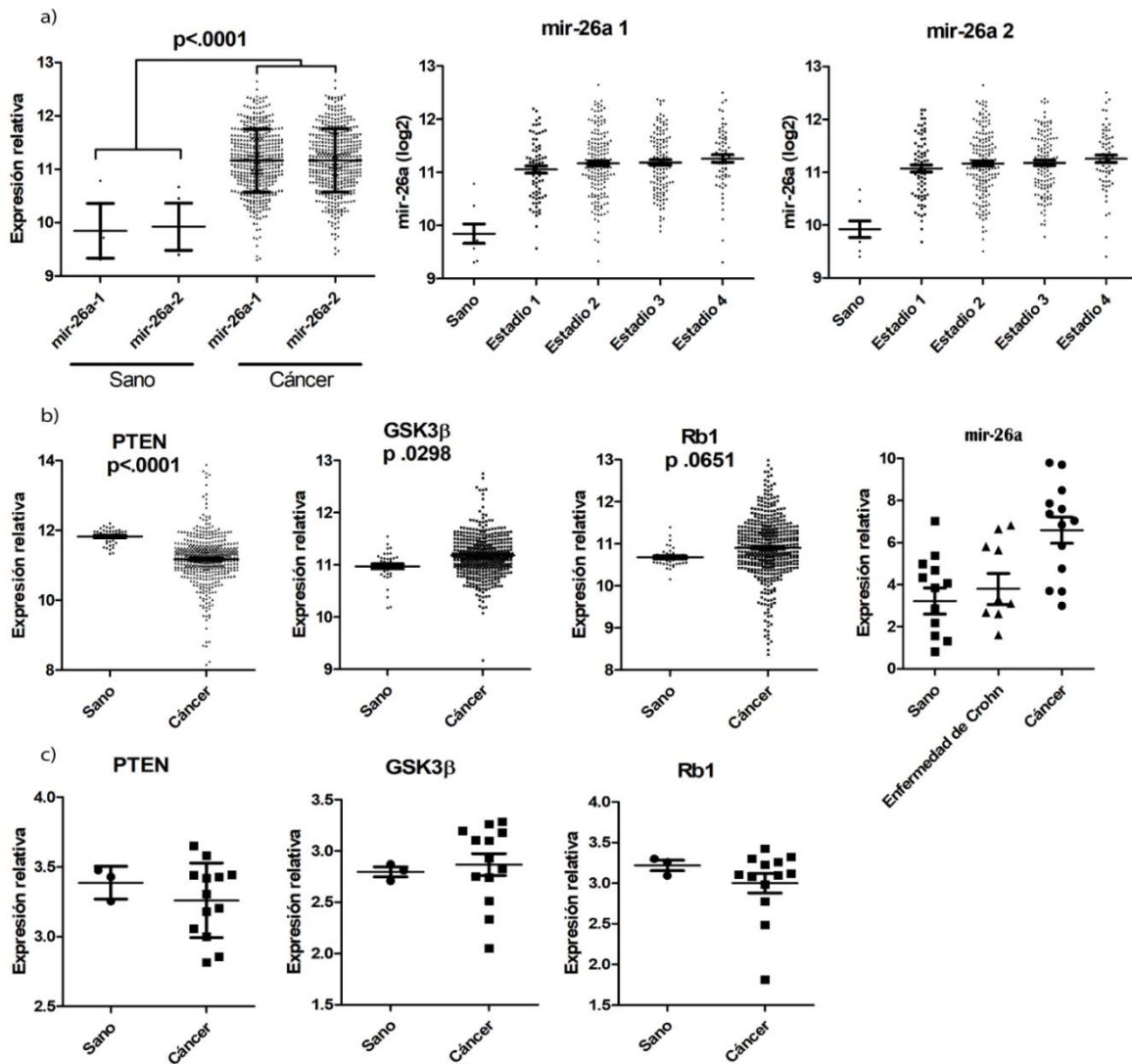


Figura 30. mir-26a se encuentra sobreexpresado en muestras de pacientes con CCR y en datos obtenidos del TCGA. a) Expresión de mir-26a-1 y mir-26a-2 en muestras tumorales y diferentes estadios del CCR b) expresión de genes blancos de mir-26a en muestras de TCGA y c) de pacientes con CCR obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología. *= $p < .05$, **= $p = .01$, ***= $p < .001$

Además, al realizar la minería de datos en el algoritmo “The Human Protein Atlas”, observamos que PTEN disminuye más del 80% de su detección en cáncer, mientras que en GSK3 β y Rb1 la disminución es del 60% y 20% respectivamente (Figura 31). Estos resultados sugieren que los efectos de mir-26a en la progresión del CCR podrían deberse

principalmente a la regulación que ejerce sobre PTEN. Sin embargo, aun desconocíamos la razón por la que mir-26a se sobrepresaba.

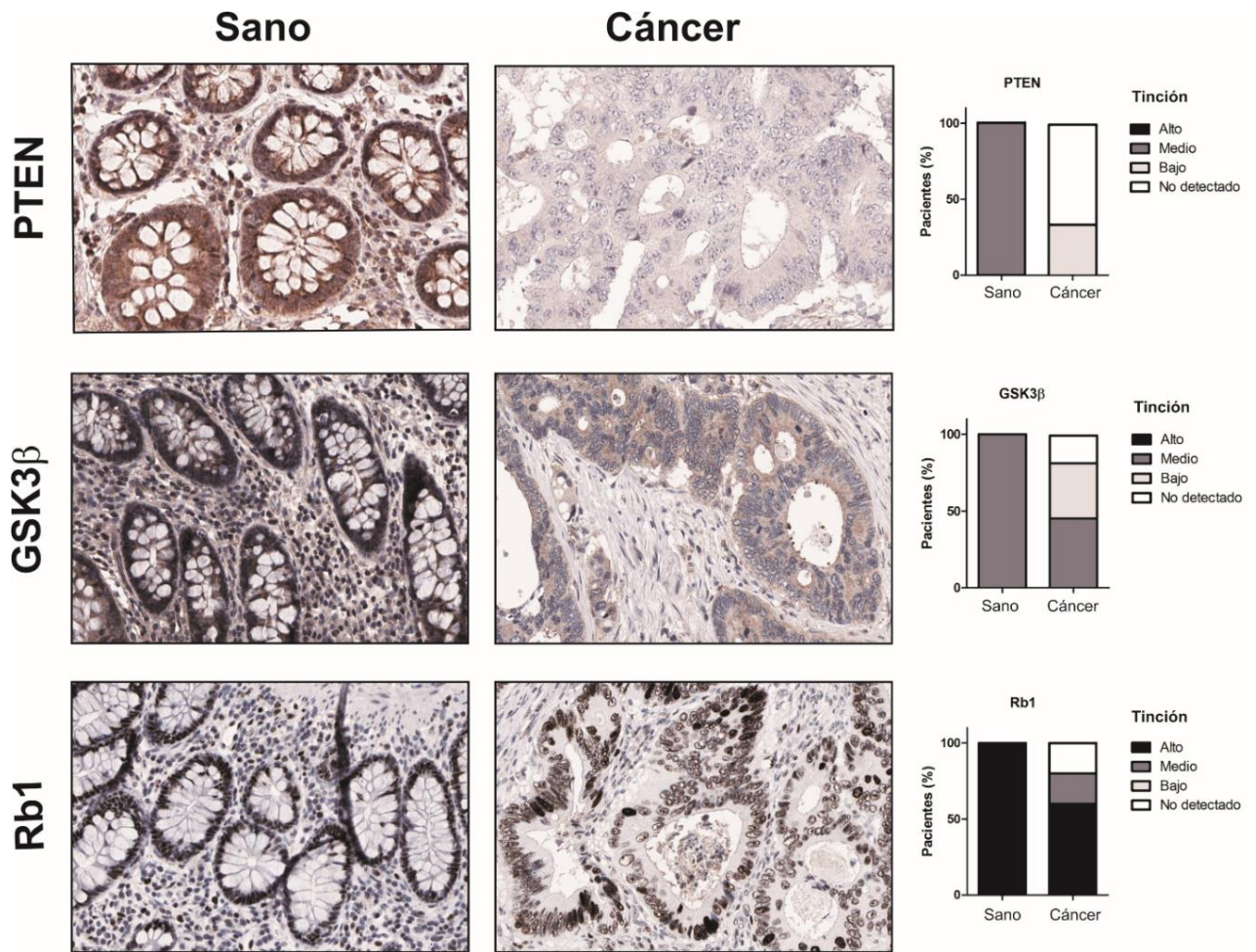


Figura 31. PTEN, GSK3 β y Rb1 se encuentran disminuidos en muestras de pacientes tomadas de “The Human Protein Atlas”¹

6. HIF-1 α regula la transcripción de mir-26a en CCR

Con la intención de dilucidar el mecanismo de sobreexpresión de mir-26a, decidimos analizar la secuencia promotora de los genes donde se encuentra codificado mir-26a. Encontramos que los promotores de *CTDSPL* y *CTDSP2* poseen secuencias tipo HRE (elemento de respuesta a hipoxia), las cuales pueden ser reconocidas por el factor de transcripción si HIF-1 α , este último se encuentra sobreactivado en CCR, sugiriendo que el aumento en la actividad de HIF-1 α podría ser la responsable de la sobreexpresión de mir-26a. Para abordar esta hipótesis, estabilizamos a HIF-1 α con CoCl₂, un descrito inductor de hipoxia ampliamente descrito. Utilizamos 50, 100, 250 y 500 μ M de CoCl₂ (Figura 32a) y observamos que la concentración de 250 μ M fue la mejor para estabilizar a HIF-1 α . Se midió la expresión de *Glut1* (un blanco conocido de HIF-1 α) (Figura 32b) con la finalidad de validar la eficiencia de nuestro modelo, se detectó que con 250 μ M *Glut1* aumentaba significativamente su expresión ($p < .00$), corroborando la eficiencia del CoCl₂. Encontramos que *PTEN* disminuía significativamente ($p < .001$) (Figura 32c) y mir-26a aumentaba (Figura 32d) su expresión cuando las células eran estimuladas con CoCl₂, sin embargo, no fue significativo, por lo que se utilizó otro modelo para validar nuestra hipótesis.

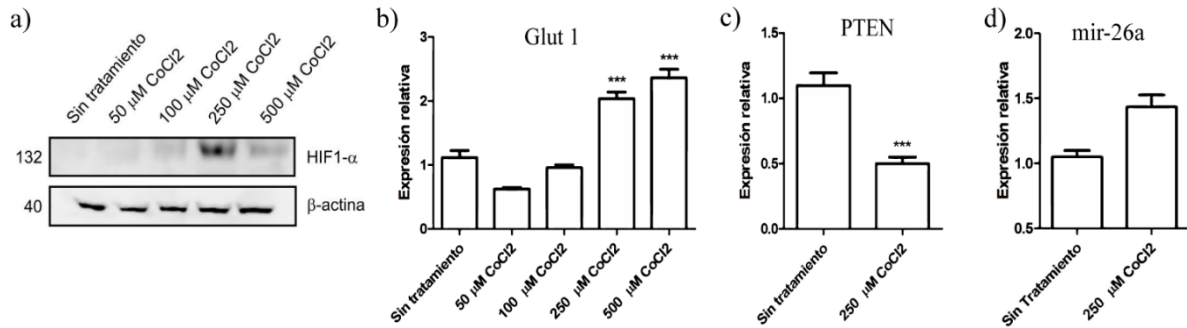


Figura 32. HIF-1 α regula directamente la expresión de mir-26a en CCR. a) Tratamiento de CoCl₂ induce la estabilidad de HIF-1 α , b) Expresión de *Glut1*, blanco conocido de HIF-1 α , c) Expresión de *PTEN* y d) mir-26a al ser tratados con CoCl₂ para estabilizar a HIF-1 α *= p <.05, **= p .01, ***= p <.001

Posteriormente, seleccionamos un inductor de hipoxia de origen comercial, el DMOG (Dimethylxaloylglycine) un inhibidor de las prolin-hidroxilasas. Titulamos el DMOG y obtuvimos a 500 μ M la mayor eficiencia en la estabilidad de HIF-1 α (Figura 33a,33b). Los resultados obtenidos fueron similares a los anteriormente descritos, disminución en la expresión de *PTEN* (Figura 33c) y sobreexpresión significativa de mir26a (p <.001) (Figura 33d), sugiriendo que la sobreexpresión de mir-26a está relacionada directamente con la estabilidad de HIF-1 α .

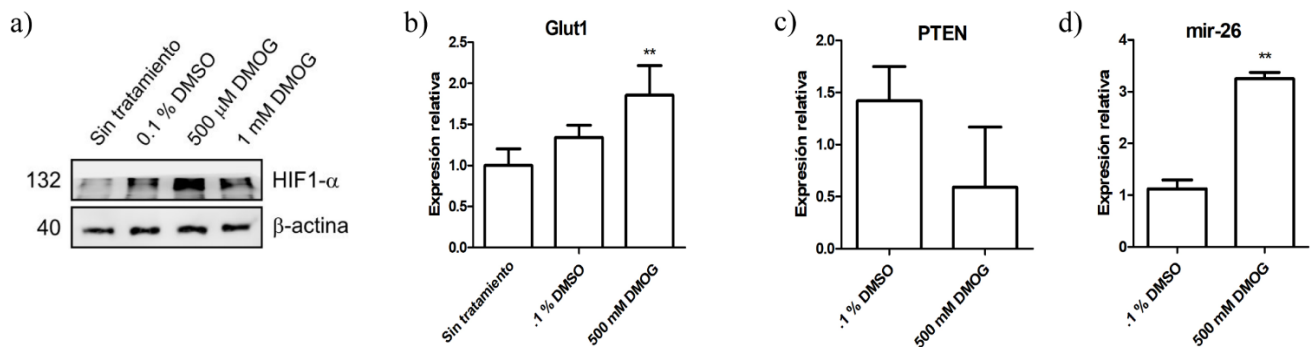


Figura 33. HIF-1 α regula directamente la expresión de mir-26a en CCR. a) Tratamiento con DMOG induce la estabilidad de HIF-1 α , b) Expresión de *Glut1*, blanco conocido de HIF-1 α , c) Expresión de *PTEN* y d) mir-26a al ser tratados con DMOG para estabilizar a HIF-1 α *= p <.05, **= p .01, ***= p <.001

Aunque la expresión de mir-26a aumentó cuando se indujeron condiciones de hipoxia con CoCl₂ y DMOG respectivamente, solo existía una asociación entre mir-26a y HIF-1 α . Por lo que decidimos hacer un experimento que demostrara de manera física la interacción entre HIF-1 α y el promotor de mir-26a. Utilizamos la técnica ChIP para inmunoprecipitar al factor de transcripción HIF-1 α y se realizaron PCRs contra el promotor de mir-26a1 y mir-26a2. Encontramos que HIF-1 α únicamente se encontraba interactuando con el promotor de mir-26a1 y existía un enriquecimiento cuando las células eran sometidas a condiciones de hipoxia (Figura 34).

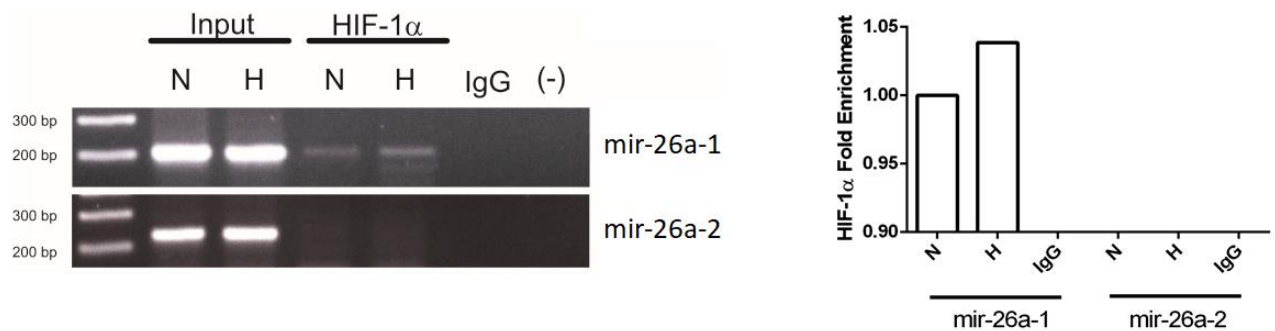


Figura 34. HIF-1 α se encuentra ocupando la región promotora de mir-26a-1 en CCR. HIF-1 α al ser inmunoprecipitado mostró un enriquecimiento en la región promotora del gen *CTDSPL*, correspondiente a mir-26a-1, además, el enriquecimiento aumentó en condiciones de hipoxia

Este hecho demuestra que en líneas celulares derivadas de CCR, HIF-1 α sobrexpresiona a mir-26a, promoviendo un incremento en la capacidad metastásica y manteniendo la proliferación constante de estas células al regular negativamente a *PTEN* (Figura 35).

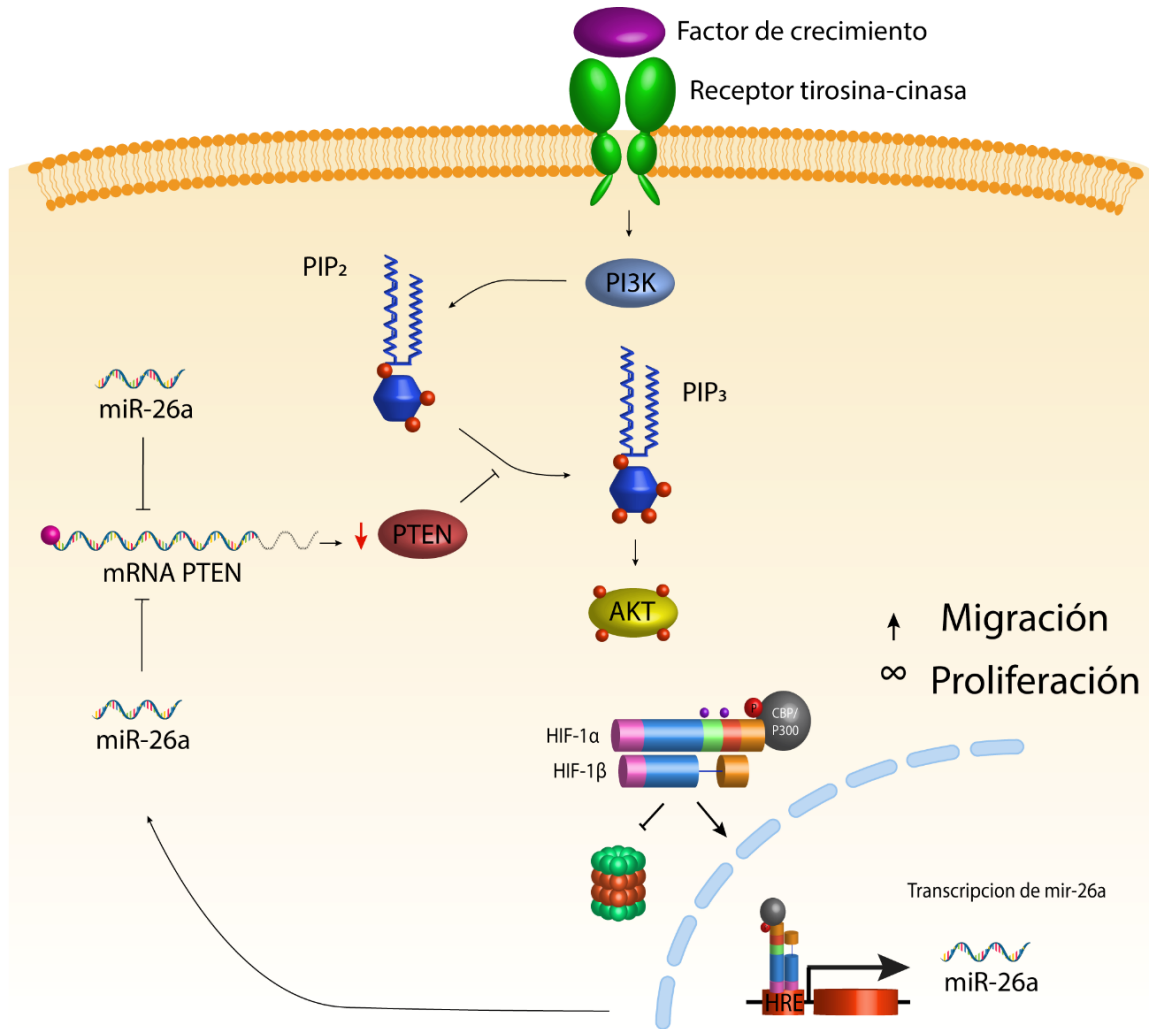


Figura 35. Mir-26a, regulador post-transcripcional asociado al desarrollo de cáncer colorrectal. El factor de transcripción HIF-1 α incrementa su actividad durante el desarrollo del cáncer colorrectal promoviendo la sobreexpresión de mir-26a, afectando la expresión de la proteína supresora de tumores *PTEN*. Este evento mantiene proliferativa a las células tumorales y promueve la migración de estas.

