

UCH-FC
BIOTECNOLOGIA
M 383
C.1

CANCER — DETECCIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE



**“Determinación de la expresión diferencial de un novedoso
RNA mitocondrial no codificante para el desarrollo de un
sistema de detección de cáncer y células tumorales circulantes”**

Memoria de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

por

Ronny Ernesto Martínez Moya

Julio, 2007
Santiago - Chile



Director de Memoria de Título: Dr. Luis O. Burzio Eriz



**“Determinación de la expresión diferencial de un novedoso
RNA mitocondrial no codificante para el desarrollo de un
sistema de detección de cáncer y células tumorales circulantes”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular.

RONNY ERNESTO MARTÍNEZ MOYA

Dr. Luis Orlando Burzio Eriz
Director de Memoria de Título

Una firma manuscrita en azul que coincide con el nombre del titular, ubicada sobre una línea de puntos horizontal.

Comisión de Evaluación de la Memoria de Título:

Dra. María Rosa Bono Merino
Presidente de la Comisión

Una firma manuscrita en azul, ubicada sobre una línea de puntos horizontal.

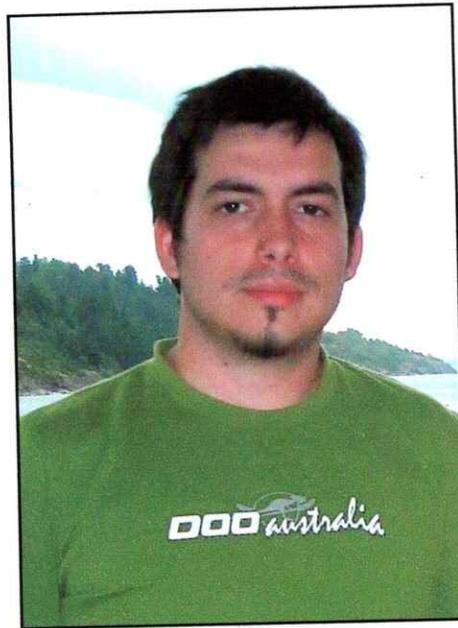
Dr. Christian Enrique Gonzalez Billault
Académico Corrector

Una firma manuscrita en azul, ubicada sobre una línea de puntos horizontal.

Santiago, julio de 2007.

*“Todos quieren poseer conocimientos;
Pero pocos están dispuestos a pagar su precio”*

-Juvenal



Comencé mi carrera en 2001, con mucho entusiasmo y una gran interrogante acerca de qué era lo que se venía. Desde un principio se hicieron sentir los desafíos que implica elegir una carrera de ciencia, pero fueron superados uno a uno con mucho entusiasmo y una constante disposición para aprender.

Han sido años de esfuerzo, estudio, alegrías y satisfacciones, años de compartir con compañeros y profesores, pero por sobre todo, han sido años de valiosa experiencia, en conjunto con una excelente formación científica y personal.

Ahora, al alcanzar este momento, es hora de llevar a la práctica todo lo aprendido y utilizar esta sólida base para lograr futuros objetivos.

Ha sido un camino difícil, pero el viaje recién comienza.

AGRADECIMIENTOS:

Agradezco especialmente al Dr. Luis Burzio por recibirme en su laboratorio, por brindarme su apoyo, su confianza y disposición para compartir sus conocimientos, experiencia y orientación tanto en el ámbito científico como personal. De igual manera al Dr. Pablo Valenzuela y el Dr. Mario Roseblatt por su patrocinio, discusiones, guía y apoyo.

Al grupo de investigación del RNA quimérico, Jaime, Verónica, Claudio, Eduardo, Soledad, Franko, Constanza y Mariela, por proveer un grato ambiente dentro y fuera del laboratorio, por compartir sus conocimientos y experiencias, muchos ratos de trabajo, discusión, conversación y esparcimiento. Gracias por soportarme, y darme su apoyo tanto intelectual como moral en la realización de mi tesis, junto con sus buenos deseos en mis proyectos futuros.

A Ilse, Rodolfo, Maite, Dra. Marta y Marcela, por su cercanía, ayuda, enseñanzas y preocupación.

A la Dra. Mónica Vásquez y su grupo, por todos sus consejos y su tiempo. Gracias por sus palabras y gestos de apoyo en momentos de dificultad.

A mis compañeros, amigos y ahora colegas de la Universidad. Compartimos muchos momentos importantes para la formación de cada uno. Gracias por los momentos vividos, las horas de estudio y preocupación, y por que no decirlo también las horas de carrete y ocio que ciertamente llegaban en buen momento.

La superación de una infinidad de dificultades y la celebración de salir airosos de nuestra carrera ha creado vínculos muy especiales entre nosotros y a pesar que ya hemos

comenzado a definir nuestros caminos, muchas veces divergentes tanto en lo profesional como en lo personal, se que existe este grupo de personas en el que puedo confiar en todo momento y que siempre nos recordaremos como ese montón de jovencitos con más ganas que conocimiento, con una larga y complicada empresa por delante pero, en estos días, al completar esta etapa, nos damos cuenta que es apenas el comienzo de un camino mucho más difícil aún, donde nuestra formación y la excelente base que poseemos serán nuestras más poderosas armas para ver materializados nuestros sueños, objetivos y con un poco de fortuna, desarrollarnos a plenitud como seres humanos.