IV. Discusión

En este estudio, encontramos que mir-26a se sobreexpresa en tejido derivado de pacientes con CCR, líneas celulares derivadas de CCR (SW480 y SW620) y datos de pacientes con CCR obtenidos de la base “The Cancer Genome Atlas”. Además, encontramos que la expresión de mir-26a se encontraba elevada en un modelo *in vivo* de CCR químicamente inducido por AOM/DSS. Por otra parte, cuando mir-26a fue transfectó en las líneas celulares HCT116 (las que no tenían expresión significativa de mir-26a), la tasa de proliferación se mantuvo y potenció la migración, probablemente debido a la regulación ejercida sobre el transcrito de PTEN y su efecto en la ruta de señalización de AKT.

La importancia de la regulación negativa de PTEN ejercida por mir-26a, reside en la falta de actividad de la fosfatasa, lo que significa un aumento en la fosforilación de los blancos de PTEN. Demostramos que el nivel de fosforilación de AKT (un blanco por excelencia de PTEN) incrementó cuando las células fueron tratadas con el mimic de mir-26 y viceversa, disminuyó cuando mir-26a fue abatido con el inhibidor. Notablemente, los niveles de la proteína AKT en estado basal no disminuyeron, siendo específico el efecto sobre la regulación en la fosforilación de AKT debido a la disminución de PTEN. Este evento molecular ha sido descrito en otros escenarios: cáncer de pulmón (Liu et al., 2012) , glioblastoma (Guo et al., 2013)(Huse et al., 2009) y queratinocitos inmortalizados (Yu et al., 2016).

PTEN posee un papel fundamental como regulador negativo de la supervivencia celular y migración. Varios estudios han demostrado que la pérdida o la disminución en la expresión de PTEN contribuye al desarrollo del cáncer colorrectal y al desarrollo agresivo de la

metástasis (Fan et al., 2018)(Colangelo et al., 2013); A su vez, la vía PI3K-AKT, la cual es negativamente regulada por PTEN, se encuentra hiper-activada en varios tipos de cáncer. (Nip et al., 2016)(L. Lin, Zhang, Zhang, Wang, & Wang, 2015)(Divolis, Mavroei, Mavrofrydi, & Papazafiri, 2016) debido a la pérdida de función de PTEN. Sin embargo, el mecanismo que permite la pérdida de funciones de PTEN aún es controversial. Lin y colaboradores (P.-C. Lin et al., 2015) han identificado mutaciones puntuales e hipermetilación en el promotor de PTEN en el 40% de pacientes con cáncer colorrectal, sin embargo, no identificaron algún otro mecanismo para el porcentaje restante de pacientes que también mostraban disminución de PTEN. Otro estudio mostró que la hipermetilación de PTEN ocurre solamente en el 20% de los tumores colorrectales (Goel et al., 2004), indicando que hay más de un mecanismo epigenético involucrado en la regulación negativa de la fosfatasa.

Varios grupos de investigación han encontrado que el mensajero de PTEN está sujeto a regulación por miRNAs; por mir-4534 en cáncer de próstata (Nip et al., 2016) y mir-29a en cáncer de mama (Shen et al., 2016). Huse y colaboradores (Huse et al., 2009) fueron capaces de demostrar que mir-26a regula e induce la degradación de PTEN en muestras de glioblastoma de alto grado y Liu demostró que la sobreexpresión de mir-26a potencia el proceso de migración e invasión en, a través de los ensayos de cierre de la herida y cámara de Boyden. Pero la evidencia para cáncer de pulmón y cáncer colorrectal es aún más interesante; en cáncer de pulmón PTEN es regulado por mir-21 y mir-92 (Ji-guang Zhang et al., 2010)(Ren, Gong, Zhang, Jiang, & Zhang, 2016); mientras que en cáncer colorrectal es también regulado por mir-21 y mir-92 (Y. Wu et al., 2017)(Ke, Wei, Yeh, Chen, & Cheng,

2015), por mir-106b (Zheng et al., 2015) siendo este el primer trabajo que demuestra que también es regulado por mir-26a.

Encontramos la menor expresión de PTEN en la línea celular SW620 e interesantemente, esta línea mostró la mayor expresión de mir-26a. Por otra parte, la línea celular HTC116 que representa a un tumor primario en estadios tempranos (estadio 1 y 2) no mostró correlación entre mir-26a y PTEN, sugiriendo que existe otro mecanismo en la regulación de PTEN. Por ejemplo, hay miRNAs que solo son transcritos en estadios primarios del CCR, tales como mir-32, mir-200c y mir-221/222. Estos miRNAs están altamente expresados en la línea celular HTC116, HT29 y muestras de CCR con clasificación de A de Dukes (W. Wu et al., 2013) (donde HT29 y la clasificación A de Dukes representan estadio 1 de CCR) y se encuentran disminuidos en las líneas SW480, SW620 y en muestras de CCR con clasificación D de Dukes. De esta manera, PTEN es también regulado por estos miRNAs y su sobreexpresión es originada por una mutación de ganancia de funciones de K-RAS, un evento clave en el desarrollo de CCR (Tsunoda et al., 2011). Nuestros datos sugieren que la regulación mir-26a/PTEN tiene lugar en los estadios intermedios de CCR (estadio 2 y 3), ya que la sobreexpresión de mir-26a solo afectó la proliferación y migración de las células HCT116, sin embargo, no afectó estos procesos en las líneas SW480 y SW620. Este hecho podría explicar las variaciones en la expresión de PTEN en las diferentes líneas celulares después de haber sido transfectadas con el mimic e inhibidor de mir-26a.

La inflamación crónica es un proceso clave durante el desarrollo del CCR, debido a que las células activadas por el proceso inflamatorio producen especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, capaces de inducir daño al DNA y mutaciones. Además, en CCR se ha observado que las células del sistema inmune potencian la producción de citocinas y factores de

crecimiento, causando daño oxidativo y silenciamiento epigenético de genes supresores tumorales (Terzić, Grivennikov, Karin, & Karin, 2010). En nuestros resultados, notamos que la expresión de mir-26a se encuentra ligeramente incrementada en pacientes con enfermedad de Chron comparada con el tejido adyacente sano; sin embargo, por el número de pacientes que analizamos, estos resultados no fueron significativos. Pero, la evidencia experimental muestra que la expresión de mir-26a se encuentra elevada en la mucosa del colon en pacientes con colitis ulcerativa y enfermedad de Chron, por lo que ha sido considerado como un excelente biomarcador en ambas enfermedades (Balzola, Bernstein, Ho, & Lees, 2011).

mir-26a ha sido clasificado como un importante regulador pro-oncogenico, la disminución en su expresión impacta directamente a varios procesos del desarrollo tumoral, tales como la proliferación, senescencia celular, migración y metástasis (J. Chen et al., 2016). Particularmente, en CCR, se ha reportado que regula la actividad de PDHX (B Chen et al., 2014), Rb1 (López-Urrutia et al., 2017) y PTEN (Coronel-Hernández et al., 2019); así como la disminución en la expresión de PTEN potencia la transición epitelio-mesénquima a través de la activación directa de la vía Wnt/ β -catenina (Kariagina, Aupperlee, & Haslam, 2010). Interesantemente, GSK3 β un regulador negativo de esta vía- es también un blanco de mir-26a. proceso demostrado en colangiocarcinoma (Jinqiang Zhang et al., 2012), osteosarcoma (Qu et al., 2015)(Z. Wang et al., 2015) y recientemente en CCR.

Mir-26a ha sido descrito como un factor crucial en la regulación de la muerte celular, ejerciendo una función dual de tipo tejido específico. En células de carcinoma oral, el tratamiento con metformina desencadena la sobreexpresión de mir-26a, lo que promueve la inducción de apoptosis (F. Wang, Xu, Liu, Liu, & Xia, 2016). Otro estudio demostró que este miRNA tiene un rol protector en la lesión hepática inducida por etanol, debido a que potencia

el proceso de autofagia, a través de la regulación de DUSP4 and DSP5, dos inhibidores cruciales de la vía MAPK (Han et al., 2015). En nuestros resultados, la disminución en la expresión de mir-26a reduce la proliferación celular; los antecedentes mencionados anteriormente, sugieren que la pérdida de mir-26a promueve algún tipo de muerte celular en CCR. En hepatocarcinoma, la sobreexpresión de mir-26a inhibe el proceso de autofagia inducido por el tratamiento con doxorubicina, esto lo hace al regular directamente a ULK1, promoviendo apoptosis y sensibilizando a las células a la quimioterapia (Jin et al., 2017). Si bien, el papel de mir-26a en la muerte celular en CCR es aún poco conocido, con este trabajo hemos contribuido a esclarecer su papel en los procesos de migración y proliferación.

PTEN es el mRNA blanco por excelencia de mir-26a. Fue de los primeros blancos descritos para este miRNA en cáncer. Además, este eje de regulación está altamente coordinado, simplemente la región 3' UTR del mRNA de PTEN posee 3 sitios de interacción con mir-26a (Huse et al., 2009) y este eje ha sido descrito en varios tipos de cáncer (Kim et al., 2010)(Yu et al., 2016)(J. Li, An, Zhang, & Ma, 2016)(Liu et al., 2012). Por esta razón, no es del todo sorprendente que esta regulación se extendiera hasta CCR.

Por otra parte, un evento único que solo ha sido observado en carcinoma de esófago es el papel oncogénico de Rb1, un gen caracterizado principalmente como supresor tumoral. Se encontró que Rb1 estaba sobreexpresado por lo que se inhibió la proliferación de estas células. Sin embargo, al no proliferar, las células de carcinoma de esófago generaron resistencia a la muerte celular mediada por apoptosis o anoikis, volviéndolas un fenotipo más agresivo, pero este fenotipo fue revertido al sobreexpresar a mir-26, ejerciendo una función supresora de tumores, dado que se demostró que Rb1 es un blanco de este miRNA (Y.-F. Zhang et al., 2013). En nuestro grupo de investigación, describimos el mismo eje de regulación en CCR,

mir-26a/Rb1, pero con un contexto biológico distinto, mir-26a ejerce una función oncogénica al mantener el fenotipo de proliferación sostenida a las células de cáncer colorrectal mediante la regulación negativa de Rb1. Estas referencias, hacen que la regulación de este miRNA sea aún más interesante y sugiere que la interacción miRNA/mRNA no es oncogénica o supresora de tumores *per se*, más bien depende totalmente del contexto celular. La evidencia descrita en esta tesis, sumada a la evidencia que existen de mir-26a al regular efecto Warburg en cáncer colorrectal, sugiere una clara función oncogénica (B Chen et al., 2014).

El papel de Rb1 en la carcinogénesis colorrectal aun es controversial, muestras de CCR de la misma cohorte de pacientes, no presentan un patrón constante en la disminución de Rb1, porque los diversos autores difieren en la relevancia de este gen en la tumorigénesis de colon (Palmqvist, Stenling, Öberg, & Landberg, 1998)(Cui et al., 2004) han encontrado que la disminución en la expresión de Rb1 es importante en la progresión del CCR, mientras que en los trabajos de Paris y Kucherlapati (Parisi et al., 2015)(Kucherlapati, Nguyen, Bronson, & Kucherlapati, 2006) mostraron que la supresión de Rb1 es factor determinante que conduce a la tumorigénesis. Esta aparente discrepancia es consistente con nuestro análisis del algoritmo “The Protein Human Atlas”, donde encontramos diferentes grados de subexpresión en aproximadamente la mitad de las muestras tumorales, sin embargo, son datos muy heterogéneos, pero todos convergen en el desarrollo de cáncer colorrectal independientemente de la variación en la expresión de Rb1. Posiblemente el efecto biológico que hemos observado en la proliferación sostenida y la migración celular se debe a la multi-regulación que está ejerciendo mir-26a sobre todos sus genes blancos, no solo sobre PTEN, Rb1 o GSK3B de manera individual, si no de manera combinatoria, sin olvidar otros mensajeros que pueden estar sujetos a regulación por este miRNA. En glioblastoma se ha

observado que mir-26a es capaz de regular directamente a PTEN y a Rb1. Sorprendentemente, los genes hospederos de mir-26a, *CTDSPL* y *CTDSP2* se encuentran sobrepresados debido a un fenómeno de amplificación cromosómica, lo que conduce también a la sobreexpresión de CDK4, otro regulador negativo de Rb1, demostrando que existe un proceso de doble regulación, proteico y epigenético (Kim et al., 2010).

V. Conclusiones

Los datos obtenidos revelan el papel oncogénico de mir-26a en los procesos de proliferación y migración, en líneas celulares, tejidos de pacientes y muestras in vivo de un modelo murino de cáncer colorrectal.

La proliferación y migración se ven favorecidos debido a la regulación que ejerce mir-26a sobre *Rb1*, *GSK3 β* y principalmente sobre *PTEN*.

La expresión de mir-26a podría ser usada como biomarcador de desarrollo tumoral en pacientes con cáncer colorrectal, debido a que comienza a sobreexpresarse desde las primeras etapas de la neoplasia.

HIF-1 α transcribe directamente a mir-26a, indicando que las condiciones de hipoxia en las primeras etapas de la carcinogénesis colorrectal están asociadas con el mantenimiento de la proliferación y la inducción de metástasis.

VI. Bibliografía

- Agarwal, A., Das, K., Lerner, N., Sathe, S., Cicek, M., Casey, G., & Sizemore, N. (2005). 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*(6), 1021–1031. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208296>
- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*, *4*(AUGUST2015). <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Ahmed, D., Eide, P. W., Eilertsen, I. A., Danielsen, S. A., Eknæs, M., Hektoen, M., ... Lothe, R. A. (2013). Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*, *2*(0424). <https://doi.org/10.1038/oncsis.2013.35>
- Armed Forces Institute of Pathology (U.S.). (1994). *Métodos histotecnológicos*. El Registro de Patología de los Estados Unidos de América.
- Balzola, F., Bernstein, C., Ho, G. T., & Lees, C. (2011). Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease: Commentary. *Inflammatory Bowel Disease Monitor*, *11*(3), 126–127. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013160>
- Barker, N., & Clevers, H. (2006). Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*, *5*(12), 997–1014. <https://doi.org/10.1038/nrd2154>
- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., ... Bentwich, Z. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nature Genetics*, *37*(7), 766–770. <https://doi.org/10.1038/ng1590>
- Boman, B. M., & 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. *Frontiers in Oncology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00244>
- Bosserhoff, A.-K., Grussendorf-Conen, E.-I., Rübber, A., Rudnik-Schöneborn, S., Zerres, K., Buettner, R., & Merkelbach-Bruse, S. (2006). Multiple colon carcinomas in a patient with Cowden syndrome. *International Journal of Molecular Medicine*, *18*(4), 643–647. <https://doi.org/10.3892/ijmm.18.4.643>
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, *136*(4), 642–655. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.035>
- Catela Ivkovic, T., Aralica, G., Cacev, T., Loncar, B., & Kapitanovic, S. (2013). miR-106a overexpression and pRB downregulation in sporadic colorectal cancer. *Experimental and Molecular Pathology*, *94*(1), 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2012.11.002>
- Chen, B, Liu, Y., Jin, X., Lu, W., Liu, J., Xia, Z., ... Liang, S. (2014). MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, *14*(1), 443. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-443>

- Chen, Binghe, Zhang, D., Kuai, J., Cheng, M., Fang, X., & Li, G. (2017). Upregulation of miR-199a/b contributes to cisplatin resistance via Wnt/ β -catenin-ABCG2 signaling pathway in ALDH1⁺ colorectal cancer stem cells. *Tumor Biology*, *39*(6), 101042831771515. <https://doi.org/10.1177/1010428317715155>
- Chen, J., Zhang, K., Xu, Y., Gao, Y., Li, C., Wang, R., & Chen, L. (2016). The role of microRNA-26a in human cancer progression and clinical application. *Tumor Biology*, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5017-y>
- Colangelo, T., Fucci, A., Votino, C., Sabatino, L., Pancione, M., Laudanna, C., ... Colantuoni, V. (2013). MicroRNA-130b Promotes Tumor Development and Is Associated with Poor Prognosis in Colorectal Cancer. *Neoplasia*, *15*(9), 1086–1099. <https://doi.org/10.1593/neo.13998>
- Coller, H. A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *8*(8), 667–670. <https://doi.org/10.1038/nrm2223>
- Coronel-Hernández, J., López-Urrutia, E., Contreras-Romero, C., Delgado-Waldo, I., Figueroa-González, G., Campos-Parra, A. D., ... Pérez-Plasencia, C. (2019). Cell migration and proliferation are regulated by miR-26a in colorectal cancer via the PTEN–AKT axis. *Cancer Cell International*, *19*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/s12935-019-0802-5>
- Cross, A. J., Ferrucci, L. M., Risch, A., Graubard, B. I., Ward, M. H., Park, Y., ... Sinha, R. (2010). A Large Prospective Study of Meat Consumption and Colorectal Cancer Risk: An Investigation of Potential Mechanisms Underlying this Association. *Cancer Research*, *70*(6), 2406–2414. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3929>
- Cui, X., Shirai, Y., Wakai, T., Yokoyama, N., Hirano, S., & Hatakeyama, K. (2004). Aberrant expression of pRb and p16INK4a, alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Human Pathology*, *35*(10), 1189–1195. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.06.010>
- Danese, E., Minicozzi, A. M., Benati, M., Paviati, E., Lima-Oliveira, G., Gusella, M., ... Lippi, G. (2017). Reference miRNAs for colorectal cancer: Analysis and verification of current data. *Scientific Reports*, *7*(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08784-3>
- Di Fiore, R., D'Anneo, A., Tesoriere, G., & Vento, R. (2013). RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, *228*(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1002/jcp.24329>
- Divolis, G., Mavroei, P., Mavrofrydi, O., & Papazafiri, P. (2016). Differential effects of calcium on PI3K-Akt and HIF-1 α survival pathways. *Cell Biology and Toxicology*, *32*(5), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s10565-016-9345-x>
- Fan, D., Lin, X., Zhang, F., Zhong, W., Hu, J., Chen, Y., ... Wu, X. (2018). MicroRNA 26b promotes colorectal cancer metastasis by downregulating phosphatase and tensin homolog and wingless-type MMTV integration site family member 5A. *Cancer Science*, *109*(2), 354–362. <https://doi.org/10.1111/cas.13451>
- Fearon, E. F., & Vogelstein, B. (1990). for Colorectal Tumorigenesis, *61*, 759–767.
- Finlay, G. J. (1993). Genetics, molecular biology and colorectal cancer. *Mutation Research*, *290*(1), 3–12. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(93\)90027-D](https://doi.org/10.1016/0027-5107(93)90027-D)

- Fodde, R. (2002). The APC gene in colorectal cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, 38(7), 867–871. [https://doi.org/10.1016/s0959-8049\(02\)00040-0](https://doi.org/10.1016/s0959-8049(02)00040-0)
- Goel, A., Arnold, C. N., Niedzwiecki, D., Carethers, J. M., Dowell, J. M., Wasserman, L., ... Boland, C. R. (2004). Frequent Inactivation of PTEN by Promoter Hypermethylation in Microsatellite Instability-High Sporadic Colorectal Cancers. *Cancer Research*, 64(214), 3014–3021. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-2401-2>
- Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2007). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database), D154–D158. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>
- Gu, S., & Kay, M. A. (2010). How do miRNAs mediate translational repression? *Silence*, 1(1), 11. <https://doi.org/10.1186/1758-907X-1-11>
- Guo, P., Nie, Q., Lan, J., Ge, J., Qiu, Y., & Mao, Q. (2013). C-Myc negatively controls the tumor suppressor PTEN by upregulating miR-26a in glioblastoma multiforme cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(1), 186–190. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.034>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Han, W., Fu, X., Xie, J., Meng, Z., Gu, Y., Wang, X., ... Huang, W. (2015). miR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury. *Journal of Molecular Medicine*, 93(9), 1045–1055. <https://doi.org/10.1007/s00109-015-1282-2>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Huse, J. T., Brennan, C., Hambardzumyan, D., Wee, B., Pena, J., Rouhanifard, S. H., ... Holland, E. C. (2009). The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes and Development*, 23(11), 1327–1337. <https://doi.org/10.1101/gad.1777409>
- Jin, F., Wang, Y., Li, M., Zhu, Y., Liang, H., Wang, C., ... Li, L. (2017). MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. *Cell Death and Disease*, 8(1), e2540. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.461>
- Kariagina, A., Aupperlee, M. D., & Haslam, S. Z. (2010). PTEN Loss Induces Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Colon Cancer Cells, 18(1), 11–33. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2877.The>
- Ke, T.-W., Wei, P.-L., Yeh, K.-T., Chen, W. T.-L., & Cheng, Y.-W. (2015). MiR-92a Promotes Cell Metastasis of Colorectal Cancer Through PTEN-Mediated PI3K/AKT Pathway. *Annals of Surgical Oncology*, 22(8), 2649–2655. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4305-2>
- Kim, H., Huang, W., Jiang, X., Pennicooke, B., Park, P. J., & Johnson, M. D. (2010). Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2183–2188. <https://doi.org/10.1073/pnas.0909896107>

- Kucherlapati, M. H., Nguyen, A. A., Bronson, R. T., & Kucherlapati, R. S. (2006). Inactivation of Conditional *Rb* by *Villin-Cre* Leads to Aggressive Tumors outside the Gastrointestinal Tract. *Cancer Research*, *66*(7), 3576–3583. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2699>
- Kucherlapati, M. H., Yang, K., Fan, K., Kuraguchi, M., Sonkin, D., Rosulek, A., ... Kucherlapati, R. (2008). Loss of *Rb1* in the gastrointestinal tract of *Apc^{1638N}* mice promotes tumors of the cecum and proximal colon. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(40), 15493–15498. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802933105>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., ... Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, *425*(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Li, J., An, G., Zhang, M., & Ma, Q. (2016). Long non-coding RNA TUG1 acts as a miR-26a sponge in human glioma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *477*(4), 743–748. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.06.129>
- Li, J. H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L. H., & Yang, J. H. (2014). StarBase v2.0: Decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, *42*(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>
- Li, R., Quan, Y., & Xia, W. (2018). SIRT3 inhibits prostate cancer metastasis through regulation of FOXO3A by suppressing Wnt/ β -catenin pathway. *Experimental Cell Research*, (October 2017), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2018.01.036>
- Lin, L., Zhang, Z., Zhang, W., Wang, L., & Wang, J. (2015). Roles of genetic variants in the PI3K/PTEN pathways in susceptibility to colorectal carcinoma and clinical outcomes treated with FOLFOX regimen. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(10), 13314–13322. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4680480>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26722535>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4680480>
- Lin, P.-C., Lin, J.-K., Lin, H.-H., Lan, Y.-T., Lin, C.-C., Yang, S.-H., ... Chang, S.-C. (2015). A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. *World Journal of Surgical Oncology*, *13*, 186. <https://doi.org/10.1186/s12957-015-0601-y>
- Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(6), 321–333. <https://doi.org/10.1038/nrc3932>
- Liu, B., Wu, X., Liu, B., Wang, C., Liu, Y., Zhou, Q., & Xu, K. (2012). MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, *1822*(11), 1692–1704. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.019>
- López-Urrutia, E., Coronel-Hernández, J., García-Castillo, V., Contreras-Romero, C., Martínez-Gutierrez, A., Estrada-Galicia, D., ... Pérez-Plasencia, C. (2017). MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer. *Tumor Biology*, *39*(4), 101042831769594. <https://doi.org/10.1177/1010428317695945>
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Saavedra, E. A., Lamb, J., Peck, D., ... Golub, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*(June), 834–838.

<https://doi.org/10.1038/nature03702>

- Lynch, H., Lynch, P., Lanspa, S., Snyder, C., Lynch, J., & Boland, C. (2009). Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics*, 76(1), 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.2009.01230.x>
- Manning, A. L., & Dyson, N. J. (2011). pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence. *Trends in Cell Biology*, 21(8), 433–441. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2011.05.003>
- Mao, C., Zhou, J., Yang, Z., Huang, Y., Wu, X., Shen, H., ... Chen, Q. (2012). KRAS, BRAF and PIK3CA Mutations and the Loss of PTEN Expression in Chinese Patients with Colorectal Cancer. *PLoS ONE*, 7(5), e36653. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036653>
- Michael, M. Z., O' Connor, S. M., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P., & James, R. J. (2003). Reduced Accumulation of Specific MicroRNAs in Colorectal Neoplasia. *Molecular Cancer Research*, 1(12), 882–891. Retrieved from <http://mcr.aacrjournals.org/content/1/12/882.abstract>
- Näthke, I. S. (2004). The Adenomatous Polyposis Coli Protein: The Achilles Heel of the Gut Epithelium. *Cell*, 20(April 2016), 1–35. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.012103.094541>
- Nip, H., Dar, A. A., Saini, S., Colden, M., Varahram, S., Chowdhary, H., ... Majid, S. (2016). Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. *Oncotarget*, 7(42), 68371–68384. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12031>
- Palmqvist, R., Stenling, R., Öberg, Å., & Landberg, G. (1998). Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 34(10), 1575–1581. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00162-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00162-2)
- Papandreou, C. N., & Logothetis, C. J. (2004). Bortezomib as a potential treatment for prostate cancer. *Cancer Research*, 64(15), 5036–5043. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-03-2707>
- Parisi, T., Bronson, R. T., & Lees, J. A. (2015). Inactivation of the retinoblastoma gene yields a mouse model of malignant colorectal cancer. *Oncogene*, 34(48), 5890–5899. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.30>
- Qu, F., Li, C., Yuan, B., Qi, W., Li, H., Shen, X., ... Liu, Y. (2015). MicroRNA-26a induces osteosarcoma cell growth and metastasis via the Wnt/ β -catenin pathway. *Oncology Letters*, 1592–1596. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.4073>
- Ren, P., Gong, F., Zhang, Y., Jiang, J., & Zhang, H. (2016). MicroRNA-92a promotes growth, metastasis, and chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Tumor Biology*, 37(3), 3215–3225. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4150-3>
- Shakoori, A., Ougolkov, A., Yu, Z. W., Zhang, B., Modarressi, M. H., Billadeau, D. D., ... Minamoto, T. (2005). Deregulated GSK3 β activity in colorectal cancer: Its association with tumor cell survival and proliferation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 334(4), 1365–1373. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.041>

- Shen, H., Li, L., Yang, S., Wang, D., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2016). MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Gene*, *593*(1), 84–90. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2016.08.016>
- Siomi, H., & Siomi, M. C. (2010). Posttranscriptional Regulation of MicroRNA Biogenesis in Animals. *Molecular Cell*, *38*(3), 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.03.013>
- Soletti, R. C., Rodrigues, N. A. L. V., Biasoli, D., Luiz, R. R., Souza, H. S. P. de, & 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*(8), e70786. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070786>
- Strubberg, A. M., & Madison, B. B. (2017). MicroRNAs in the etiology of colorectal cancer: pathways and clinical implications. *Disease Models & Mechanisms*, *10*(3), 197–214. <https://doi.org/10.1242/dmm.027441>
- Tanaka, T., Kohno, H., Suzuki, R., Yamada, Y., Sugie, S., & Mori, H. (2003). A novel inflammation-related mouse colon carcinogenesis model induced by azoxymethane and dextran sodium sulfate. *Cancer Science*, *94*(11), 965–973. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2003.tb01386.x>
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, E., & Karin, M. (2010). Inflammation and Colon Cancer. *Gastroenterology*, *138*(6), 2101–2114. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.058>
- Tili, E., Michaille, J.-J., & Croce, C. M. (2013). MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunological Reviews*, *253*(1), 167–184. <https://doi.org/10.1111/imr.12050>
- Tsunoda, T., Takashima, Y., Yoshida, Y., Doi, K., Tanaka, Y., Fujimoto, T., ... Shirasawa, S. (2011). Oncogenic KRAS regulates miR-200c and miR-221/222 in a 3D-specific manner in colorectal cancer cells. *Anticancer Research*, *31*(7), 2453–2459. <https://doi.org/31/7/2453> [pii]
- Vivanco, I., & Sawyers, C. L. (2002). The phosphatidylinositol 3-Kinase–AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, *2*(7), 489–501. <https://doi.org/10.1038/nrc839>
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., ... Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(7), 2257–2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>
- Wang, F., Xu, J., Liu, H., Liu, Z., & Xia, F. (2016). Metformin induces apoptosis by microRNA-26a-mediated downregulation of myeloid cell leukaemia-1 in human oral cancer cells. *Molecular Medicine Reports*, *13*(6), 4671–4676. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5143>
- Wang, J., Park, J. S., Wei, Y., Rajurkar, M., Cotton, J., Fan, Q., ... Mao, J. (2013). TRIB2 acts downstream of Wnt/TCF in liver cancer cells to regulate YAP and C/EBP β function. *Molecular Cell*, *51*(2), 211–225. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.05.013>
- Wang, Z., Xie, Q., Yu, Z., Zhou, H., Huang, Y., Bi, X., ... Fan, X. (2015). A regulatory loop containing miR-26a, GSK3 β and C/EBP α regulates the osteogenesis of human adipose-derived mesenchymal stem cells. *Sci Rep*, *5*(October), 15280. <https://doi.org/10.1038/srep15280>
- Weinberg, R. H. D. (2000). The Hallmarks of cancer. *Cell*, *60*(3), 57–70.

<https://doi.org/10.1007/s00262-010-0968-0>

- Wu, W., Yang, J., Feng, X., Wang, H., Ye, S., Yang, P., ... Wei, G. (2013). MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth , migration , and invasion in colorectal carcinoma cells. *Molecular Cancer*, *32*, 1–11.
- Wu, Y., Song, Y., Xiong, Y., Wang, X., Xu, K., Han, B., ... Zhou, L. (2017). MicroRNA-21 (Mir-21) Promotes Cell Growth and Invasion by Repressing Tumor Suppressor PTEN in Colorectal Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, *43*(3), 945–958.
<https://doi.org/10.1159/000481648>
- Xi, Y., Formentini, A., Chien, M., Weir, D. B., Russo, J. J., Ju, J., ... Ju, J. (2006). Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomarker Insight*, *1*(251), 113–121.
- Yang, L., Belaguli, N., & Berger, D. H. (2009). MicroRNA and Colorectal Cancer. *World Journal of Surgery*, *33*(4), 638–646. <https://doi.org/10.1007/s00268-008-9865-5>
- Yu, N., Yang, Y., Li, X., Zhang, M., Huang, J., Wang, X., & Long, X. (2016). MiR-26a inhibits proliferation and migration of HaCaT keratinocytes through regulating PTEN expression. *Gene*, *594*(1), 117–124. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.09.010>
- Zhang, Ji-guang, Wang, J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., & Yang, G. (2010). MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinica Chimica Acta*, *411*(11–12), 846–852.
<https://doi.org/10.1016/J.CCA.2010.02.074>
- Zhang, Jinqiang, Han, C., & Wu, T. (2012). MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin. *Gastroenterology*, *143*(1), 1–19.
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2012.03.045>
- Zhang, X., & Zeng, Y. (2010). The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer. *Nucleic Acids Research*, *38*(21), 7689–7697. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq645>
- Zhang, Y.-F., Zhang, A.-R., Zhang, B.-C., Rao, Z.-G., Gao, J.-F., Lv, M.-H., ... Fang, D.-C. (2013). MiR-26a regulates cell cycle and anoikis of human esophageal adenocarcinoma cells through Rb1-E2F1 signaling pathway. *Molecular Biology Reports*, *40*(2), 1711–1720.
<https://doi.org/10.1007/s11033-012-2222-7>
- Zheng, L., Zhang, Y., Liu, Y., Zhou, M., Lu, Y., Yuan, L., ... Li, X. (2015). MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer. *Journal of Translational Medicine*, *13*(1), 252. <https://doi.org/10.1186/s12967-015-0592-z>
- Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research*, *31*(13), 3406–3415. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>

VII. Anexos

| No de paciente | Diagnostico | Promedio | LOG 2 |
|--------------------|---|------------|------------|
| 1 IC13-01227-04 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO INTRAMUCOSO, EXOFITICO, PROBABLEMENTE ORIGINADO EN UN ADENOMA TUBULAR | 7.98517882 | 2.99732472 |
| 2 10-6904-8 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO INCIPIENTE, INTRAMUCOSO E IN SITU | 27.207147 | 4.76591377 |
| 3 IC13-9514-2 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO, PROBABLEMENTE ORIGINADO EN ADENOMA VELLOSO | 25.2975138 | 4.6609237 |
| 4 IC13-4483 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO | 9.9541893 | 3.31530382 |
| 5 IC10-9974 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO, POLIPOIDE, INCIPIENTE (TEMPRANO) (Ip), INTRAMUCOSO | 12.7794248 | 3.675751 |
| 6 IC11-9487 | ADENOCARCINOMA MODERADAMENTE DIFERENCIADO (G2), ASOCIADO A ADENOMA TUBULAR. | 52.2124377 | 5.70632161 |
| 7 IC11-2907 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO, ORIGINADO EN ADENOMA VELLOSO. | 164.299874 | 7.36018756 |
| 8 IC13-01227-03 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO INTRAMUCOSO, EXOFITICO, PROBABLEMENTE ORIGINADO EN UN ADENOMA TUBULAR | 57.9963533 | 5.85789029 |
| 9 IC10-6876 | ADENOMA VELLOSO | 358.559263 | 8.48606778 |
| 10 IC12-13940-03 | POLIPOSIS ADENOMATOSA FAMILIAR, CON UN ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO INTRAMUCOSO EN COLON ASCENDENTE | 13.0668672 | 3.70784139 |
| 11 IC10-11-12285 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO, PROBABLEMENTE ORIGINADO EN ADENOMA AVANZADO (configuración vellosa). | 114.763786 | 6.84252366 |
| 12 IC12-6350 | ADENOCARCINOMA BIEN DIFERENCIADO INTRAMUCOSO, ORIGINADO EN ADENOMA | 833.163148 | 9.70245522 |
| 13 IC10-0227 | ADENOMA TUBULAR AVANZADO (>1cm; componente vellosa 5% | 891.440938 | 9.79999541 |

Tabla 5. Diagnóstico clínico patológico de pacientes con CCR utilizados en este estudio.

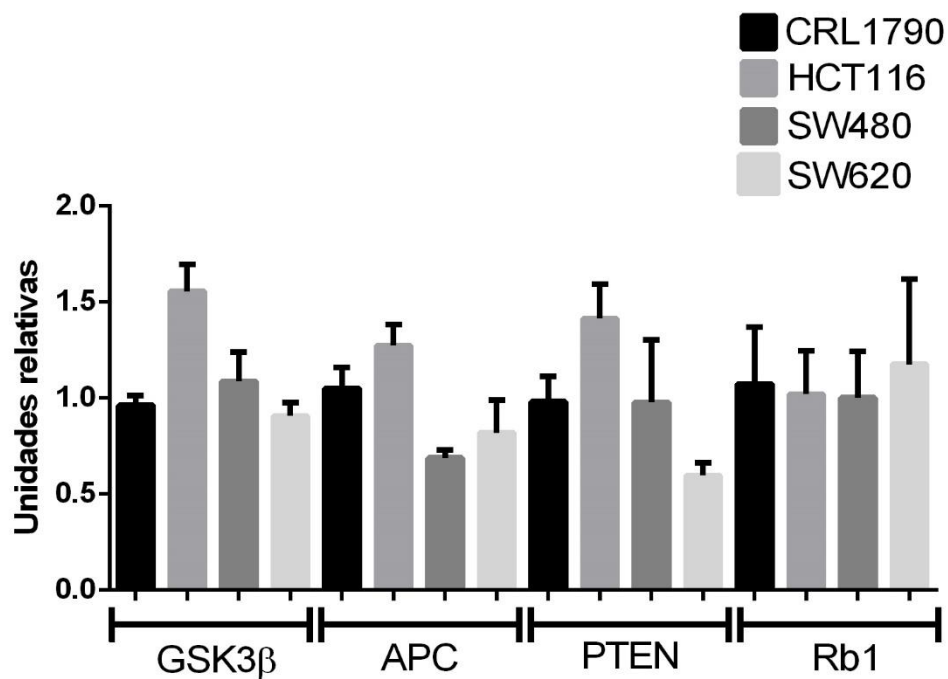


Figura 36. Análisis densitométrico de las proteínas GSK3β, APC, PTEN y Rb1 correspondientes a la figura 20 del apartado de resultados

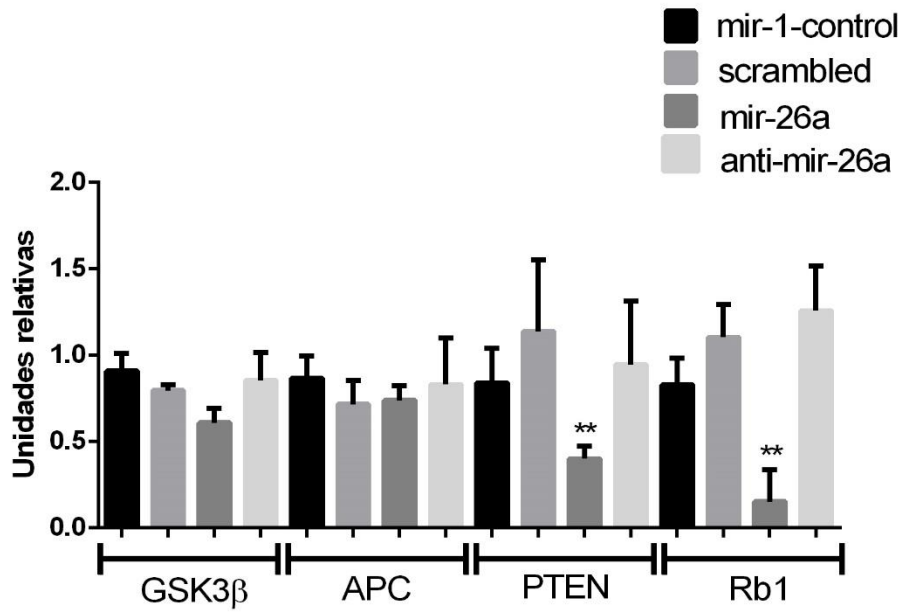


Figura 37. Análisis densitométrico de las proteínas GSK3β, APC, PTEN y Rb1 correspondientes a la figura 28, HCT116 del apartado de resultados

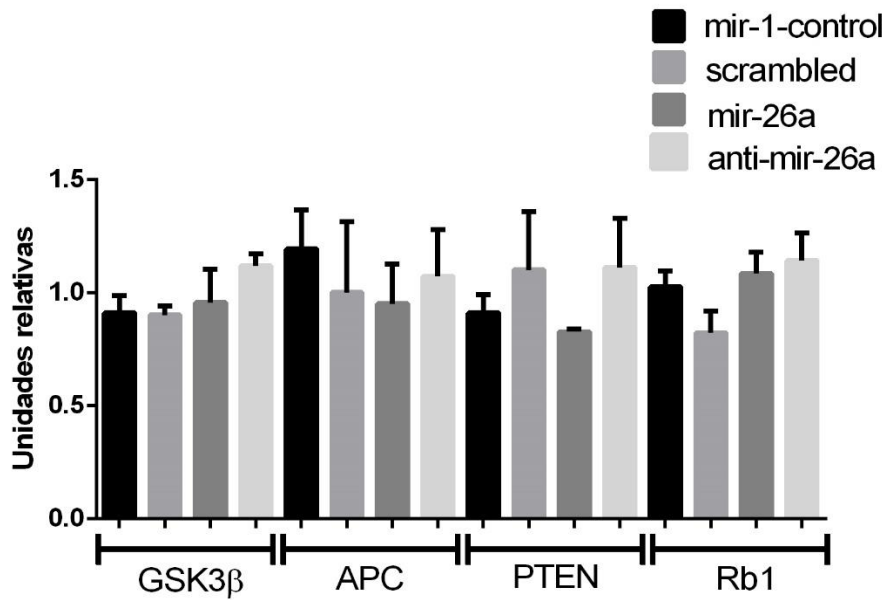


Figura 38. Análisis densitométrico de las proteínas GSK3β, APC, PTEN y Rb1 correspondientes a la figura 28, SW480 del apartado de resultados



Figura 39. Imagen aumentada del ensayo de cierre y herida localizada en la figura 25c del apartado de resultados


Producción científica

PRIMARY RESEARCH

Open Access



Cell migration and proliferation are regulated by miR-26a in colorectal cancer via the PTEN–AKT axis

Jossimar Coronel-Hernández^{1,7†}, Eduardo López-Urrutia^{1†}, Carlos Contreras-Romero¹, Izamary Delgado-Waldo¹, Gabriela Figueroa-González², Alma D. Campos-Parra², Rebeca Salgado-García², Antonio Martínez-Gutierrez², Miguel Rodríguez-Morales², Nadia Jacobo-Herrera³, Luis Ignacio Terrazas⁴, Abraham Silva-Carmona⁵, César López-Camarillo⁶ and Carlos Pérez-Plasencia^{1,2*} 

Abstract

Background: Invasion and metastasis are determinant events in the prognosis of Colorectal cancer (CRC), a common neoplasm worldwide. An important factor for metastasis is the acquired capacity of the cell to proliferate and invade adjacent tissues. In this paper, we explored the role of micro-RNA-26a in the regulation of proliferation and migration in CRC-derived cells through the negative regulation of PTEN, a key negative regulator of the AKT pathway.