A los Profesores de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. Pocos profesionales podemos jactarnos de haber sido formados por un plantel de la excelencia del que existe en esta Facultad. No sólo por el nivel académico, sino por la vocación, pasión y entrega de muchos profesores, que suple con creces la falta de recursos e infraestructura que tiene nuestra querida Facultad. Me siento muy afortunado en ese sentido.

A mi padre y a mi madre. Lo que soy no es más que el reflejo de todo el amor, el esfuerzo, y el sacrificio que han hecho por nosotros. Estoy muy contento que puedan ver los frutos de tantos años de preocupación por parte de ustedes para brindarnos siempre lo mejor que tuvieron la oportunidad de darnos. Gracias por tener confianza y apoyarme en todas las decisiones que he tomado. Espero que cuando llegue el momento, pueda estar a la altura y ser también tan buen padre como ustedes lo han sido con nosotros.

A mis Hermanas, por aguantarme, aceptarme y siempre querer lo mejor para mí, así como yo quiero lo mejor para ustedes. Las quiero mucho.

A mis tíos, tías y primos, por ser parte importante de mi núcleo familiar, por su constante preocupación, apoyo y cariño.

Mi amor, sólo nosotros sabemos lo que ha sido esta etapa de nuestras vidas, gracias a ti he crecido mucho en estos años y contigo he visto la vida de una manera más completa y hermosa. Hoy me siento más cerca de ti, de alguna manera has estado presente en todo este proceso y a pesar de la distancia que nos separa siempre has sido una gran motivación y una enorme inspiración para completar este trabajo. Te echo mucho de menos, pero nos encontraremos luego.

Este trabajo se realizó gracias al proyecto FONDEF D04I1338 y el núcleo Milenio de biología fundamental y aplicada (MIFAB).

INDICE DE CONTENIDOS:

Indice de Tablas.....	x
Indice de Figuras.....	x
Lista de abreviaturas.....	xii
1.-Resumen.....	xiv
2.-Abstract.....	xvi
3.-Introducción.....	1
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	15
Objetivos específicos.....	15
4.-Materiales y métodos.....	16
4.1.- Cultivo celular.....	16
4.1.1.-Cultivo de células HL-60.....	16
4.1.2.-Cultivo de células Devernelle.....	16
4.1.3.-Cultivo de células 42/95.....	17
4.1.4.-Cultivo de células HUVEC.....	17
4.1.5.-Cultivo de fibroblastos de médula ósea.....	18
4.1.6.-Cultivo de queratinocitos de prepucio humano.....	18
4.1.7.-Obtención de linfocitos en reposo.....	19
4.2.-Cultivo celular en cámaras sobre portaobjetos para hibridación <i>in situ</i>	20
4.2.1-Tripsinización de células adherentes.....	20
4.2.2.-Cultivo celular en cámaras de 16 pocillos montadas sobre portaobjetos.....	20

4.2.3.-Cultivo celular en cámaras de 8 pocillos montadas sobre portaobjetos.....	21
4.3.-Diseño de sondas de DNA para hibridación <i>in situ</i>	21
4.3.1.-Preparación de sondas marcadas con Digoxigenina en el extremo 3'.....	22
4.3.2.- <i>Dot-Blot</i> de sondas marcadas con Digoxigenina.....	23
4.4.-Hibridación <i>in situ</i>	23
4.4.1.- Tratamiento de células con RNAsa.....	23
4.4.2.- Tratamiento de células con DNAsa.....	24
4.4.3.-Hibridación <i>in situ</i> en esparcido celular.....	24
4.4.4.-Hibridación <i>in situ</i> en monocapa celular.....	25
4.5.-Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (FISH).....	26
4.5.1.-FISH en esparcido celular.....	26
4.5.2.-FISH en monocapa celular.....	27
4.6.-FISH en suspensión celular.....	27
4.6.1.-Fijación celular.....	28
4.6.2.-Permeabilización celular.....	28
4.6.3.-Prehibridación e hibridación.....	29
4.6.4.-Lavados.....	29
4.6.5.-FISH en suspensión de células.....	29
4.7.- Tinción de elementos subcelulares.....	30
4.7.1.-Tinción nuclear mediante DAPI.....	30
4.7.2.-Identificación de mitocondrias por microscopía de epifluorescencia.....	31
4.7.3.-Inmunocitoquímica para detectar PCNA.....	31
4.8.-Microscopía de epifluorescencia:	32

4.8.1.-Microscopía de epifluorescencia para FISH de esparcido celular.....	32
4.8.2.-Microscopía de epifluorescencia para FISH en monocapa celular.....	32
4.9.-Citometría de flujo.....	33
5.-Resultados.....	34
5.1.-Expresión de los ncmtRNAs.....	34
5.1.1.-Expresión diferencial de ncmtRNA sentido y antisentido en Células tumorales.....	34
5.1.2.- Expresión diferencial de ncmtRNA sentido y antisentido en células tumorales mediante FISH.....	36
5.1.3.-Expresión del ncmtRNA sentido y antisentido en células normales proliferantes.....	38
5.1.4.-Determinación mediante FISH de la expresión de los ncmtRNAs en células normales proliferantes.....	40
5.1.5.-Determinación de la expresión de los ncmtRNAs en células no proliferantes.....	42
5.1.6.-Co-expresión del antígeno de proliferación celular (PCNA) y ncmtRNAs..	43
5.1.7.- Determinación de la especificidad de la reacción de FISH	46
5.2.-Optimización del método FISH.....	48
5.2.1.- Sondas oligodeoxinucleotídicas marcadas con FITC en el extremo 3'	48
5.2.2.- Uso de sondas oligonucleotídicas de mayor tamaño	50
5.2.3.- Utilización simultánea de varias sondas.....	52
5.3.- Desarrollo de un protocolo para FISH en suspensión	55
5.3.1- Cambio de agente permeabilizante por uno no detergente	55