Methods: Expression levels of PTEN and mir-26a were surveyed in normal and CRC-derived cell lines; paraffin embedded human tissues, TCGA CRC expression data and a Balb/c mice orthotopic induced CRC model. CRC was induced by an initial intraperitoneal dose of the colonic carcinogen Azoxymethane followed by inflammatory promoter Dextran Sulfate Sodium Salt. Luciferase assays provide information about miR-26a–PTEN 3'UTR interaction. Proliferation and migration by real time cell analysis and wound-healing functional analyses were performed to assess the participation of mir-26a on important hallmarks of CRC and its regulation on the PTEN gene.

Results: We observed a negative correlation between PTEN and mir-26a expression in cell lines, human tissues, TCGA data, and tissues derived from the CRC mouse model. Moreover, we showed that negative regulation of PTEN exerted by miR-26a affected AKT phosphorylation levels directly. Functional assays showed that mir-26a directly down-regulates PTEN, and that mir-26a over-expressing cells had higher proliferation and migration rates.

Conclusions: All this data proposes an important role of mir-26a as an oncomir in the progression and invasion of CRC. Our data suggested that mir-26a could be used as a biomarker of tumor development in CRC patients, however more studies must be conducted to establish its clinical role.

Keywords: MicroRNA, mir-26a, PTEN, AKT, Colorectal cancer, Animal model for carcinogenesis

*Correspondence: carlos.pplas@gmail.com

[†]Jossimar Coronel-Hernández and Eduardo López-Urrutia contributed equally to this work

²Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, Zip code 14080 Mexico City, DF, Mexico

Full list of author information is available at the end of the article



Background

Colorectal cancer (CRC) is the third most common neoplasm and the fourth cause of cancer-related death worldwide in both sexes. Invasion and metastasis are determinant events in the prognosis of CRC. An important factor for metastasis is the acquired capacity of the cell to proliferate and invade adjacent tissues. One of the most relevant signaling pathways regulating cell proliferation, survival, angiogenesis, and metastasis is PI3K/AKT; which is negatively regulated by the tumor suppressor Phosphatase and Tensin homolog (PTEN) [1]. Loss of PTEN function occurs in several types of cancer—including CRC—through various genetic mechanisms such as point mutations or allelic loss of chromosome 10q2; however, biallelic inactivation of this site has not been demonstrated. Finally, methylation of the PTEN promoter has been reported to be associated in high microsatellite instability in 19% of colorectal cancers [2] and the PTEN messenger has been demonstrated to be targeted by microRNA regulation [3].

Micro-RNAs (miRNAs) are non-coding short RNAs that modulate gene expression by inducing mRNA degradation or translational repression [4]. They perform this function by binding to the 3' UTR of their target mRNA through complete or partial base complementarity, thus they are capable of pleiotropic effects [5, 6]. Deregulation of the expression patterns of several microRNAs has been implicated in establishment and progression of many types of cancer. Particularly, mir-26a has been associated to development of glioblastoma [7], cholangiocarcinoma [8] and ovarian cancer [9] and thus labeled as an oncomir in those cancers; however, mir-26a has also been classified as tumor suppressor in pancreatic cancer [10], hepatocellular carcinoma [11] and nasopharyngeal carcinoma [12].

In CRC, miR-26a is significantly upregulated [13], but the function and clinical relevance of this miRNA in CRC is still partially understood. Our group has recently found that in CRC Rb1 gene is a target of miR-26a [14], but this is still far from the complete picture, as a single miRNA has been observed to target several genes. For example, miR-182-5p targets three genes involved in DNA repair [15], and drives metastasis of primary sarcomas [16]. On the other hand, various miRNAs can target the same gene, yielding similar effects in spite of being different regulators; hence, overexpression of both mir-130a [17] and mir-23a [18] enhance migration, invasion and the epithelial-mesenchymal transition (EMT) in osteosarcoma cells through direct PTEN regulation.

The aim of present study was to further explore the participation of miR-26a in CRC development, through the analysis of the relationship between mir-26a expression and PTEN. We found that miR-26a does regulate

PTEN, abrogating its expression both in CRC-derived cell lines and in a mouse model that closely resembles colitis-mediated CRC. Moreover, over-expression of mir-26a mimic increases the phosphorylation levels of AKT T-308 that is the active form of AKT and triggers cell migration, proliferation among other hallmarks of cancer. Our findings suggest that miR-26a is indeed a key regulator of colorectal carcinogenesis since it targets at least two important tumor suppressor genes Rb and PTEN; thus, miR-26a is also a promising molecular biomarker involved in the progression of colon carcinogenesis process.

Methods

Patient samples

Twenty CRC paraffin-embedded tissue samples staged locally advanced; ten Crohn's disease paraffin-embedded tissue samples and 13 healthy tissues from colorectal were obtained by colonoscopy without macro and microscopic lesions from Instituto Nacional de Cancerología—National Cancer Institute, Mexico pathology registry, present investigation was approved by ethics committee (approval number INCAN/CI/826/17). None of the authors had access to potentially identifying information from the donors of the paraffin-embedded samples.

Tissue expression for in silico meta-analysis

Mature Mir-26a (RefSeq MI0000083) and mRNA PTEN (NM_001304717) expression data were obtained from The Cancer Genome Atlas in different stages of 424 (75 Stage I, 304 Stage II-III and 45 Stage IV) Colorectal Cancer samples and were normalized with deseq 2 (Bioconductor Package; data were compared with 41 healthy tissues. To assess the protein expression of PTEN; antibody-based proteomic data was obtained from The Human Protein Atlas [19]; staining intensity was compared between all the available healthy and cancer tissue data (2 and 13, respectively) from the PTEN entry. miR26a is encoded in two *loci*; mir-26a1 is localized in chromosome 3 within the CTDSPL gene and mir-26a2 is in chromosome 12 within the CTDSP2 gene.

Cell culture and transfection

CRC-derived HCT116 cells (ATCC CCL-247) were cultured in RPMI medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and maintained (FBS) at 37 °C with 5% CO₂. CRC-derived SW480 (ATCC CCL-228), SW620 (ATCC CCL-227) and non-tumoral immortalized epithelial CRL1790 colon cells obtained from ATCC were cultured in DMEM F12 medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and maintained at 37 °C with 5% CO₂.

All employed plasmids were transfected using Lipofectamine 2000 transfection agent (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. Mirvana Micro-RNA mimics and inhibitors (Ambion) were transfected using the siPORT NeoFX transfection agent (Life Technologies) following the manufacturer's protocol. Unless otherwise indicated, RNA and protein expression was analyzed 24 h post-transfection.

CRC mouse model

Twelve female Balb/c mice (Harlan Laboratories, México) aged 6 weeks used in this study were maintained at Facultad de Estudios Superiores Iztacala Animal Facility according to the institutional animal care guidelines (number of protocol FES-2016-1423). Animals were housed in plastic cages (6 mice/cage) with drinking water and pelleted basal diet ad libitum under controlled humidity ($50 \pm 10\%$), light (12/12 h light/dark cycles) and temperature (23 ± 2 °C). CRC was induced by an initial intraperitoneal dose of the colonic carcinogen Azoxymethane (AOM) followed by three Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) 7d-long, ad libitum administrations during the second, 5th and 8 weeks of treatment. This mouse model was thoroughly described in a previous paper from our group [20].

Three randomly chosen mice were euthanized after each DSS dose for mRNA and protein analysis, so as to have three biological replicates of every mRNA or protein expression measurements. Large bowels were flushed with saline and excised. Inflammation-related cancer development was confirmed by histological analysis.

RNA expression analysis

Large bowel parts of each experimental group mice were homogenized by triplicate in a Bullet Blender (Next Advance) following the manufacturer's protocol for intestinal tissue. Total RNA was isolated from the homogenized samples or from cultured cells (CRL1790, HCT116, SW480 or SW620) grown to approximately 80–85% confluence, using the TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. miRNAs were isolated from tissue blocks using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations.

Mature miR-26a and the PTEN messenger were detected in the murine model samples by RT-PCR using a Roche Light Cycler 2.0. For miR-26a, cDNA was generated from 100 ng total RNA with the TaqMan Micro-RNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in a 15 μ L volume; qPCR was performed using 1 μ L cDNA and the mir-26a taqman probe (Applied Biosystems). Amplification conditions were 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 68 °C for 60 s. For PTEN mRNA detection, we used Titan One

RT-PCR kit (Roche) supplemented with SybrGreen and the following primers: Fw AGGCACAAGAGGCC TAGAT, Rv AACTGAGGATTGCAAGTTCCG. cDNA was synthesized at 50 °C for 30 min, immediately followed by denaturation at 94 °C for 2 min, 40 cycles of 94 °C for 10 s, primer-dependent annealing temperature for 30 s and 68 °C for 45 s, and a final extension at 68 °C for 7 min.

MiR-26a and the PTEN messenger were detected in cultured cells and tissue block samples by RT-PCR using the Bio-Rad CFX 96 Touch and the mir-26a taqman probe (Applied Biosystems) or the SYBR Select Master Mix for CFX (Applied Biosystems). Amplification conditions for miR-26a were as mentioned above. For PTEN mRNA detection, cDNA was synthesized from 2 μ g total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Roche); a twentieth of this reaction was used for qPCR. Amplification conditions were 2 min at 95 °C for initial denaturation, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, primer-dependent annealing temperature for 15 s and 72 °C for 60 s.

Relative expression data was calculated through the $\Delta\Delta C_t$ method (Applied Biosystems) and normalized relative to U6 snRNA or GAPDH mRNA accordingly.

Protein expression analysis

Protein extracts from large bowel parts of each experimental mouse group or from cultured cells was obtained by homogenization in RIPA buffer (SantaCruz Biotechnology); a Bullet Blender (Next Advance) and stainless-steel beads was used for bowel tissues. Protein extract was cleared by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min.

For immunodetection, 50 μ g total protein from tumor tissue or cultured cells were mixed with Laemmli sample buffer, boiled, separated in 12% or 15% SDS-PAGE and transferred onto a Hybond-P PVDF membrane (Amersham-GE Healthcare). Membranes were probed overnight using a 1:500 (v/v) dilution of the anti-PTEN (Sc-7974) and AKT total (Sc-H-136) (Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA) and phosphorylated (AKT-phospho-T308, Ab-38449) (Abcam, Cambridge, UK); for detection, 1:2500 (v/v) dilutions of HRP anti-rabbit or anti-mouse conjugate antibodies (SantaCruz Biotechnology) were used. Finally, using the SuperSignal West-Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific), the membranes were scanned in the C-Digit blot scanner (Li-Cor) and the images were analyzed for densitometry in the associated ImageStudio software (LiCor). Membranes were stripped and re-probed for detection of actin (anti-actin, Sc-47778) as a loading control. A representative image from three independent experiments is shown.

Luciferase reporter assays

Reporter plasmids were constructed by ligation of synthetic oligonucleotide duplexes (IDT) containing putative miR-26a target regions in the PTEN 3'UTR: 5'-CTA GTT AAC TGT TAG GGA ATT TTA CTT GAA A -3' and 5'-AGC TTT TCA AGT AAA ATT CCC TAA CAG TTA A-3', obtained from microRNA.org [21] to form a DNA duplex with overhanging SpeI and HindIII half sites in the 5' and 3' ends respectively, which was cloned into the appropriately digested pMIR-REPORT plasmid (Ambion). This construct was co-transfected with miR-26a mirVana miRNA mimic (Applied Biosystems) and the pMIR-REPORT β -gal Control Plasmid (Ambion) into HCT116 cells. Luciferase activity was analyzed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 48 h after transfection, in a GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega). Luciferase activity was normalized to β -gal activity for each transfected well; each experiment was performed in triplicate.

Real-time analysis of cell proliferation and migration

The xCELLigence real-time cell analyzer (RTCA) instrument was used with E-plates to analyze proliferation and with CIM-plates (ACEA, Biosciences) to monitor migration of cells transfected with miR-26 mimic and inhibitor. For proliferation assays, HCT116 cells were cultured and transfected in 6 well-plates (5×10^5 cells per well) with 10% FBS-supplemented medium at 37 °C for 24 h, after that cells were trypsinized and counted by Neubauer chamber. We plated 1×10^4 cells per E-plate well with 10% FBS-supplemented in 150 μ L/well. The RTCA recorded cell index values over 24 h by 15 min-intervals. For migration assays, 1×10^4 cells per well were cultured in 150 μ L without FBS-avoiding therefore, cell proliferation- in the upper CIM-plate chamber while 160 μ L/well of 10% FBS-supplemented medium was added as a chemoattractant to the lower chamber. The cell index values recorded by 15 min-intervals over 24 h. These experiments were performed by triplicate.

Wound healing assay

A wound healing assay was performed to assess migration. HCT116 cells were seeded into 6 well-plates (4×10^5 cells per well) and were maintained with 2% FBS-supplemented medium to avoid cell proliferation at 37 °C for 24 h. These cells were transfected with miR-26a mimic, anti-miR26a or controls using Lipofectamine 2000 as transfection reagent for 6 h. Afterwards, the medium was removed and replaced with freshly-changed medium 2% FBS-supplemented medium, and a wound was

performed with a sterile 200 μ L pipette tip in each well. Cells were monitored every 24 h for 72 h.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm SEM. Data were analyzed in the Prism 5.0 (GraphPad) software using a one-way ANOVA analysis followed by Tukey's Multiple Comparison Test.

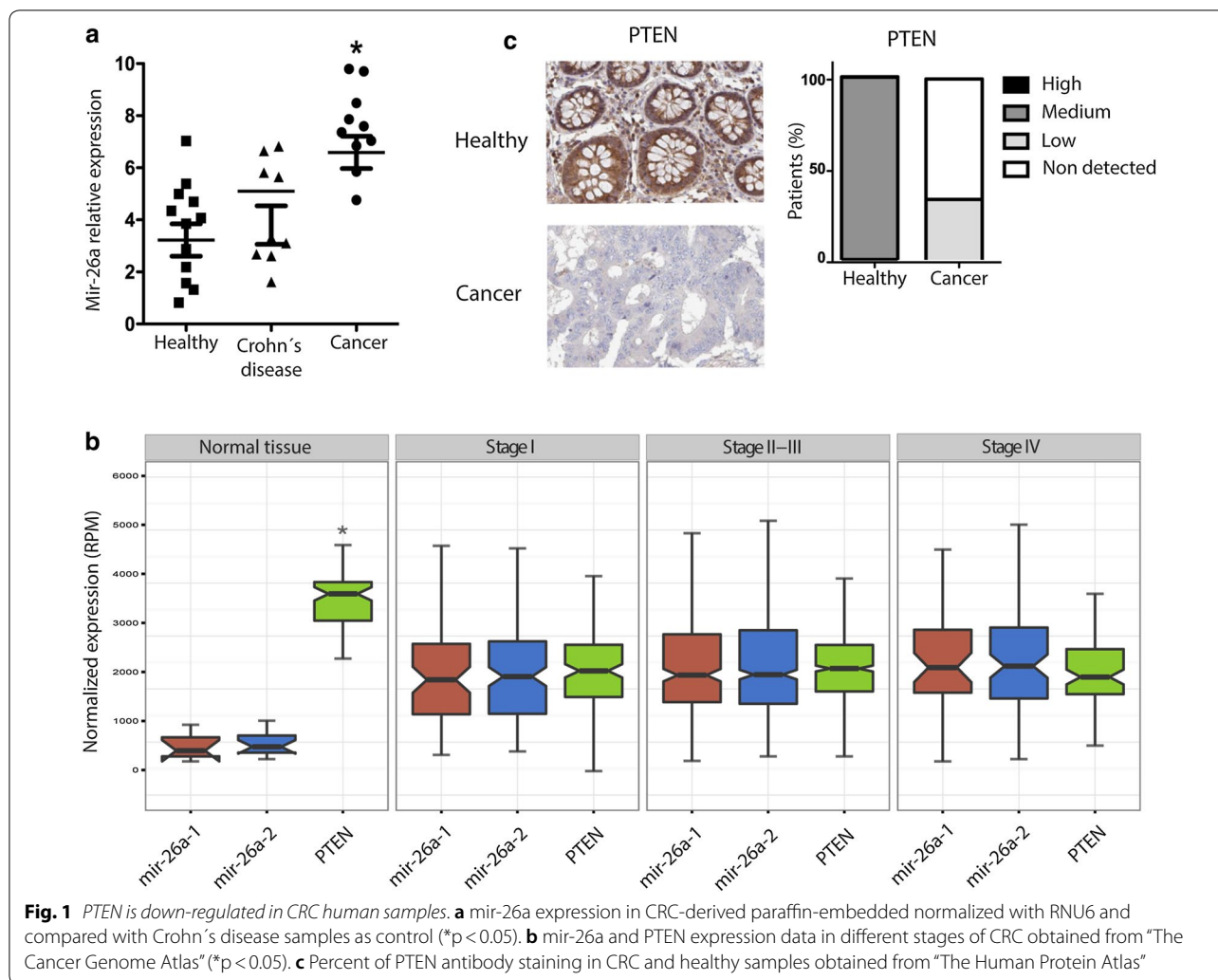
Results

PTEN and mir-26a expression are inversely correlated in human CRC samples

We measured mir-26a expression in CRC-derived paraffin-embedded tissue samples and found heterogeneous expression of this microRNA. The average mir-26a tumor expression was significantly higher than that found in both Crohn's disease and healthy tissue samples suggesting that mir-26a was overexpressed in CRC tissue samples (Fig. 1a). To verify whether this pattern was consistent in a broader sample, we used data from a third source—The Cancer Genome Atlas—and analyzed expression levels of PTEN and mir26a in 41 normal samples: 75 Stage I, 304 Stage II-III and 45 Stage IV (Fig. 1b). The data showed that mir-26a was significantly upregulated in tumors compared to normal tissues; although there was no significant difference between expression in different CRC stages. Correspondingly, PTEN was downregulated in tumors, further confirming the inverse correlation between mir-26a and PTEN that we had observed in paraffin embedded tissues samples results. Respecting to PTEN protein levels in situ we performed an in silico analysis sourcing data from the Human Protein Atlas database and compared the protein expression levels of PTEN in 2 healthy and 13 CRC samples. Immunohistochemistry data showed positive PTEN staining in all healthy samples, but none in CRC samples, indicating that loss of PTEN expression has an inverse correlation with mir-26a overexpression in CRC samples (Fig. 1c; compare to 1a and b).

PTEN is downregulated in CRC-derived cell lines

We measured the expression of mir-26a and PTEN in HCT116, SW480 and SW620, corresponding to stages I, III and metastatic respectively by qRT-PCR; CRL1790 non-tumoral colon cells were used as control. As shown in Fig. 2a, we found a slight increase in the expression level of mir-26a in HCT116; however, in SW480 and SW620 cell lines we observed a high expression of this microRNA, four- and seven-fold respectively. We consistently found an inverse correlation between mRNA PTEN and miR-26a levels: relative expression of PTEN was significantly decreased in every CRC cell line. Nevertheless, PTEN mRNA levels were diminished in HCT116



and this cell line did not have changes in mir-26a expression, suggesting there is another mechanism that regulates *PTEN* levels in HCT116 or Stage 1 of CRC. In all cell lines tested and mouse healthy tissue, *PTEN* protein levels were concordant to RNA levels. Besides, *PTEN* protein detection reflected an inverse correlation with miR-26a levels (Fig. 2b). Together, these results showed that both mRNA and protein levels of *PTEN* are down-regulated and correlate with mir-26a overexpression in CRC-derived cell lines suggesting a possible regulation of this miRNA.

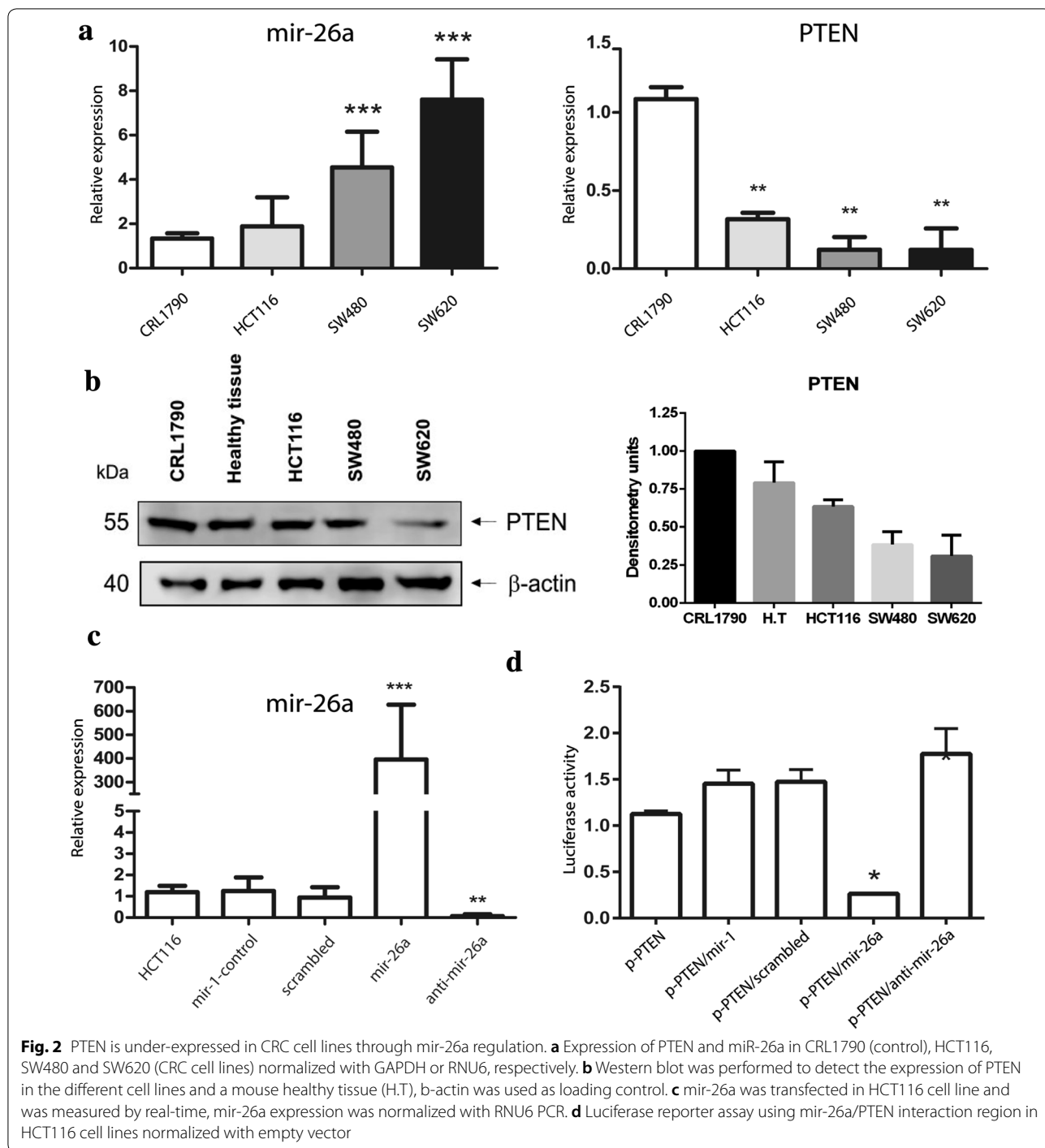
mir-26a directly inhibited *PTEN* expression through 3' UTR interaction

To confirm whether mir-26a directly regulates the *PTEN* mRNA, we used a reporter construct harboring the 3' UTR specific binding site sourced from Targetscan bioinformatics algorithm (microRNA.org) downstream from the Luciferase gene to form p-Luc-*PTEN*. From

the previously assayed cell lines, HCT116 showed better transfection capability and the lowest endogenous mir-26a expression, so we employed them to assess the negative regulation of *PTEN* exerted by mir-26a. HCT116 cells were transfected with mir-26a mimic; then the expression level of miR-26 was measured by qRT-PCR to standardize transfection conditions (Fig. 2c); later, we co-transfected p-Luc-*PTEN* with mir-26a for 48 h, which resulted in 74% reduction in luciferase levels compared to empty vector. These findings indicated that mir-26a could bind the 3' UTR of the *PTEN* mRNA (Fig. 2d).

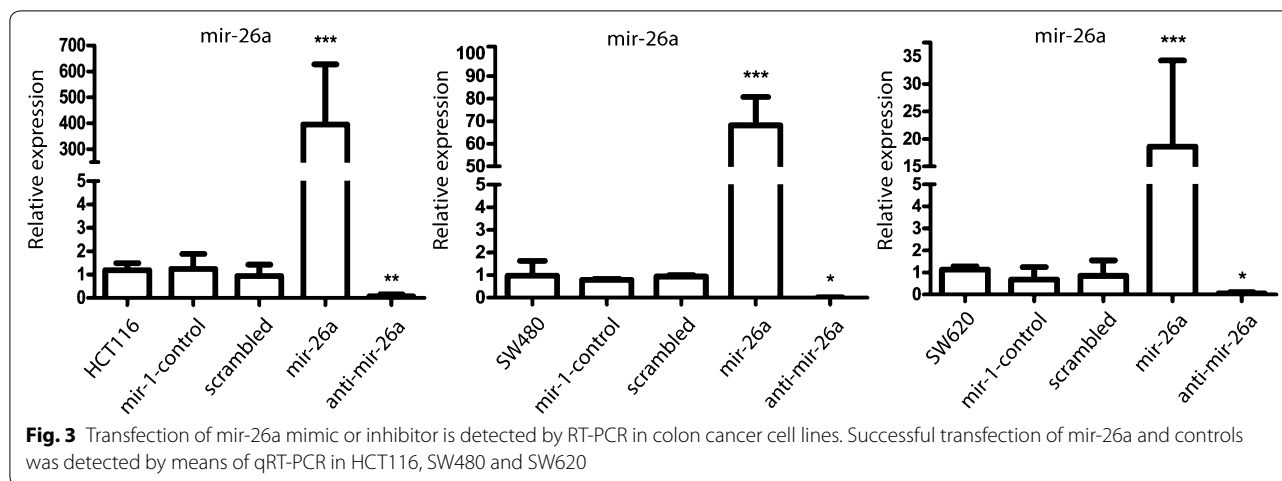
mir-26a regulates *PTEN* expression in a CRC-derived cell line

To clarify the effect of mir-26a on *PTEN* expression, mir-26a was overexpressed or repressed in HCT116, SW480 and SW620 CRC cell lines by transfection with a mir-26a mimic or inhibitor. qRT-PCR detection of miR-26a in these cells and the corresponding controls,



confirmed successful transfection (Fig. 3). We observed a better transfection capability in HCT116 and SW480 cell lines, so we chose them for following experiments. PTEN mRNA was measured by qRT-PCR and it was decreased by miR-26a over-expression in both cell lines

(Fig. 4a); however, a slight increase was observed with anti-miR-26 in HCT116, whereas a substantial increase was found in SW480. Finally, the same results were observed at the protein level in PTEN, while AKT did not show evident changes at protein level; however, we observed a direct correlation between mir-26a expression and p-AKT (Thr308)—the active state of AKT—in



both cell lines (Fig. 4b), indicating that mir-26a affects PTEN expression and AKT activity in CRC cells.

mir-26a regulates proliferation and migration in HCT116 cells

PTEN is involved in the negative regulation of AKT activation, which affects cell proliferation and migration among other crucial hallmarks of cancer. We used the xCELLingence RTCA system to measure cell proliferation and migration in each group. As expected, mir-26a overexpression increased slightly cell proliferation, on the other hand, the mir-26a downregulation, significantly decreased the proliferation rate by >50% compared to untransfected HCT116 cells indicating that mir-26a does not increase proliferation but its presence is pivotal to keep it (Fig. 5a). Next, we examined the role of mir-26a in CRC cell migration using the xCELLingence CIM plate and wound healing assays. We observed that cell migration was significantly increased after transfection with mir-26a mimic in both experiments (33%) compared to their respective controls (Fig. 5b, c). These observations suggest that mir-26a plays an important role in the proliferation maintenance and promote migration process in CRC.

mir-26a is overexpressed in AOM/DSS-induced CRC mouse model

We established a CRC mouse model to study miR-26a and PTEN expression in different stages of CRC development. All experimental groups received a single dose of Azoxymethane (AOM) and three Dextran Sulfate Sodium (DSS), every third week to generate progressive tumor development. The mean weight of the three animals in each group decreased with each DSS administration and the presence of tumors was detected after the third DSS administration (Fig. 6a). Histological analysis

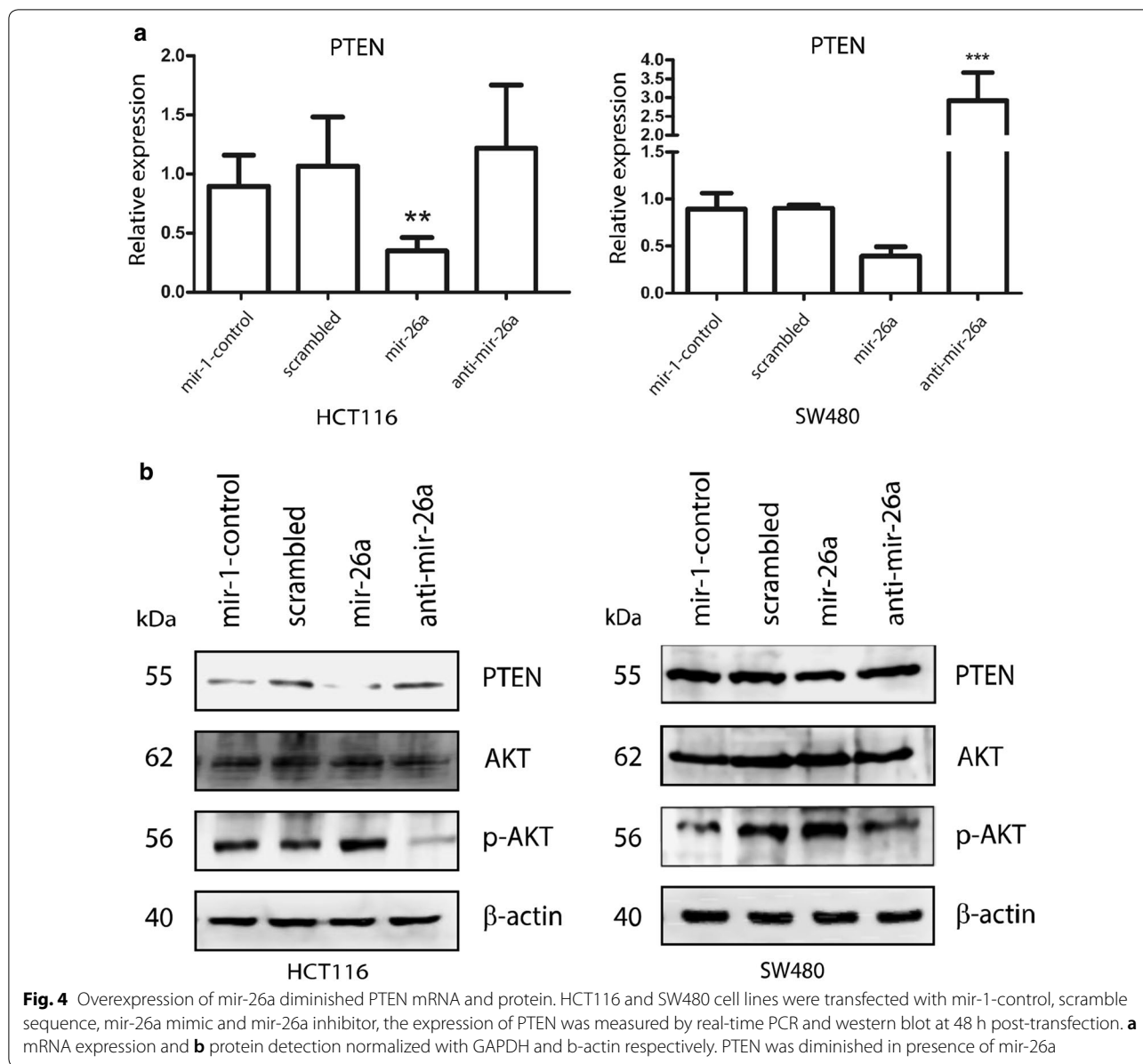
confirmed these results, revealing a generalized loss of epithelial morphology throughout the DSS cycles. After the second DSS administration, we observed chronic intestinal inflammation and slight crypt distortion with epithelial hyperplasia and after the third DSS dose, formation of adenomas composed of tubular and villous structures lined by epithelium with high grade of dysplasia (Fig. 6b). A thorough analysis of this tumors was published in a recent study from our group [20].

Expression of miR-26a and the PTEN messenger were measured after each DSS administration and we found that miR-26a expression levels remained unchanged in first DSS cycle, showed slight increase in second DSS cycle, and increased sixfold by the final DSS cycle (Fig. 6c). PTEN mRNA expression showed a gradual decrease from the first DSS cycle to the third one, in which it was undetectable (Fig. 6d). These results revealed an inverse correlation between miR-26a expression and PTEN mRNA. Conversely, the PTEN protein remained unchanged after the first and second DSS cycles and decreased only slightly after the third DSS cycle. The downstream effector regulated by PTEN activity, AKT, showed a gradual increase expression at the protein level from the first DSS cycle to the end of mouse model, suggesting that a slight decrease in PTEN allows an increase in the expression of AKT in vivo (Fig. 6e). We concluded that miR-26a targets the PTEN mRNA causing its degradation in our mouse CRC model.

Overall, our data showed that mir-26a had a key role CRC development, since it downregulated PTEN and thus enhanced cell proliferation and migration.

Discussion

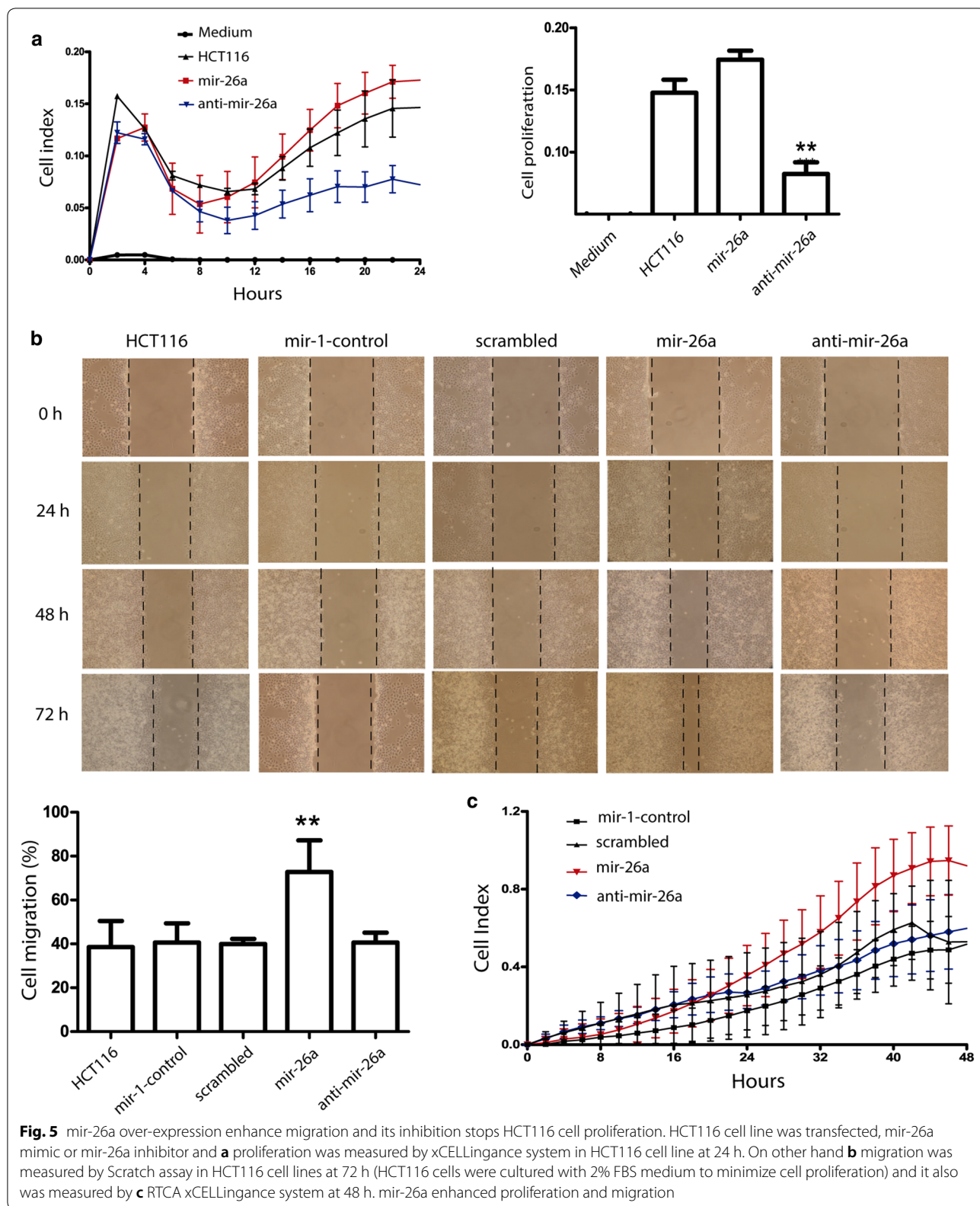
In this study, we found that mir-26a was overexpressed in CRC tissues, CRC-derived cell lines, and in samples listed in the TCGA database; furthermore, we found

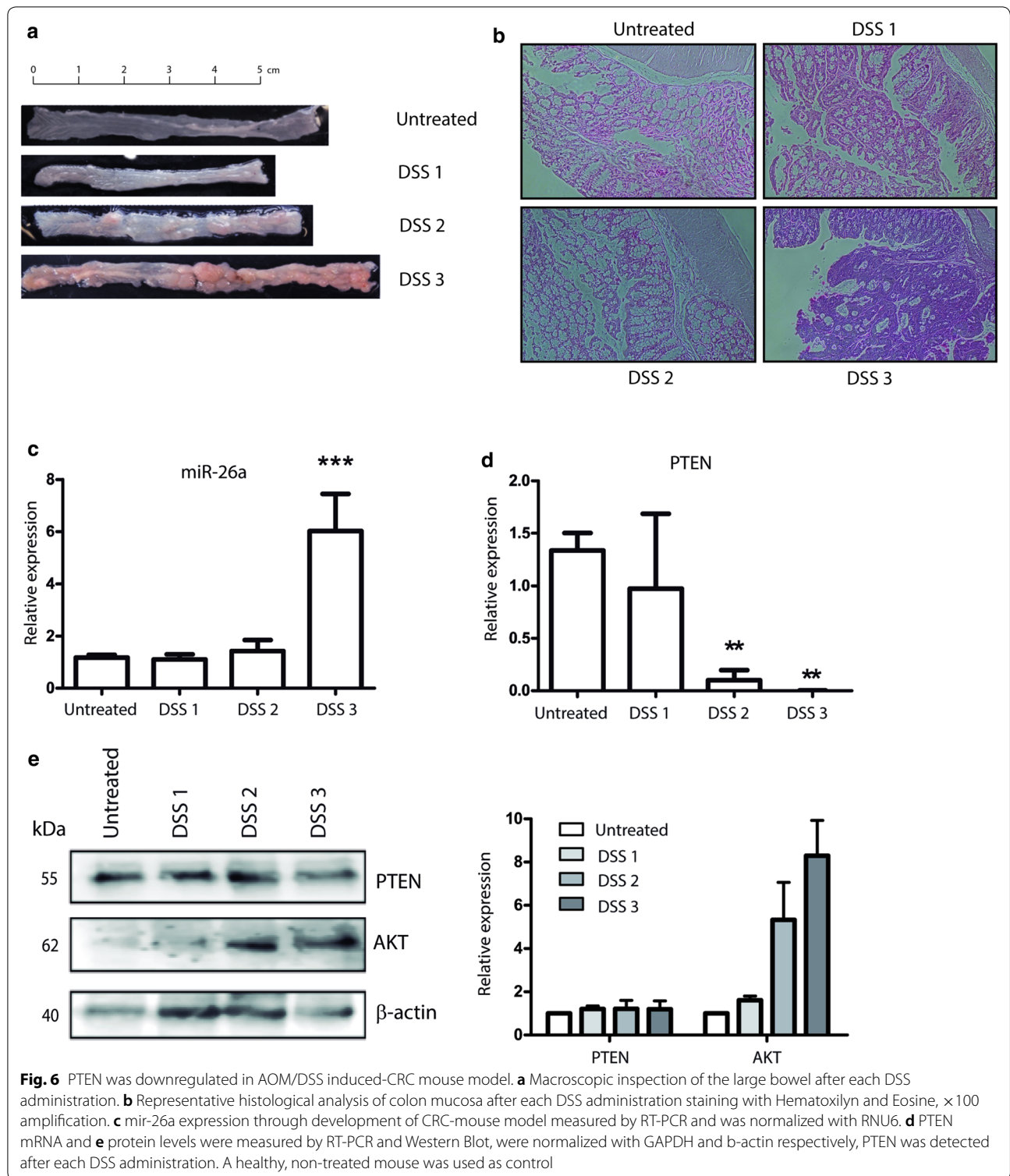


that mir-26a also was overexpressed in a CRC mouse model and that, when overexpressed in CRC-derive cell lines, it maintains proliferation and enhance migration via direct regulation of PTEN; moreover, mir-26a affected phosphorylation levels of AKT that is an effector of PTEN-PI3K pathway (Fig. 7). The importance of negative regulation of PTEN exerted by miR-26 resides in its phosphatase activity, thus its absence would mean more phosphorylation of its targets [22]. We were able to show (Fig. 4b) that pAKT level is increased when cells were treated with the miR-26 mimetic (i.e. lower PTEN levels lead to lowered phosphatase activity which leads to higher detection of pAKT) and decreased when

miR-26 was abolished with the anti-miRNA (i.e. higher PTEN levels lead to increased phosphatase activity leading to lower pAKT detection). Neither mir-26a or PTEN is known to affect AKT expression, therefore its levels remained expectedly unchanged.