5.3.1.1.- Porcentaje de recuperación celular.....	57
5.3.2.-FISH de células en suspensión.....	57
5.4.- Evaluación de la expresión de ncmtRNA mediante citometría de flujo.....	59
5.4.1.- Determinación de la dilución óptima de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a FITC.....	59
5.4.2.- Comparación de dos metodologías de FISH citometría de flujo.....	61
5.4.3.-Evaluación de la marca obtenida por FISH en suspensión en células normales.....	63
6.-Discusión.....	65
Los RNA mitocondriales no-codificantes.....	65
Expresión de los ncmtRNA.....	66
Desarrollo de FISH en suspensión y análisis mediante citometría de flujo.....	68
Trabajos futuros.....	71
7.-Conclusiones.....	72
8.-Bibliografía.....	73

INDICE DE TABLAS:

Tabla 1.-Sondas oligonucleotídicas de DNA utilizadas en hibridación *in situ*.....22

INDICE DE FIGURAS:

Figura 1.- Esquema de la estructura del ncmtRNA humano, y parte del mtDNA que corresponde al gen 16S mitocondrial.....4

Figura 2.-Estructura teórica más probable del RNA 16S y del RNA mitocondrial no codificante humano.....5

Figura 3.- Expresión diferencial del ncmtRNA en líneas celulares tumorales humanas7

Figura 4.-Expresión diferencial de los ncmtRNA en cortes biopsicos tumorales humanos.....8

Figura 5.- Expresión de ncmtRNAs en tejidos humanos normales en proliferación10

Figura 6.-Esquema de la estructura del ncmtRNA sentido, y de uno de los ncmtRNA antisentido.....11

Figura 7.-Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en líneas tumorales humanas.....35

Figura 8.-Expresión del ncmtRNA sentido y antisentido en líneas celulares tumorales mediante FISH.....37

Figura 9.-Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en cultivos primarios de células normales proliferantes.....39

Figura 10.- Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en cultivos primarios de células normales proliferantes mediante FISH...	41
Figura 11.- Determinación mediante FISH de la expresión de los ncmtRNAs en linfocitos en reposo.....	42
Figura 12.- Co-expresión de los ncmtRNAs y PCNA en células tumorales.....	44
Figura 12B.- Co-expresión de los ncmtRNAs y PCNA en células normales proliferantes.....	45
Figura 13.- Efecto del tratamiento con RNAsa o DNAsa en la señal de hibridación obtenida mediante FISH.....	47
Figura 14.- Efecto de la concentración de la sonda fluorescente.....	49
Figura 15.- Comparación de FISH utilizando sondas 20 y 40 nucleótidos de largo...	51
Figura 16.- Esquema de la hibridización de distintas sondas oligonucleotídicas específicas para el ncmtRNA sentido y antisentido:.....	53
Figura 17.- Figura 17.- FISH en células 42/95 utilizando múltiples sondas:	54
Figura 18.- Efecto de la permeabilización en la morfología de células HL60 al realizar hibridación <i>in situ</i>	56
Figura 19.- FISH en suspensión de células HL60 y 42/95.....	58
Figura 20.- Determinación de la dilución óptima de anticuerpo anti digoxigenina-FITC para citometría de flujo	60
Figura 21.- Determinación de la expresión de los ncmtRNAs mediante citometría de flujo en células tumorales.....	62
Figura 22.- Determinación de la expresión de los ncmtRNAs en células normales proliferantes mediante FISH en suspensión y citometría de flujo.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS:

°C: Grados Celsius.

as: antisentido.

DABCO: 1, 4-diazabicyclo[2.2.2]octano.

DAPI: 4',6-Diamidino-2-fenilindol diclorhidrato.

DIG: Digoxigenina.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium.*

DNA: Acido desoxiribonucleico.

DTT: Ditioneitol.

cDNA: DNA complementario.

CTCs: células tumorales circulantes.

mtDNA: DNA mitocondrial.

EDTA: ácido etilendiaminotetracético.

FISH: Hibridación *in situ* fluorescente.

G: Gramos.

g: Fuerza de gravedad.

H: Horas.

HIS: Hibridación *in situ*.

HUVEC: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells.*

ISAV: Virus de la anemia infecciosa de salmón.

l: Litro.

M: Molar.

Min: Minutos.

ml: mililitros.

NBT: Tetrazolio de nitroazul.

nm: nanómetros.

Nt: Nucleótido.

Pb: Pares de bases nucleotídicas.

PBS: Tampón salino de fosfato

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular.

RI: Repetido invertido.

RNA: Ácido ribonucleico.

mtRNA: RNA mitocondrial.

ncmtRNA: RNA Mitocondrial No Codificante.

ncRNA: RNA no codificante.

TdT: Deoxinucleotidil transferasa terminal

tRNA: RNA de transferencia.

Rpm.: Revoluciones por minuto.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción reversa.

S: Coeficiente de sedimentación

SSC: tampón de cloruro de sodio-citrato de sodio.

TA: Temperatura ambiente.

UV: Ultravioleta.