PTEN has important role as a negative regulator of survival signaling and metastasis. Several studies have demonstrated that loss of PTEN expression contribute to CRC development and is associated with the migration aggressive capacity [23]. Correspondingly, the PI3K-AKT pathway, which is negatively regulated by PTEN is hyperactive in several cancers [24]. Loss of PTEN function has been characterized in tumors such as glioblastoma,





endometrial cancer, non-small cell lung cancer and colorectal cancer among others [25]; yet, the mechanisms that lead to it are still controversial. Recently, Lin and colleagues [26] successfully identified mechanisms such as

point mutations and promoter hypermethylation in CRC patient samples with loss of PTEN expression, but failed to identify a mechanism for more than 50% of them. Another study showed that hypermethylation of PTEN

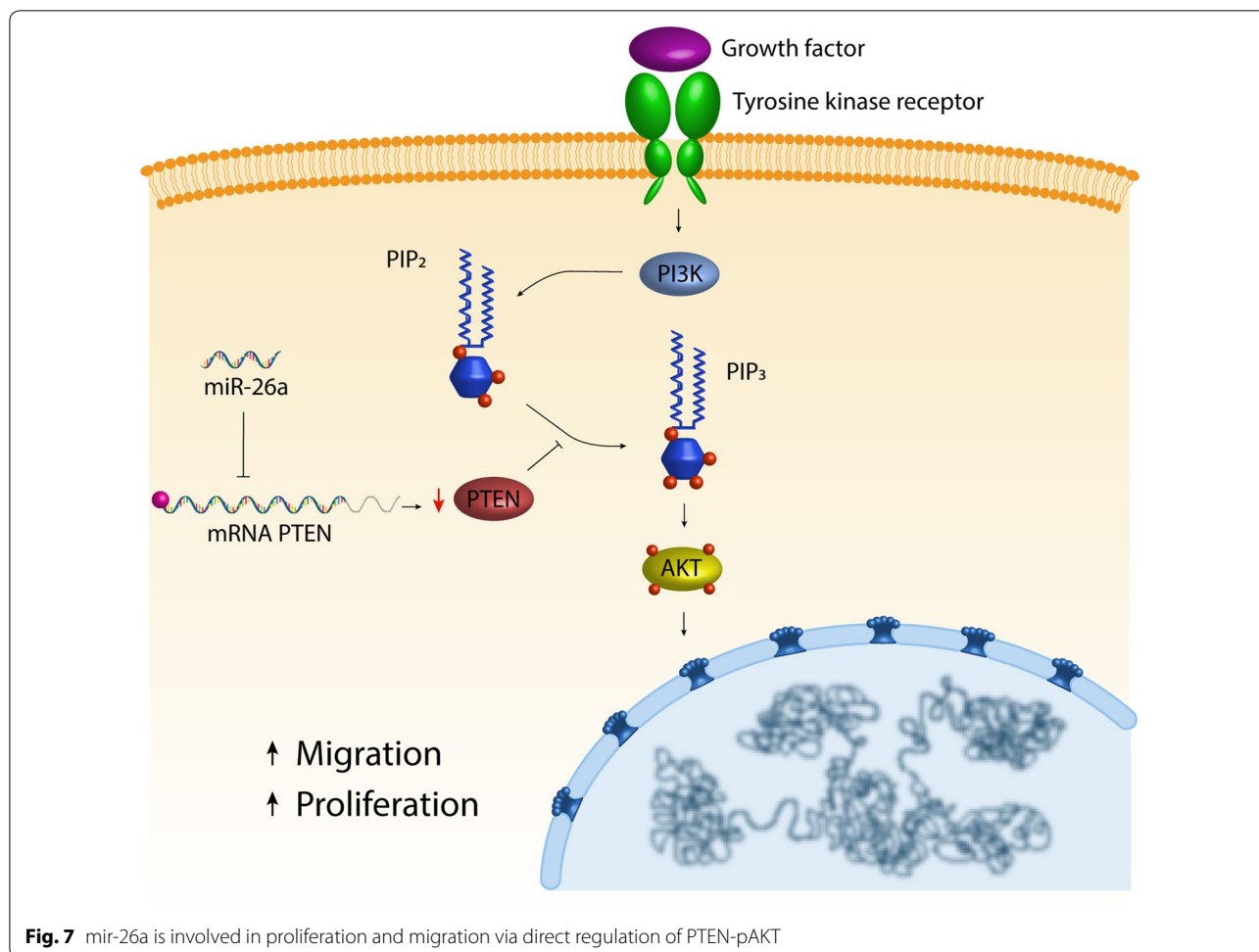


Fig. 7 miR-26a is involved in proliferation and migration via direct regulation of PTEN-pAKT

promotor occurs only in around 20% of colorectal tumors [2] indicating that other epigenetic mechanisms involved in the negative regulation of PTEN are unclear. Concurrently, several groups have found that the PTEN mRNA is subject to tight miRNA regulation, for instance, it is downregulated by miR-4534 in prostate cancer [27], and miR-29a in breast cancer [28]. Huse and colleagues were able to show that miR-26 targets and induces the degradation of PTEN in high grade glioma tumors [7] and Liu in 2012 demonstrated that miR-26a overexpression enhances migration and invasion process through wound healing and invasion chamber assays respectively, in lung cancer cells by targeting PTEN [29]. But the evidence from lung and colorectal cancer is most interesting; In lung cancer, PTEN is downregulated also by miR-21 [30], miR-205 [31], and miR-92a [32]; while in colorectal cancer, it is regulated by miR-21 [33], miR-92a [34] and miR-106b [35]. To our knowledge, we show for the first-time a negative regulation of PTEN exerted by miR-26a in colorectal cancer.

We found the lowest mRNA and protein expression in SW620 cell line, compared to the other lines used in this study. Interestingly, there was an inverse correlation as this same cell line showed the highest miR-26a levels. HCT116 cell line represents a primary tumor in early stage, in this cell line we did not observe a correlation between miR-26a and PTEN, suggesting another mechanism on PTEN regulation. There are other miRNAs that only are transcribed in primary stages, such as miR-32, miR-200c and miR-221/222. These miRNAs are highly expressed in HCT116, HT-29 [36] and Dukes' A CRC samples (where HT-29 cells and Dukes' A samples represent a primary tumor stage) and downregulated in SW480, SW620 and Dukes' D CRC samples. Therefore, PTEN is regulated by these miRNAs and their overexpression is caused by oncogenic K-RAS mutation, a key event in early CRC development [37]. On the other hand in the cell lines SW480 and SW620 which represent the most advanced stage our data suggested that the miR-26a-PTEN regulation takes place in that stage. This fact could explain the variations in the PTEN

expression after mimic and inhibitor transfection in these lines [38]. Our findings complement this data, proving that PTEN is regulated by miR-26a as well. So, thus far, nine different miRNAs have been found to regulate PTEN in CRC: miR-21, miR-92a, miR-106b, miR-32, miR-200c, miR-221/222 and miR-26a. This highlights the importance of PTEN downregulation as a means to achieve cell over-proliferation, and constitutes a plausible candidate for the missing mechanism in the aforementioned work [26].

Chronic inflammatory process is a key event in colorectal CRC development, due to activated inflammatory cells produce reactive oxygen species and reactive nitrogen intermediates which are able to induce DNA damage and mutations. Also, in CRC has been observed immune cells enhance cytokine production and growth factors, causing oxidative damage and epigenetic silencing of tumor suppressor genes [39]. In our results, we noticed that miR-26a expression is slightly higher in Crohn's disease than healthy tissue, however this result is not statistically significant. Moreover, levels of miR-26a has been found overexpressed in inactive colonic mucosa of patients with ulcerative colitis and Crohn's disease and it has been considered as a crucial player in these diseases and miR-26 can be used as good diagnostic biomarker [40].

Besides, miR-26a is an important pro-oncogenic regulator on its own, its downregulation impacts several processes that promote the establishment of tumoral phenotype, such as cell proliferation, cellular senescence, cell migration and metastasis [41]. Particularly in CRC, it has been reported to target PDHX [42], Rb1 [14], and, as per the data that we present in this work, PTEN. It has also been demonstrated that PTEN downregulation enhances epithelial-mesenchymal transition by a direct Wnt/B-catenin pathway activation in CRC [43]. Strikingly, GSK3-B—a negative key regulator of this pathway—is also a miR-26a target [8]. Mir-26a has been described as a crucial factor in the regulation of cell death, having a dual function showing a tissue-specific function. In human oral cancer cells, metformin treatment trigger miR-26a overexpression resulting in apoptosis induction [44]. Another study showed this miRNA have a protective role in ethanol-induced acute liver injury through enhancing autophagy by means of regulating DUSP4 and DSP5, two MAPKs inhibitors [45]. Moreover, in our results downregulation of miR-26a significantly reduced cell proliferation, it could be due to lack of miR-26a induces cell death. In hepatocellular carcinoma, overexpression of miR-26a/b inhibits autophagy induced by doxorubicin treatment through regulate ULK1 expression and also induces apoptosis to enhance cell chemosensitivity; On the other hand, low level of

mir-26a confers chemoresistance via autophagy induction when cells were treated with doxorubicin [46]. To our knowledge the role of miR-26 related to cell death or cell cycle arrest in CRC deserves new studies, but this growing body of evidence shows how important a regulator is miR-26a in colorectal cancer development: so far it is known to play a role in cancer cell metabolism, cell migration, and cell proliferation. Then, the question arises as to whether there are more miR-26a targets and how they interact with each other toward the generation and/or maintenance of the tumoral phenotype in CRC.

Conclusions

Overall our data suggested that miR-26a could be used as a biomarker of tumor development in CRC patients, however more studies must be conducted to establish its clinical role. Future studies will both validate these interactions in patient cohorts to establish miR-26a as a CRC diagnostic marker, and probably find further miR-26a targets to elucidate a complete picture of the miR-26a regulation network that drives CRC development.

Authors' contributions

Conceptualization, JC-H, EL-U, CP-P; Methodology, JC-H, EL-U; Software, AM-G; Validation, MR-M, AC-P; Investigation, JC-H, EL-U, CC-R, ID-W, GF-G, AC-P, RS-G; Writing-Original Draft Preparation, JC-H, EL-U, CP-P; Writing-Review & Editing, JC-H, EL-U, CP-P; Supervision, NJ-H, LI-T, AS-C, CL-C; Project Administration, CP-P; Funding Acquisition, EL-U, CP-P. All authors read and approved the final manuscript.

Author details

¹ Laboratorio de Genómica Funcional, Unidad de Biomedicina, FES-IZTACALA, UNAM, Tlalnepantla, Mexico. ² Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No 22, Col. Sección XVI, Tlalpan, Zip code 14080 Mexico City, DF, Mexico. ³ Unidad de Bioquímica, Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición, Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico City, DF, Mexico. ⁴ Laboratorio de Inmunología de Parásitos, Unidad de Biomedicina, FES-IZTACALA, UNAM, Tlalnepantla, Mexico. ⁵ Laboratorio de Genética, Genómica y Bioinformática, Hospital Infantil de México, Mexico City, Mexico. ⁶ Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City, Mexico. ⁷ Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico.

Acknowledgements

J. Coronel-Hernández is a doctoral student from Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received fellowship 402278 from CONACYT.

Competing interests

All authors declare that they have no competing interests.

Availability of data and materials

The datasets analysed during the current study are available were sourced from the publicly available The Cancer Genome Atlas and Protein Atlas repositories <https://cancergenome.nih.gov>; <https://www.proteinatlas.org>. All other data generated or analysed during this study are included in this published article.

Animal ethics Committee

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the Facultad de Estudios Superiores Iztacala-UNAM. Twelve female Balb/c mice (Harlan Laboratories, México) aged 6 weeks used in this study were maintained at Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Animal Facility according to the institutional animal care guidelines (Number of Approval FES-2016-1423).

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

All procedures performed in studies involving human samples were in accordance with the ethical standards of the Instituto Nacional de Cancerología (National Cancer Institute, Mexico) and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards. Present investigation was approved by ethics committee (Approval Number INCAN/CI/826/17). None of the authors had access to potentially identifying information from the donors of the paraffin-embedded samples.

Funding

This work was partially funded by PAPCA (Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera) program, FES Iztacala-UNAM PAPCA-2014-6. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Received: 28 November 2018 Accepted: 23 March 2019

Published online: 02 April 2019

References

- Keniry M, Parsons R. The role of PTEN signaling perturbations in cancer and in targeted therapy. *Oncogene*. 2008;27(41):5477–85. <http://www.nature.com/articles/onc2008248>.
- Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D, Carethers JM, Dowell JM, Wasserman L, et al. Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res*. 2004;64(214):3014–21.
- Molinari F, Frattini M. Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer. *Front Oncol*. 2013;3(January):326. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00326/abstract>.
- Bartel DP, Lee R, Feinbaum R. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281–97.
- Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014;20(8):460–9. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>.
- Liu J, Zheng M, Tang Y, Liang X, Yang Q. microRNAs, an active and versatile group in cancers. *Int J Oral Sci*. 2011;3(4):165–75. <http://www.nature.com/ijos/journal/v3/n4/abs/ijos201123a.html>.
- Huse JT, Brennan C, Hambarzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard SH, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev*. 2009;23(11):1327–37.
- Zhang J, Han C, Wu T. MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin. *Gastroenterology*. 2012;143(1):1–19.
- Shen W, Song M, Liu J, Qiu G, Li T, Hu Y, et al. MiR-26a promotes ovarian cancer proliferation and tumorigenesis. *PLoS ONE*. 2014;9(1):e86871.
- Batchu RB, Gruzdyn OV, Qazi AM, Kaur J, Mahmud EM, Weaver DW, et al. Enhanced phosphorylation of p53 by microRNA-26a leading to growth inhibition of pancreatic cancer. *Surgery*. 2015;158(4):981–7. <https://doi.org/10.1016/j.surg.2015.05.019>.
- Chai ZT, Kong J, Zhu XD, Zhang YY, Lu L, Zhou JM, et al. MicroRNA-26a inhibits angiogenesis by down-regulating VEGFA through the PI3K2 α /Akt/HIF-1 α pathway in hepatocellular carcinoma. *PLoS ONE*. 2013;8(10):1–12.
- Lu J, He ML, Wang L, Chen Y, Liu X, Dong Q, et al. MiR-26a inhibits cell growth and tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma through repression of EZH2. *Cancer Res*. 2011;71(1):225–33.
- Yang L, Belaguli N, Berger DH. MicroRNA and colorectal cancer. *World J Surg*. 2009;33(4):638–46. <https://doi.org/10.1007/s00268-008-9865-5>.
- López-Urrutia E, Coronel-Hernández J, García-Castillo V, Contreras-Romero C, Martínez-Gutiérrez A, Estrada-Galicia D, et al. MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer. *Tumor Biol*. 2017;39(4):101042831769594. <https://doi.org/10.1177/1010428317695945>.
- Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Vlassov A, et al. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA*. 2013;19:230–42.
- Sachdeva M, Mito JK, Lee CL, Zhang M, Li Z, Dodd RD, et al. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes. *J Clin Invest*. 2014;124(10):4305–19.
- Chen J, Yan D, Wu W, Zhu J, Ye W, Shu Q. MicroRNA-130a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of osteosarcoma by targeting PTEN. *Oncol Rep*. 2016;35(6):3285–92. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4719>.
- Tian K, Di R, Wang L. MicroRNA-23a enhances migration and invasion through PTEN in osteosarcoma. *Cancer Gene Ther*. 2015;22(7):351–9. <https://doi.org/10.1038/cgt.2015.27>.
- Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardisnoglou A, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science*. 2015;347(6220):1260419. <https://doi.org/10.1126/science.1260419>.
- Figueroa-gonzález G, García-castillo V, Coronel-hernández J, León-cabrera S, Arias-romero LE, Terrazas LI, et al. Anti-inflammatory and antitumor activity of a triple therapy for a colitis-related colorectal cancer. *J cancer*. 2016;7:1632.
- Betel D, Wilson M, Gabow A, Marks DS, Sander C. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*. 2007;36(Database):D149–53. <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkm995>.
- Lee Y-R, Ming C. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor: new modes and prospects. *Science*. 2017;355(6320):64–7. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0015-0>.
- Sawai H, Yasuda A, Ochi N, Ma J, Matsuo Y, Wakasugi T, et al. Loss of PTEN expression is associated with colorectal cancer liver metastasis and poor patient survival. *BMC Gastroenterol*. 2008;8:56. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2611992&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Carracedo A, Pandolfi PP. The PTEN–PI3K pathway: of feedbacks and cross-talks. *Oncogene*. 2008;27(41):5527–41. <http://www.nature.com/articles/onc2008247>.
- Parsons R. Human cancer, PTEN and the PI-3 kinase pathway. *Semin Cell Dev Biol*. 2004;15(2):171–6.
- Lin P-C, Lin J-K, Lin H-H, Lan Y-T, Lin C-C, Yang S-H, et al. A comprehensive analysis of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) loss in colorectal cancer. *World J Surg Oncol*. 2015;13:186.
- Nip H, Dar AA, Saini S, Colden M, Varahram S, Chowdhary H, et al. Oncogenic microRNA-4534 regulates PTEN pathway in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(42):68371–84. <http://www.oncotarget.com/fulltext/12031>.
- Shen H, Li L, Yang S, Wang D, Zhong S, Zhao J, et al. MicroRNA-29a contributes to drug-resistance of breast cancer cells to adriamycin through PTEN/AKT/GSK3 β signaling pathway. *Gene*. 2016;593(1):84–90.
- Liu B, Wu X, Liu B, Wang C, Liu Y, Zhou Q, et al. MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2012;1822(11):1692–704.
- Zhang J, Wang J, Zhao F, Liu Q, Jiang K, Yang G. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta*. 2010;411(11–12):846–52.
- Bai J, Zhu X, Ma J, Wang W. miR-205 regulates A549 cells proliferation by targeting PTEN. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1175–83.
- Ren P, Gong F, Zhang Y, Jiang J, Zhang H. MicroRNA-92a promotes growth, metastasis, and chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by targeting PTEN. *Tumor Biol*. 2016;37(3):3215–25. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4150-3>.
- Yang Y, Yang JJ, Tao H, Jin W. MicroRNA-21 controls hTERT via PTEN in human colorectal cancer cell proliferation. *J Physiol Biochem*. 2015;71(1):59–68.
- Ke T-W, Wei P-L, Yeh K-T, Chen WT-L, Cheng Y-W. MiR-a promotes cell metastasis of colorectal cancer through PTEN-mediated PI3K/AKT pathway. *Ann Surg Oncol*. 2015;22(8):2649–55.

35. Zheng L, Zhang Y, Liu Y, Zhou M, Lu Y, Yuan L, et al. MiR-106b induces cell radioresistance via the PTEN/PI3K/AKT pathways and p21 in colorectal cancer. *J Transl Med*. 2015;13(1):252.
36. Wu W, Yang J, Feng X, Wang H, Ye S, Yang P, et al. MicroRNA-32 (miR-32) regulates phosphatase and tensin homologue (PTEN) expression and promotes growth, migration, and invasion in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer*. 2013;32:1–11.
37. Tsunoda T, Takashima Y, Yoshida Y, Doi K, Tanaka Y, Fujimoto T, et al. Oncogenic KRAS regulates miR-200c and miR-221/222 in a 3D-specific manner in colorectal cancer cells. *Anticancer Res*. 2011;31(7):2453–9.
38. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, et al. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2013;2:0424.
39. Terzić J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2101–14.
40. Balzola F, Bernstein C, Ho GT, Lees C. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease: commentary. *Inflamm Bowel Dis Monit*. 2011;11(3):126–7.
41. Chen J, Zhang K, Xu Y, Gao Y, Li C, Wang R, et al. The role of microRNA-26a in human cancer progression and clinical application. *Tumor Biol*. 2016;1:1–14. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5017-y>.
42. Chen B, Liu Y, Jin X, Lu W, Liu J, Xia Z, et al. MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells. *BMC Cancer*. 2014;14(1):443.
43. Kariagina A, Aupperlee MD, Haslam SZ. PTEN loss induces epithelial–mesenchymal transition in human colon cancer cells. 2010;18(1):11–33.
44. Wang F, Xu J, Liu H, Liu Z, Xia F. Metformin induces apoptosis by microRNA-26a-mediated downregulation of myeloid cell leukaemia-1 in human oral cancer cells. *Mol Med Rep*. 2016;13(6):4671–6.
45. Han W, Fu X, Xie J, Meng Z, Gu Y, Wang X, et al. miR-26a enhances autophagy to protect against ethanol-induced acute liver injury. *J Mol Med*. 2015;93(9):1045–55.
46. Jin F, Wang Y, Li M, Zhu Y, Liang H, Wang C, et al. MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. *Cell Death Dis*. 2017;8(1):e2540. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.461>.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



MiR-26a downregulates retinoblastoma in colorectal cancer

Tumor Biology

April 2017: 1–9

© The Author(s) 2017

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/1010428317695945

journals.sagepub.com/home/tub

Eduardo López-Urrutia¹, Jossimar Coronel-Hernández¹,
Verónica García-Castillo¹, Carlos Contreras-Romero¹,
Antonio Martínez-Gutierrez¹, Diana Estrada-Galicia¹, Luis Ignacio
Terrazas², César López-Camarillo³, Hector Maldonado-Martínez⁴,
Nadia Jacobo-Herrera⁵ and Carlos Pérez-Plasencia^{1,6}

Abstract

MicroRNAs are non-coding short RNAs that target the 3' untranslated region of messenger RNAs (mRNAs) and lead to their degradation or to translational repression. Several microRNAs have been designated as oncomirs, owing to their regulating tumor suppressor genes. Interestingly, a few of them have been found to target multiple genes whose simultaneous suppression contributes to the development of a tumoral phenotype. Here, we have showed that miR-26a is overexpressed in colorectal cancer data obtained from TCGA Research Network and in human colon cancer pathological specimens; moreover, an orthotopic in vivo model of colon cancer showed overexpression of miR-26a, while *Rb1* expression inversely correlated to miR-26a in TCGA Research Network data, pathological samples, and the in vivo model. Then, by means of luciferase assay, we demonstrated that miR-26a targets the 3' untranslated region of *Rb1* mRNA directly. This is, to our knowledge, the first report of miR-26a targeting *Rb1* in colon cancer. The results of this study suggested that miR-26a could serve as a progression biomarker in colorectal cancer. Further validation studies are still needed to confirm our findings.