V: Volts

1.-RESUMEN:

Cáncer es una de las enfermedades más prevalentes hoy en día y representa numerosos gastos a personas y a los sistemas públicos de salud. Un tema importante dentro del diagnóstico y tratamiento de cáncer es la detección de células tumorales circulantes (CTCs). Estas células se desprenden del tumor primario y entran al torrente sanguíneo, al sistema linfático o a la médula ósea, provocando la aparición de nuevos tumores en el paciente, provocando metástasis. Un diagnóstico temprano y efectivo de CTCs puede prevenir el desarrollo de metástasis y aumentar la expectativa de vida del paciente, y además proveer un pronóstico más exacto si se está realizando tratamiento.

Recientemente hemos descubierto un nuevo tipo de RNA mitocondrial no-codificante. Experimentalmente, demostramos que estos transcritos incluyen la secuencia completa del RNA 16S sentido o antisentido. Sin embargo, sorprendentemente tiene covalentemente unida al extremo 5' una secuencia complementaria invertida al 16S rRNA, formando un repetido invertido (RI) y una vuelta. Hemos llamado al transcrito que presenta un RI unido al extremo 5' del rRNA 16S sentido, ncmtRNA sentido; mientras que al transcrito que contiene un RI unido al extremo 5' del rRNA 16S antisentido, ncmtRNA antisentido. Múltiples evidencias sugieren que existe una correlación entre la expresión de estos transcritos y la proliferación celular.

Nuestro objetivo fue estudiar la expresión de estos transcritos en varias líneas celulares, buscando un marcador universal de células tumorales. Además, desarrollamos

una aproximación para la detección de CTCs utilizando hibridación *in situ* fluorescente para células en suspensión.

Demostramos que en células normales proliferantes hay una expresión de ambos ncmtRNA. Por otro lado, en células tumorales existe una sobre expresión del ncmtRNA sentido, mientras que el transcrito antisense se encuentra de alguna manera reprimido. En células no proliferantes, ninguno de estos transcritos es expresado. Estos resultados sugieren que ocurre un cambio drástico en la expresión de los ncmtRNAs durante la transformación neoplásica. Adicionalmente encontramos que tanto en células tumorales como normales proliferantes existe co-expresión entre los ncmtRNAs y PCNA.

Nuestros resultados muestran que utilizando estos marcadores moleculares, podemos conocer el estado proliferativo de una célula, y aún más importante, detectar y discriminar células tumorales humanas, debido a que el ncmtRNA antisentido está reprimido en estas células.

También desarrollamos un protocolo de FISH de células en suspensión para el análisis de muestras, como una aproximación a la detección de CTCs. El análisis mediante citometría de flujo mostró que es posible discriminar entre células tumorales y normales proliferantes, usando sondas de DNA marcadas con FITC.

En resumen, los resultados y los datos entregados en este trabajo pueden contribuir, en conjunto con otros resultados obtenidos en el laboratorio, al desarrollo de nuevos métodos universales para diagnóstico temprano de cáncer y detección de CTCs.

Un mayor entendimiento del rol biológico de los ncmtRNAs en el complejo ciclo celular y la transformación neoplásica, proveerá un gran avance en la investigación de cáncer.

2.-ABSTRACT:

Cancer is one of the most prevalent diseases nowadays and it represents serious expenses to personal and public health services in most countries.

One important subject regarding cancer diagnosis and treatment is the detection of circulating tumor cells (CTCs). Those cells detach from the primary tumor and enter into the blood or the lymphatic system and/or to the bone marrow, and new tumors appear in the patient therefore causing metastasis. An effective and early diagnosis of CTCs could prevent metastasis development to improve patient survival, and also provide an accurate prognosis if treatment is being performed.

Recently we have discovered a novel class of non-coding mitochondrial RNAs (mtRNA); we demonstrated that these transcripts include the complete sense or antisense 16S rRNA sequence. However, surprisingly it has a complementary, inverted 16S rRNA sequence covalently joined to the 5' end of the first forming an inverted repeat and a loop as its secondary structure. We have named the transcript that presents an IR joined to the sense 5' end of the 16S rRNA, sense ncmtRNA; and the transcript that contains an IR joined to the antisense 16S 5' end, antisense ncmtRNA.

Multiple evidences suggest that there is a correlation between the expression of these transcripts and cellular proliferation.

Our main objective was to study the expression of these transcripts in several cell lines, and search for a novel and universal tumor marker. We also attempt to develop an early approach for detection CTCs using fluorescent *in situ* hybridization for suspension cells.

We demonstrated by *in situ* hybridization and FISH using small digoxigenin-labeled DNA probes that in normal proliferating cells, there is an expression of both sense and antisense ncmtRNA. On the other hand, tumor cells such overexpress sense non-coding mtRNA while its antisense counterpart is somewhat downregulated. In non-proliferating cells these transcripts were not expressed. The results suggest that a drastic change in expression of the ncmtRNAs occurs during neoplastic transformation and differentiation. We also found that in both tumor and normal proliferating cells there is co-expression and correlation between ncmtRNAs and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Thus, non-proliferating cells showed no ncmtRNA, neither PCNA expression.

Our results showed that using these molecular markers, we can assess the proliferative status of a cell, and most important, detect and discriminate a number of human tumor cell lines, since antisense non-coding mtRNA is downregulated in tumor cells.

We have also developed a suspension FISH protocol for analyzing samples as an approach for the detection of circulating tumor cells. Analysis of ncmtRNAs expression performed by flow cytometry showed that we can discriminate tumor cells from normal proliferating cells using suspension FISH.

In summary, the results and data provided in this work may contribute, along with other studies performed in our laboratory, to develop a novel and universal method to early cancer diagnosis and circulating tumor cell detection. Further understanding of ncmtRNAs biological role in the complexity of cell cycle and neoplastic transformation will provide a great advance in cancer research.

3.-INTRODUCCIÓN:

Cáncer es una de las enfermedades de mayor ocurrencia a nivel mundial. En Chile, el cáncer gástrico presenta la mayor prevalencia (Llorens, 1999; Corvalán y col., 2001). Un tema importante dentro del diagnóstico y tratamiento del cáncer es la detección de células tumorales circulantes (CTC). Estas células originadas en el tumor primario, se desprenden de éste y entran al torrente sanguíneo o hacia la médula ósea, tras lo cual pueden aparecer tumores adicionales en tejidos distantes del lugar del tumor original provocando metástasis (*National Cancer Institute*; <http://www.cancer.gov>). Alrededor de un tercio de los pacientes con cáncer tienen metástasis la cual es detectada en el momento en que el cáncer es diagnosticado por primera vez (*American Cancer Society*, <http://www.cancer.org>). El resto de los pacientes no presentan CTCs o estas no pueden ser detectadas por los métodos actuales de diagnóstico. Lo que significa que la detección precoz de CTC podría aumentar la sobrevida de un paciente con cáncer y además permitir escoger el tratamiento más eficaz para su condición. Es por esto que en la actualidad existe la urgencia por nuevos métodos no invasivos, y lo más universal posible para la detección temprana y efectiva de tanto tumores primarios malignos como células tumorales circulantes.

El campo del diagnóstico de cáncer está estrechamente relacionado con el estudio del origen de éste. La comprensión de los cambios que llevan a la transformación de una célula normal a una tumoral es en gran medida útil a la hora de detectar una célula tumoral en la fase más temprana posible. Existen variadas estrategias para determinar los posibles cambios a nivel celular que podrían estar relacionados con la transformación

neoplásica. El campo más activo ha sido el de los micro-arreglos, utilizando secuencias correspondientes a los aproximadamente 30.000 genes presentes en el DNA humano. Esta tecnología ha permitido describir perfiles de expresión de genes que tienen relación con el tejido y tipo de tumor y además con el paciente (Lu, J. y col, 2005). Conjuntamente con estos estudios, existen grupos que están determinando el perfil de expresión de proteínas en células tumorales en comparación con células normales (Lu Y.J., 2001). Estos cambios en los perfiles de expresión están siendo utilizados para el diseño y análisis de nuevas drogas para combatir el cáncer así como nuevos métodos de diagnóstico.

Recientemente, el grupo de Kampa y col (2004) encontró que al menos el 49% de los transcritos originados en los cromosomas 21 y 22 humanos de 10 líneas celulares incluidas normales y tumorales corresponde a RNA no codificante, encontrando tanto transcritos sentido como antisentido. Estos RNA corresponden a transcritos provenientes de regiones consideradas como intergénicas no codificantes. Este hallazgo abre toda una nueva gama de estudios acerca del origen y diagnóstico del cáncer, y su relación con el creciente mundo de los RNAs no codificantes.

Al caracterizar una biblioteca de cDNA de testículo de ratón, se demostró que algunos de estos transcritos correspondían al RNA ribosomal 16S mitocondrial. Sorprendentemente en el extremo 5' se encontraba unida covalentemente una secuencia de 121 nucleótidos complementaria entre las posiciones 241 y 360 del RNA 16S mitocondrial sentido, por lo cual se le denominó como "repetido invertido" (RI) (Villegas y col, 2000, 2002). Esta molécula sería generada a partir de un procesamiento

post transcripcional de productos originados a partir de hebras H y L del genoma mitocondrial (Villegas y col, 2005). Como la transcripción de las hebras H y L son reguladas por promotores distintos e independientes (Taanman, 1999), es que esta molécula fue denominada como RNA quimérico.

La presencia del RI determina que la estructura del mtRNA no codificante se encuentre establecida en base a 3 regiones distintas: un región monohebra, conformada por la región no apareada del segmento 3' del rRNA 16s mitocondrial sentido; una región de doble hebra, establecida por el apareamiento entre las secuencias del 16s mitocondrial sentido y el RI; y por último otra región monohebra, la cual se encuentra conformada por la secuencia restante del 16S mitocondrial, río arriba del tallo, conformando un asa de 120 nt (Villegas y col, 2000).

Tras la identificación del ncmtRNA en ratón, se procedió a determinar la existencia de esta molécula en humano. El mtRNA no codificante humano posee un RI de 820 nt que es complementario al RNA 16S mitocondrial entre las posiciones 46 y 865 (Figura 1). De esta forma el transcrito contiene una región doble hebra de 820 pb y una asa monohebra de 40 nucleótidos. Esta molécula la hemos llamado RNA mitocondrial no-codificante o ncmtRNA, puesto que nos hemos dado cuenta que el nombre “quimérico” puede inducir a confusión. La estructura mas probable de este transcrito se muestra en la Figura 2 y se compara con la del RNA ribosomal 16S.