Keywords

microRNA-26, colorectal cancer, retinoblastome protein

Date received: 4 October 2016; accepted: 23 December 2016

Introduction

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding short RNAs that target the 3' untranslated region (3'UTR) of mRNAs and lead to their degradation or to translational repression;¹ despite their relatively recent discovery, they are widely recognized as important post-transcriptional regulators. They exert their functions by binding to the 3' UTR of their target mRNA through complete or partial base complementarity and thus are rather promiscuous and capable of pleiotropic effects (extensively reviewed in Liu et al.² and Hayes et al.³). Several miRNAs have been designated as oncomirs, owing to their regulating tumor suppressor genes. Interestingly, a few of them have been found to target multiple genes whose simultaneous suppression contributes to the development of a tumoral phenotype.⁴ For instance, miR-182-5p targets *BRCA1*, *RGS17*, and *FOXO3*, three genes involved in DNA repair,⁵ and drives metastasis

¹Laboratorio de Genómica Funcional, Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalnepantla, México

²Laboratorio de Inmunología, Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Tlalnepantla, Mexico

³Posgrado en Ciencias Genómicas, Universidad Autónoma de la Ciudad de México, Mexico City, Mexico

⁴Dirección de Patología, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México

⁵Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional De Ciencias Médicas Y Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, Mexico

⁶Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Tlalpan, México

Corresponding author:

Carlos Pérez-Plasencia, Laboratorio de Genómica, Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No 22, Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, México.

Email: carlos.pplas@gmail.com



of primary sarcomas by targeting genes such as *Rsul*, *Mtss1*, *Pail*, and *Timp1*, implicated in cytoskeleton remodeling and cell migration.⁶

Deep understanding of these genetic regulation networks is remarkably important in complex diseases such as colorectal cancer (CRC)—the world's fourth most deadly cancer, which takes almost 700,000 lives every year⁷—so as to gain insight into their multifactorial origin, development, and response to treatment. Among several miRNAs upregulated in CRC,⁸ miR-26a is particularly interesting. Besides established roles as a gene expression modulator in smooth cell function,⁹ pancreatic cell differentiation,¹⁰ and even miRNA biogenesis,¹¹ published evidence show that miR-26 plays a significant role in cancer development. However significant, the role that miR-26a plays in carcinogenesis seems highly context-dependent based on the current evidence: it has been demonstrated that its overexpression promotes cholangiocarcinoma by targeting *GSK3A*¹² and glioma by targeting *PTEN*;¹³ on the other hand, it has been found to be underexpressed in miRNA profiles of renal cell carcinoma¹⁴ and liver cancer¹⁵ and to drive esophageal adenocarcinoma development by targeting *Rb1*.¹⁶ These data show that the particular function of miR-26a in CRC development cannot be inferred, but must be analyzed directly. Currently, it is known that it targets *PDHX* and modifies glucose metabolism,¹⁷ but whether it actually targets known CRC-related genes such as *PTEN*, *GSK3A*, and *Rb1* in CRC development remains to be explored; in this article, we do so with the miR-26a *Rb1* interaction.

The retinoblastoma (Rb1) protein is one of the first described tumor suppressors,¹⁸ and its loss of function is considered one of the hallmarks of cancer.¹⁹ Although Rb1 has a well-described role in carcinogenesis,²⁰ its role in CRC is less clear. Its expression is heterogeneous in CRC samples,^{21,22} so it cannot be considered a bona fide molecular marker for this neoplasm,²³ but recent works have demonstrated that the lack or inactivation of Rb1 can drive colorectal tumor development.^{24,25} So we find it reasonable to infer that Rb1 downregulation is not only a consequence of overall gene dysregulation in CRC, but also an important element in its development. Such downregulation is, evidently, part of a tightly controlled network in which miRNAs may play an important role due to their negative regulator nature.

We have successfully applied the model of chronic inflammation-associated CRC²⁶ to analyze molecular events involved in colon carcinogenesis. Thus, BALB/c mice were induced to develop—through carcinogen azoxymethane (AOM) followed by three cycles of dextran sulfate sodium—an orthotopic colon tumor. Here, we have showed that miR-26a is overexpressed in both tumor murine samples and human pathological specimens; meanwhile, *Rb1* expression inversely correlated to miR-26a. Then, we demonstrated that miR-26a targets the 3' UTR of

Rb1 mRNA directly. This is, to our knowledge, the first report of miR-26a targeting *Rb1* in colon cancer.

Material and methods

Patient samples

Twenty CRC paraffin-embedded tissue samples staged locally advanced and, for comparison with neoplasia-free tissues, 10 Crohn's disease paraffin-embedded tissue samples were obtained from INCAN (Instituto Nacional de Cancerología—National Cancer Institute, Mexico) pathology registry.

CRC mouse model

Twelve female BALB/c mice (Harlan Laboratories) aged 6 weeks were used in this study. They were maintained at Facultad de Estudios Superiores Iztacala Animal Facility according to the institutional animal care guidelines. All animals were housed in plastic cages (3 mice/cage) with drinking water and pelleted basal diet ad libitum under controlled humidity (50±10%), light (12/12 h light/dark cycles), and temperature (23±2°C). They were quarantined for the first 7 days and then randomized by body weight into an experimental (n=6) and one control (n=3) group. Both groups were administered a single intraperitoneal injection (12.5 mg/kg body weight) of a colonic carcinogen AOM from Sigma-Aldrich. One week after the injection, animals were subjected to three Dextran Sulfate Sodium Salt (DSS) cycles for colitis induction. Each DSS cycle consisted of a week-long administration of reagent-grade DSS with a molecular weight of 36,000–50,000 (MP Biomedicals), dissolved in the drinking water at a concentration of 2% (w/v), followed by 2 weeks without treatment.

Three mice were euthanized after each DSS dose so as to monitor mRNA and protein expression throughout cancer development. After euthanasia, large bowels were flushed with saline and excised. Inflammation-related cancer development was confirmed by histological analysis as previously reported.²⁶

Cell culture and transfection

CRC-derived HCT116 cells (ATCC CCL-247) were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI medium) supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and maintained at 37°C with 5% CO₂. CRC-derived SW620 (ATCC CCL-227) and normal colon-derived CRL1790 (ATCC CRL1790) cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) medium supplemented with 10% (v/v) fetal bovine serum and maintained at 37°C with 5% CO₂.

All plasmids used for this study were transfected using Lipofectamine 2000 transfection agent (Invitrogen), following the manufacturer's protocol. MicroRNA mimics and inhibitors were transfected using the siPORT NeoFX transfection agent (Life Technologies) following the manufacturer's protocol. For functional assays, we transfected an miR-26a mimic or an miR-26a anti-miRNA, as well as an unrelated miRNA (miR-1) or a scrambled 20-nt sequence as control (all of them purchased from Ambion).

RNA expression analysis

MiRNAs were isolated from paraffin-embedded tissue samples using the miRNeasy FFPE kit (Qiagen) following the manufacturer's recommendations. Large bowel parts of each experimental group mice were homogenized by triplicate in a Bullet Blender (Next Advance) following the manufacturer's protocol for intestinal tissue. Total RNA was isolated from the homogenized samples or from cultured cells (CRL1790, HCT116, or SW620 grown to approximately 80%–85% confluence), using the TRIzol reagent (Invitrogen) following the manufacturer's protocol.

Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed in the murine model samples using a Roche Light Cycler 2.0. MiR-26a and its putative target genes were detected in tissue samples using the TaqMan Universal Master Mix II kit and the mir-26a TaqMan probe (Applied Biosystems) or the Titan One RT-PCR kit (Roche) supplemented with SYBR Green and the corresponding primers (primer information available upon request). Amplification conditions were as follows: for miR-26a, complementary DNA (cDNA) was generated from 100 ng total RNA with the TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) in a 15 μ L volume; quantitative polymerase chain reaction (qPCR) was performed using a microliter, denatured for 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 68°C for 60 s. For mRNA detection, we used the Titan One RT-PCR kit (Roche) supplemented with SYBR Green. cDNA was synthesized at 50°C for 30 min, immediately followed by denaturation at 94°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 10 s, primer-dependent annealing temperature for 30 s and 68°C for 45 s, and a final extension at 68°C for 7 min.

MiR-26a or the *Rb1* messenger was detected in cultured cells and paraffin-embedded tissue samples using the Bio-Rad CFX 96 Touch and the mir-26a TaqMan probe (Applied Biosystems) or the SYBR Select Master Mix for CFX (Applied Biosystems). Amplification conditions for miR-26a were as mentioned above. For mRNA detection, cDNA was synthesized from 2 μ g total RNA using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Roche); one-twentieth of this reaction was used for qPCR. Amplification conditions were 2 min at 95°C for initial denaturation, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, primer-dependent annealing temperature for 15 s, and 72°C for 60 s.

Relative expression data were calculated through the $\Delta\Delta$ Ct method (Applied Biosystems), normalized relative to U6 snRNA (small nuclear RNA) or glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA accordingly.

Protein expression analysis

Protein extracts from large bowel parts of each experimental mouse group of cultured cells were obtained by homogenization in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA buffer; Santa Cruz Biotechnology); a Bullet Blender (Next Advance) and stainless steel beads were used for bowel tissues. Protein extract was cleared by centrifugation at 12,000 rpm for 20 min.

For immunodetection, 50 μ g total protein from tumor tissue or cultured cells was mixed with Laemmli sample buffer, boiled, separated in 12% or 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and transferred onto a Hybond-P polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Amersham-GE Healthcare). Membranes were probed overnight using a 1:500 (v/v) dilution of anti-Rb1 (Sc-50); for detection, 1:2500 (v/v) dilutions of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-rabbit or anti-mouse antibodies (Santa Cruz Biotechnology) were used. Finally, using the SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate (Thermo Scientific), the membranes were scanned in the C-Digit blot scanner (Li-Cor), and the images were analyzed for densitometry in the associated ImageStudio software (Li-Cor). Membranes were stripped and re-probed for detection of actin (anti-actin, Sc-47778) as a loading control. A representative image from three independent experiments is shown.

Luciferase reporter assays

Reporter plasmids were constructed by ligation of synthetic oligonucleotide duplexes (IDT) containing putative miR-26a target regions in the *Rb1* 3'UTR, 5'-CTA GTT AAG TAC CCA TGT AGT ACT TGA AA-3' and 5'-AGC TTT TCA AGT ACT ACA TGG GTA CTT AA-3', obtained from microRNA.org,²⁷ into the pMIR-REPORT plasmid (Ambion). This construct was co-transfected with miR-26a mirVana miRNA mimic (Applied Biosystems) and the pMIR-REPORT β -gal Control Plasmid (Ambion) into HCT116 cells. Luciferase activity was analyzed using the Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) 48 h after transfection in a GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega). Luciferase activity was normalized to β -gal activity for each transfected well; each experiment was performed in triplicate.

Tissue expression meta-analysis

Antibody-based proteomic data of 3 normal colon tissue and 11 CRC samples were obtained from The Human Protein

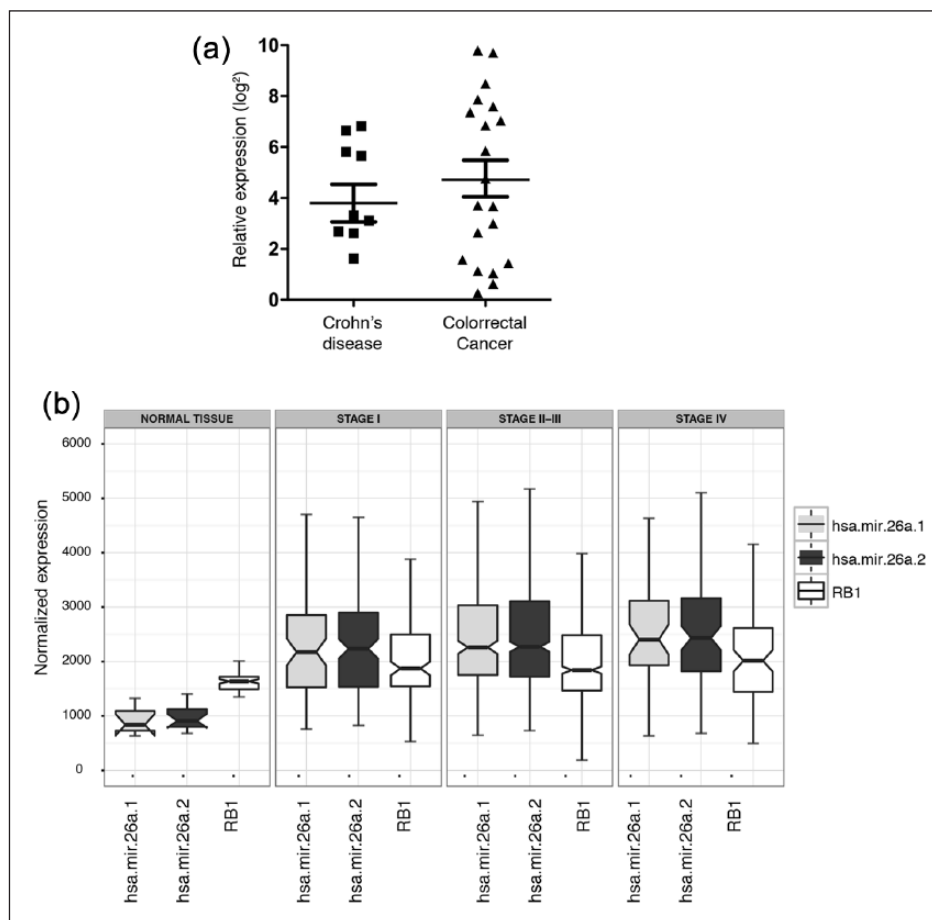


Figure 1. MiR-26a overexpression in CRC. (a) Detection of miR-26a in 20 CRC and 10 Crohn's disease samples normalized by RNU6 expression; higher miR-26a levels were found in CRC samples. (b) Meta-analysis of miR-26a1, MiR-26a2, and *Rb1* expression values from 42 normal colon samples and 76, 305, and 46 colorectal tumors of stages I, II–III, and IV; miR-26a expression was lower than that of *Rb1* in normal tissue and higher in CRC samples.

Atlas.²⁸ Antibody staining intensity was compared between healthy and cancer tissues from the *Rb1* entry.

MiR-26a1, MiR-26a2, and *Rb1* expression values from 42 normal colon samples and 76, 305, and 46 colorectal tumors of stages I, II–III, and IV, respectively, were downloaded from TCGA Research Network RNAseq V2 (cancergenome.nih.gov; 29) and graphed as normalized total counts.

Statistical analysis

All values are expressed as the mean \pm standard error of the mean (SEM). Data were analyzed in the Prism 5.0 (GraphPad) software using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test.

Results

MiR-26a overexpression in tissue samples

We assessed miR-26a expression in CRC-derived paraffin-embedded tissue samples and found wide variation in

expression levels; however, the maximum expression values were higher than those observed in the Crohn's disease tissue samples that we analyzed as neoplasia-free controls due to the difficulties of obtaining healthy tissue biopsies (Figure 1(a)). Analysis of data sourced from the TCGA Research Network²⁹ yielded consistent results: miR-26a was overexpressed in CRC samples relative to normal colon tissues. Interestingly, we found that *Rb1* was expressed at a higher level than miR-26a in CRC, as opposed to normal tissue, where its expression was higher (Figure 1(b)). Previous studies have already described miR-26a overexpression in Crohn's disease,³⁰ so we reasoned that the overall tendency to a higher expression of miR-26 in CRC compared to normal tissue and the pre-malignant Crohn's disease merited further investigation.

AOM/DSS-induced CRC mouse model

We established a CRC model suitable for miR-26a expression studies. All experimental groups received a single dose of a colonic genotoxic carcinogen (AOM) and

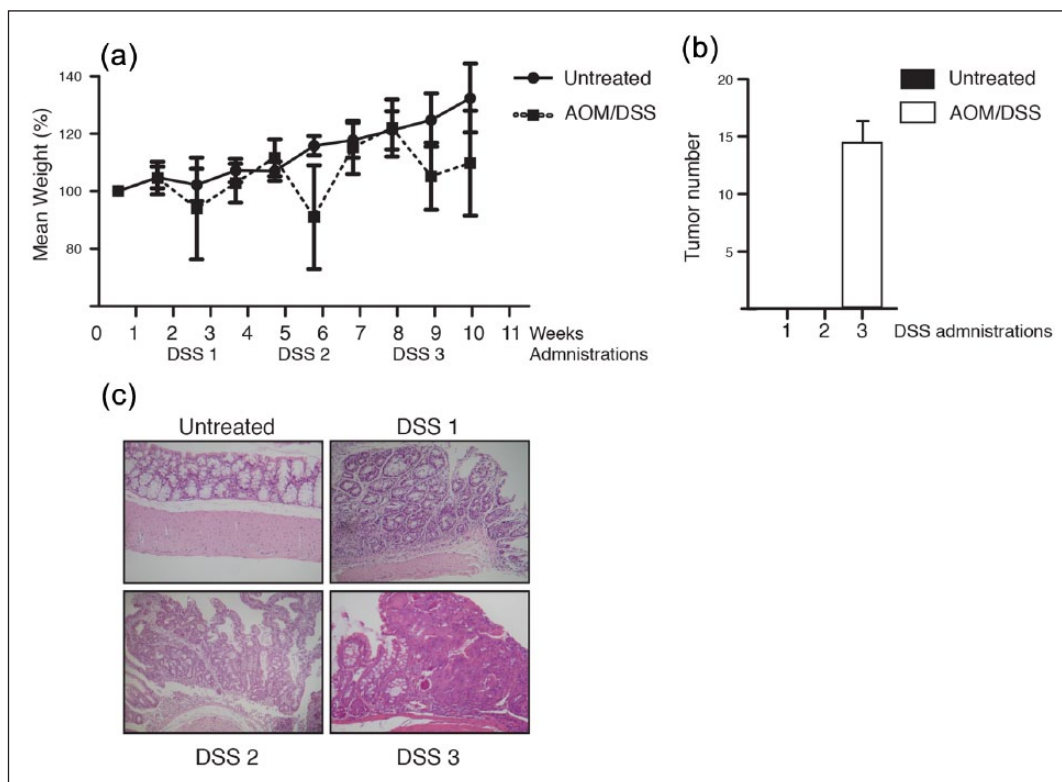


Figure 2. AOM/DSS-derived CRC mouse model. (a) Mean weight increment of the mice subject to the AOM/DSS treatment. (b) Average tumor number observed after each DSS administration. (c) Representative histological analysis of the large bowel during the progression of the model.

repeated exposure to a colitis inducer (DSS), which caused the tumor development. The mean weight of the animals decreased with each DSS administration (Figure 2(a)), and tumors were observed after the third one (DSS 3, Figure 2(b)). Histological analysis confirmed these results, revealing a generalized loss of epithelial morphology throughout the DSS cycles. After the second DSS administration, we observed 1C chronic intestinal inflammation and slight crypt distortion with epithelial hyperplasia, and after the third DSS dose, formation of adenomas composed of tubular and villous structures lined by epithelium with high grade of dysplasia was observed (Figure 2(c)). In-depth analysis of these tumors was published recently in another article from our group.²⁶

MiR-26a targets and *Rb1* mRNA in an AOM/DSS-induced CRC mouse model

Expression analysis for miR-26a and the *Rb1* messenger was performed after each DSS administration. The results are shown in Figure 2: miR-26a expression levels remained unchanged after the first DSS cycle, showed a modest increase after DSS 2, and increased around sixfold after DSS 3 (Figure 3(a)). This increase corresponded to previous findings about an augmented miR-26a expression in CRC. We next assessed *Rb1* mRNA level at the same time points

(Figure 3(b)). *Rb1* mRNA showed a different pattern was slightly upregulated after DSS1, and its detection levels considerably diminished until the third DSS. These results showed consistency between the detection of miR-26a expression and its target *Rb1* mRNA, as the latter diminished clearly as miR-26a presence increased. Conversely, the Rb1 protein showed a modest increase through DSS 1 and 2 and only a slight but reproducible decrease after DSS 3 (Figure 3(c) and (d)). We concluded that miR-26a targets the *Rb1* mRNA causing its degradation in mouse CRC model. The discrepancy between the mRNAs and its protein product suggested further regulation of the Rb1 expression, likely a shift in translation efficiency.

Mir-26a interacts directly with the *Rb1* mRNA 3' UTR

In order to confirm whether miR-26a exerted a direct regulation on the *Rb1* messenger, we performed luciferase reporter assays in HCT116 cells transfected with an miR-26a mimic or the corresponding anti-miRNA. Figure 4(a) shows miR-26a presence in HCT116 cells transfected with the miR-26a mimic compared to its endogenous expression. Luciferase expression decreased significantly regardless of the full-length *Rb1* 3' UTR (Figure 4(b)) or only the miR-26a interaction region (Figure 4(c)),

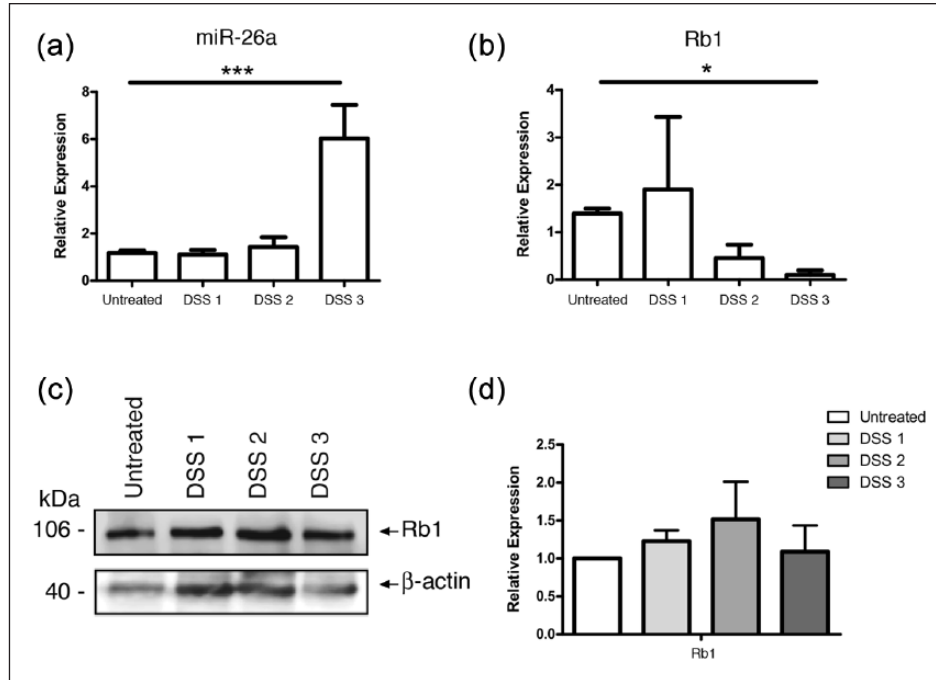


Figure 3. MiR-26a targets the Rb1 mRNA in an AOM/DSS-derived CRC mouse model. (a) MiR-26a and (b) Rb1 mRNA expression after each DSS administration, relative to the expression in untreated mice. (c) Representative image and (d) average densitometric values of Rb1 immunodetection after each DSS administration; β -actin was detected as a loading control and was used to normalize densitometric data.

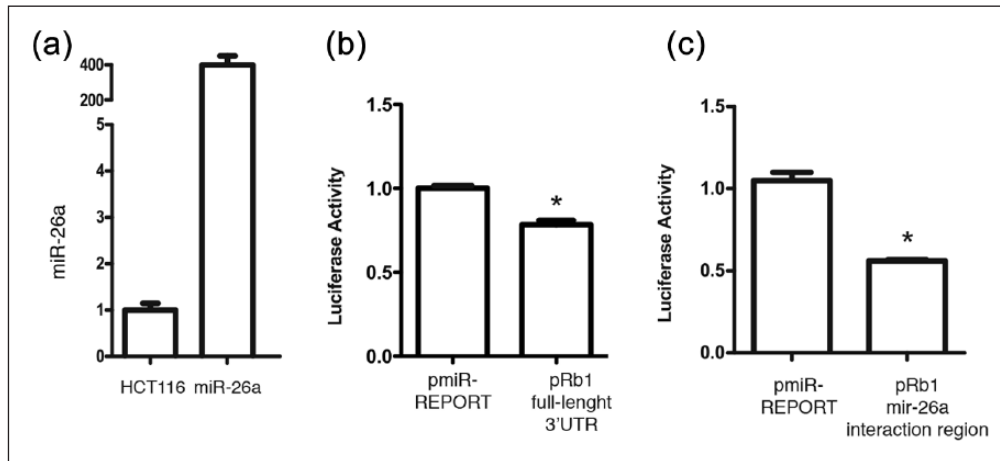


Figure 4. MiR-26a directly targets the Rb1 3'UTR. (a) MiR-26a expression in HCT116 cells transfected with a miR-26a mimic normalized to endogenous miR-26a expression in untransfected cells. (b and c) Luciferase reporter assay using the full-length Rb1 3'UTR and the miR-26a interaction region, respectively. Each experiment was performed in triplicate, and the mean values were normalized to the empty vector (pmiR-REPORT) luciferase activity.

confirming the predicted binding of miR-26a to the *Rb1* mRNA²⁷ in contrast to the context of the complete untranslated region.

CRC samples show decreased *Rb1* expression

The miR-26a/*Rb1* regulation envisioned by our experiments would only be relevant if patient samples showed

evidences of it, so we turned to The Human Protein Atlas³¹ as a means to assess Rb1 expression in a broad range of normal and cancer tissues. We found high Rb1 expression levels in 100% of the healthy colon tissues present in The Human Protein Atlas database and, in contrast, in only 60% of cancer tissue. Rb1 was present in the remaining cancer samples at either medium levels or below the detection limit (Figure 5). This evidence supports our previous

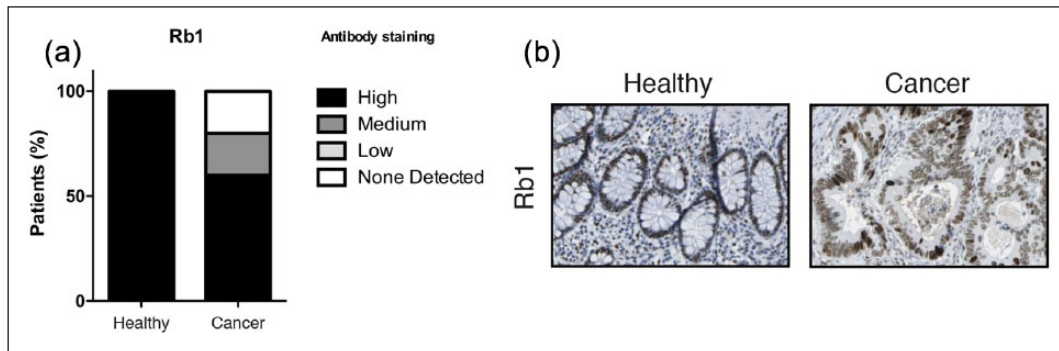


Figure 5. Rb1 underexpression in The Human Protein Atlas data set. (a) Antibody staining values found in healthy and cancer tissue samples. (b) Representative image of Rb1 immunohistochemical analysis showing reduced staining in cancer tissue.

findings, as Rb1 expression is decreased in 40% of the cancer samples.

Mir-26a regulates Rb1 in CRC-derived cell lines

We next set out to investigate whether the regulation exerted by miR-26a on the *Rb1* messenger was reproducible in human cells. First, we surveyed the expression of *Rb1* at the mRNA and protein levels in CRC-derived cell lines and the CRL1790 normal colon cell line. Consistent with expression data from normal and cancer tissues, *Rb1* expression was significantly lower in both HCT116 and SW620 cells (Figure 6(a) and (b)). When transfected with an miR-26a mimic, Rb1 expression in HCT116 cells decreased dramatically. This decrease was not observed in cells transfected with miR-1 (an unrelated control) or with a scrambled miRNA sequence; however, Rb1 expression was rescued by transfection of anti-miR-26a (Figure 6(c) and (d)). These results indicated that miR-26a downregulates the *Rb1* mRNA in the context of CRC.

Discussion

Taken together, our results show that miR-26a is an important regulator in CRC; it targets the *Rb1* messenger directly in a CRC mouse model and in CRC-derived cell lines, and decreases its protein levels.

MiR-26 is dysregulated in several cancer types: it plays tumor suppressor role in some of them such as prostate cancer and melanoma, although it is considered oncogenic in others such as cholangiocarcinoma and CRC.³² Most interesting in this regard is the work by Zhang et al.,¹⁶ which shows that miR-26a acts as a tumor suppressor in esophageal cancer by downregulating *Rb1*, while in this work, we confirmed its function as a regulator of the *Rb1* messenger but described a novel oncogenic role in CRC. This apparent discrepancy renders miRNA regulation even more astonishing, as it suggests that a given miRNA-mRNA interaction is not oncogenic or tumor suppressing per se, but can have either outcome depending on the

context. The evidence that we present here, together with the targeting of *PDHX*,¹⁷ highlights the importance of this miRNA as an oncogenic regulator in CRC.

The role of Rb1 in colorectal carcinogenesis remains controversial, as it does not show a constant dysregulation pattern among CRC samples. Palmqvist et al.³³ and Cui et al.,³⁴ among others, have found that Rb1 expression is important for CRC development, while works from Kucherlapati et al.³⁵ and Parisi et al.²⁵ show that it is the Rb1 suppression that drives colorectal tumorigenesis. This apparent discrepancy is consistent with our analysis of The Human Protein Atlas data set, where we found Rb1 in varying degrees of underexpression in about half of the tumor samples. These two tumor groups (Rb1 overexpression and suppression) have been distinguished before,³⁶ so we find it reasonable to assume that the underlying regulation network can lead to CRC development either through Rb1 over- or underexpression. Our data showed that both the colorectal tumors in our murine model and the CRC-derived cell lines that we assayed display Rb1 underexpression and thus resemble this sort of tumors.

Therefore, we propose that miR-26a modulates cell proliferation through Rb1 downregulation in CRC, due to its role in cell cycle regulation. And this function, together with the previously observed regulation of glucose metabolism through *PDHX* targeting,¹⁷ accentuates the importance of miR-26a as a multifunctional regulator in colorectal carcinogenesis.

On the other hand, Rb1 is regulated by miR-106a as well,³⁶ and this article appoints miR-26a as a second regulator of this tumor suppressor gene. Several studies are necessary to completely grasp complex regulation networks. In this one, we contribute to this understanding by reporting for the first time that the Rb1 underexpression in CRC is caused by direct interaction with miR-26a. Further studies will undoubtedly show a wider perspective of the regulation network that controls CRC development. Further validation studies employing larger number of pathological samples could help to support the utility of miR-26a as diagnostic molecular marker.

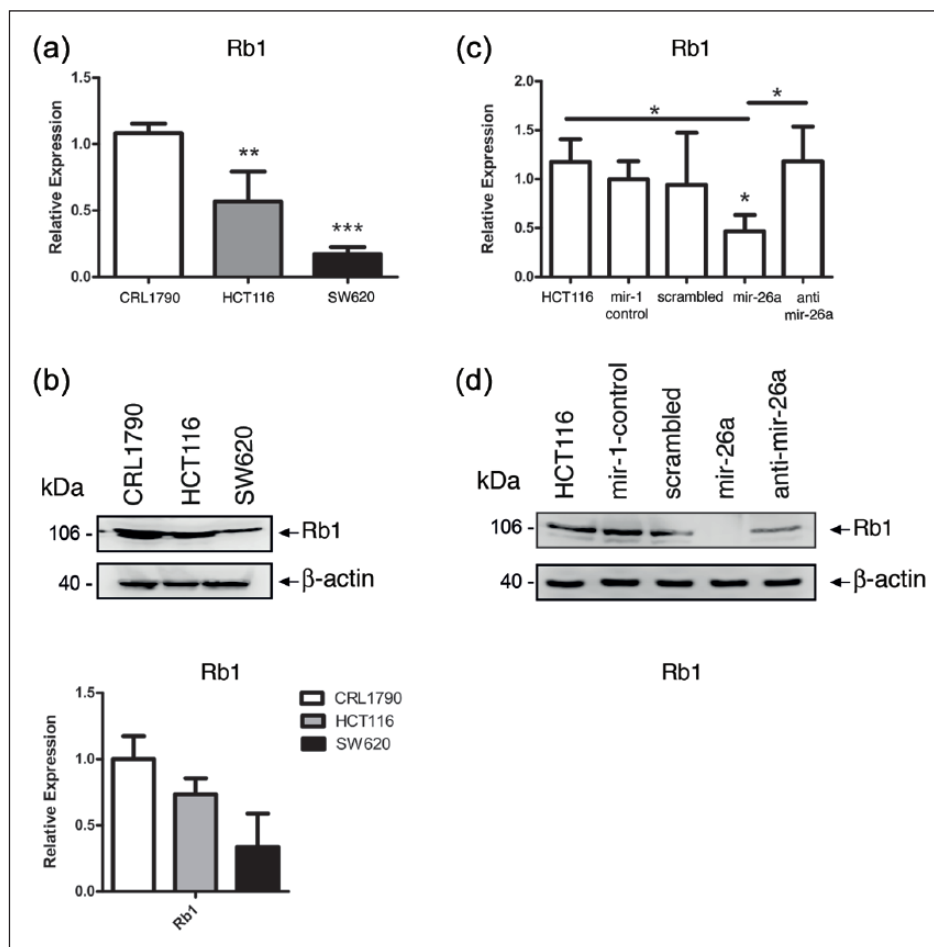


Figure 6. MiR-26a regulation over Rb1 in CRC-derived cells. (a) MiR-26a expression in HCT116 and SW620 CRC-derived cell lines relative to the CRL1790 non-tumorigenic colonic cells. (b) Representative image and average densitometric values of Rb1 immunodetection in CRC-derived cells; β -actin was detected as a loading control and was used to normalize densitometric data. (c) mRNA and (d) protein Rb1 expression in HCT116 cells transfected with an unrelated miRNA (miR-1), a scrambled 20-nt sequence, an miR-26a mimic or an miR-26a anti-miRNA normalized to untreated cells. Rb1 was downregulated only by the miR-26a mimic.

Acknowledgements

E.L.-U. and J.C.-H. contributed equally to this work.

Declaration of conflicting interests

The author(s) declared no potential conflicts of interest with respect to the research, authorship, and/or publication of this article.

Funding

The author(s) disclosed receipt of the following financial support for the research, authorship, and/or publication of this article: This work was partially funded by PAPCA (Programa de Apoyo a los Profesores de Carrera) 2014 program, FES Iztacala-UNAM.

References

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281–297.
- Liu J, Zheng M, Tang YL, et al. MicroRNAs, an active and versatile group in cancers. *Int J Oral Sci* 2011; 3: 165–175.
- Hayes J, Peruzzi PP and Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med* 2014; 20: 460–469.
- Di Leva G, Garofalo M and Croce CM. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2014; 9: 287–314.
- Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, et al. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA* 2013; 19: 230–242.
- Sachdeva M, Mito JK, Lee C-L, et al. MicroRNA-182 drives metastasis of primary sarcomas by targeting multiple genes. *J Clin Invest* 2014; 124: 4305–4319.
- Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer* 2015; 136(5): E359–E386.
- Yang L, Belaguli N and Berger DH. MicroRNA and colorectal cancer. *World J Surg* 2009; 33: 638–646.

9. Leeper NJ, Raiesdana A, Kojima Y, et al. MicroRNA-26a is a novel regulator of vascular smooth muscle cell function. *J Cell Physiol* 2011; 226: 1035–1043.
10. Fu X, Jin L, Wang X, et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(44): 17892–17897.
11. Fu X, Meng Z, Liang W, et al. MiR-26a enhances miRNA biogenesis by targeting Lin28B and Zcchc11 to suppress tumor growth and metastasis. *Oncogene* 2014; 33: 4296–4306.
12. Zhang J, Han C and Wu T. MicroRNA-26a promotes cholangiocarcinoma growth by activating β -catenin. *Gastroenterology* 2012; 143: 246–248.
13. Huse JT, Brennan C, Hambardzumyan D, et al. The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes Dev* 2009; 23: 1327–1337.
14. Heinzelmann J, Henning B, Sanjmyatav J, et al. Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World J Urol* 2011; 29: 367–373.
15. Ji J, Shi J, Budhu A, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med* 2009; 361: 1437–1447.
16. Zhang Y-F, Zhang A-R, Zhang B-C, et al. MiR-26a regulates cell cycle and anoikis of human esophageal adenocarcinoma cells through Rb1-E2F1 signaling pathway. *Mol Biol Rep* 2013; 40: 1711–1720.
17. Chen B, Liu Y, Jin X, et al. MicroRNA-26a regulates glucose metabolism by direct targeting PDHX in colorectal cancer cells. *BMC Cancer* 2014; 14: 443.
18. Friend SH, Bernards R, Rogelj S, et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. *Nature* 1986; 323: 643–646.
19. Hanahan D and Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57–70.
20. Williams JP, Stewart T, Li B, et al. The retinoblastoma protein is required for Ras-induced oncogenic transformation. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 1170–1182.
21. Ali AA, Marcus JN, Harvey JP, et al. RB1 protein in normal and malignant human colorectal tissue and colon cancer cell lines. *FASEB J* 1993; 7: 931–937.
22. Ayhan S, Isisag A, Saruc M, et al. The role of pRB, p16 and cyclinD1 in colonic carcinogenesis. *Hepatogastroenterology* 2010; 57: 251–256.
23. Poller DN, Baxter KJ and Shepherd NA. p53 and Rb1 protein expression: are they prognostically useful in colorectal cancer? *Br J Cancer* 1997; 75: 87–93.
24. Kucherlapati MH, Yang K, Fan K, et al. Loss of *Rb1* in the gastrointestinal tract of *Apc*^{1638N} mice promotes tumors of the cecum and proximal colon. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15493–15498.
25. Parisi T, Bronson RT and Lees JA. Inactivation of the retinoblastoma gene yields a mouse model of malignant colorectal cancer. *Oncogene* 2015; 34: 5890–5899.
26. Figueroa-González G, García-Castillo V, Coronel-Hernández J, et al. Anti-inflammatory and antitumor activity of a triple therapy for a colitis-related colorectal cancer. *J Cancer* 2016; 7: 1632–1644.
27. Betel D, Wilson M, Gabow A, et al. The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res* 2008; 36: D149–D153.
28. Uhlen M, Fagerberg L, Hallstrom BM, et al. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 2015; 347(6220): 1260419.
29. Cancer Genome Atlas Research Network, Weinstein JN, Collisson EA, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat Genet* 2013; 45: 1113–1120.
30. Fasseu M, Tréton X, Guichard C, et al. Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS ONE* 2010; 5: e13160.
31. Uhlen M, Oksvold P, Fagerberg L, et al. Towards a knowledge-based Human Protein Atlas. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 1248–1250.
32. Chen J, Zhang K, Xu Y, et al. The role of microRNA-26a in human cancer progression and clinical application. *Tumour Biol* 2016; 37: 7095–7108.
33. Palmqvist R, Stenling R and Öberg Å. Expression of cyclin D1 and retinoblastoma protein in colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1998; 34: 1575–1581.
34. Cui X, Shirai Y, Wakai T, et al. Aberrant expression of pRB and p16^{INK4a}, alone or in combination, indicates poor outcome after resection in patients with colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 2004; 35: 1189–1195.
35. Kucherlapati MH, Nguyen AA, Bronson RT, et al. Inactivation of conditional Rb by Villin-Cre leads to aggressive tumors outside the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 2006; 66: 3576–3583.
36. Catela Ivkovic T, Aralica G, Cacev T, et al. MiR-106a overexpression and pRB downregulation in sporadic colorectal cancer. *Exp Mol Pathol* 2013; 94: 148–154.