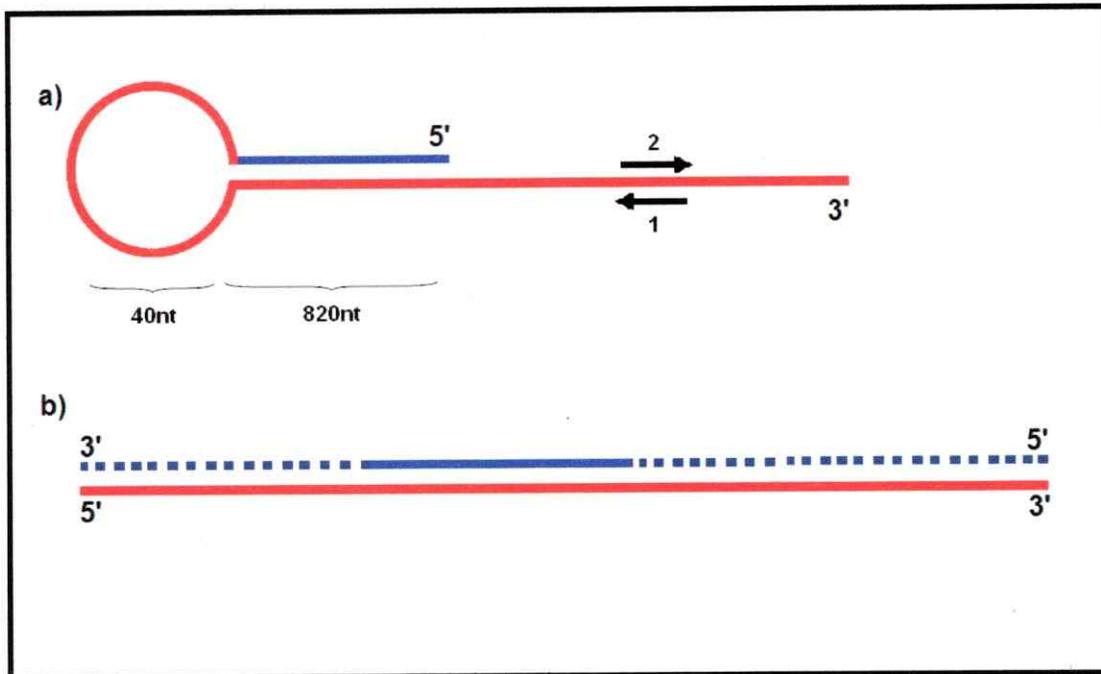


Figura 1.- Esquema de la estructura del ncmtRNA humano, y parte del mtDNA que corresponde al gen 16S mitocondrial:

a) En rojo se muestra el 16S sentido y en azul el RI. El ncmtRNA humano está formado por el transcrito de la hebra sentido del gen 16S ribosomal, unido covalentemente en el extremo 5' con un fragmento correspondiente al transcrito antisentido del gen 16S ribosomal (azul), formando un repetido invertido de 820 nucleótidos y un asa de 40 nucleótidos. b) En azul punteado se muestran las regiones de la hebra L del gen del 16S ribosomal que no están presentes en la secuencia del RI. Las flechas indican la posición de la sonda antisentido (1) utilizada para HIS. La sonda 2 es el control de hibridación.

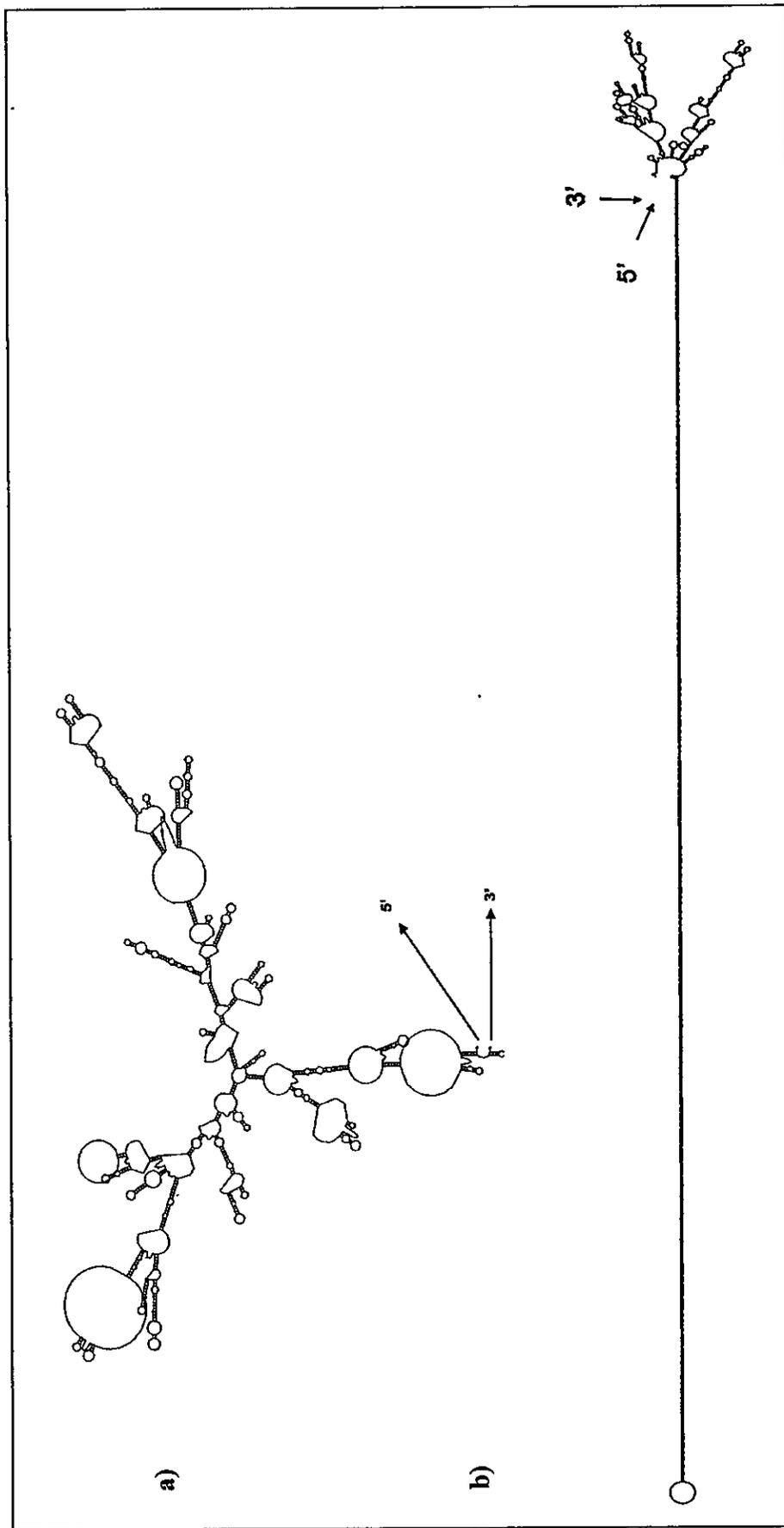


Figura 2.- Estructura teórica más probable del RNA 16S (a) y del ncmtRNA (b) humano: Figuras en escala. Para obtener la estructura de mayor estabilidad térmica, se utilizó el programa “mFold” de Zucker. (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna/>)

Debido a que esta molécula fue descubierta en tejido espermatogénico, surgió una interesante reflexión; el espermatozoide es una célula altamente diferenciada e incapaz de proliferar. Pero al entrar en contacto con el óvulo, el cigoto comienza rápidamente a dividirse para formar el embrión. Entonces, este novedoso RNA no codificante podría hipotéticamente tener algún rol en este repentino cambio en la habilidad de proliferar del cigoto, o por lo menos dar cuenta de éste cambio.

Dado a que fue difícil trabajar con células embrionarias proliferantes, se escogió un modelo similar con características proliferativas, como es el tejido tumoral. Tal como era esperado, mediante hibridación *in situ* (HIS) utilizando una sonda oligonucleotídica complementaria al ncmtRNA (Figura 1, sonda 1), se comprobó la expresión de este transcrito en una variedad de líneas celulares tumorales humanas en cultivo (Figura 3), y en células tumorales de biopsias humanas correspondientes a varios tipos de tumores humanos como cerebro, hígado, vesícula y gástrico. (Burzio y col, 2004; Villegas y col., 2004; Burzio y col., 2005) (Figura 4). Según lo esperado, al realizar HIS con una sonda sentido (Figura 1, sonda 2) a esta molécula, a modo de control negativo, no se obtuvo marca alguna.

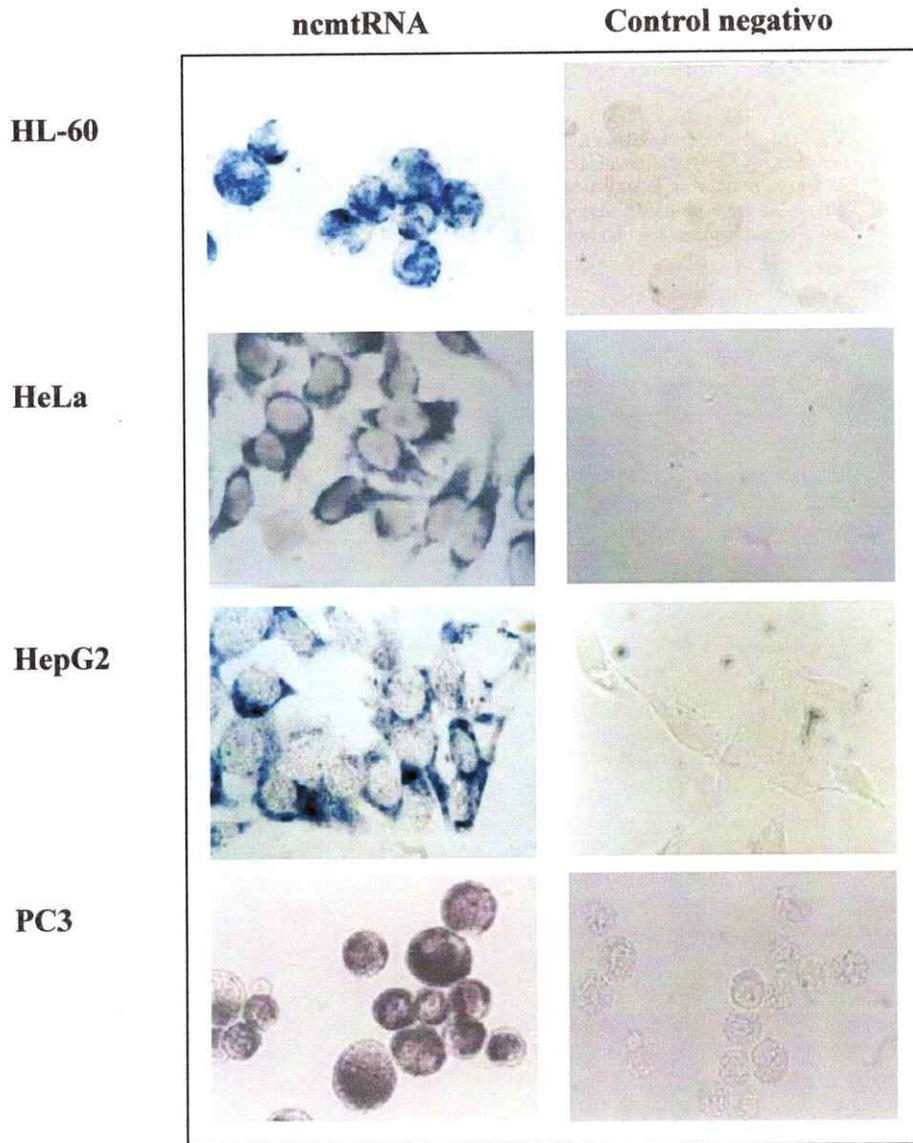


Figura 3.-Expresión diferencial del ncmtRNA en líneas celulares tumorales humanas:

Hibridación *in situ* con sondas oligonucleotídicas de DNA marcadas con digoxigenina dirigidas al extremo 3' del ncmtRNA y sonda control, para determinar la expresión este transcrito en cultivos celulares de las líneas tumorales humanas que se indican. Se observa marca positiva para el mtRNA no codificante sentido, mientras que existe una nula señal de hibridación para la sonda control. La posición de las sondas se muestra en la Figura 1.

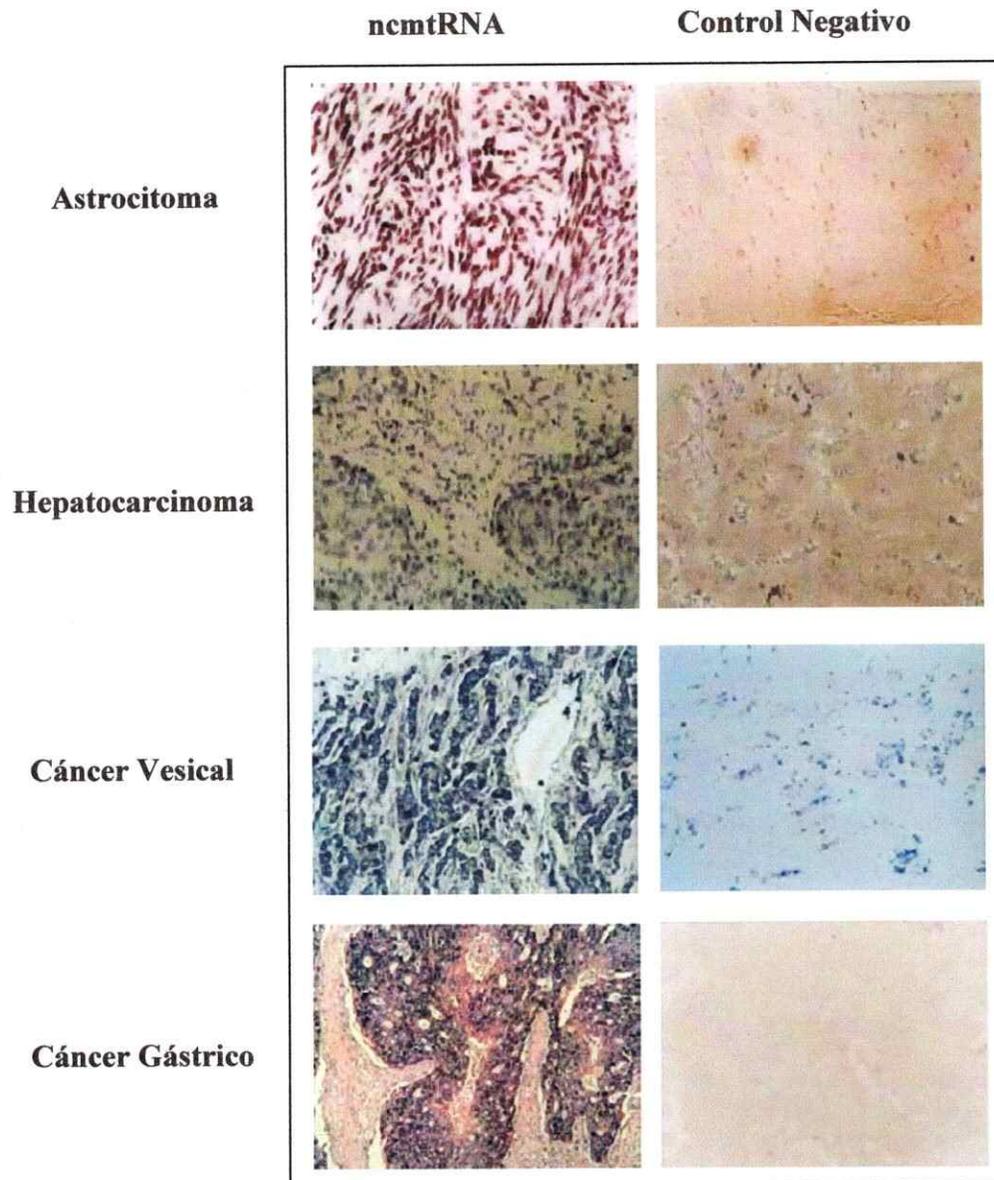


Figura 4.- Expresión diferencial de los ncmtRNA en cortes de biopsias tumorales humanas:

Hibridación *in situ* con sondas oligonucleotídicas de DNA marcadas con digoxigenina dirigidas al extremo 3' del mtRNA no codificante, para determinar su expresión en cortes de los tejidos tumorales humanos que se indican. En las células tumorales se observa marca positiva para el ncmtRNA sentido, mientras que con la sonda sentido no hay marca.

En las muestras de tumores se pudo observar, además, que el tejido estromal circundante, formado por células no proliferantes, no se marcaba mediante HIS con la sonda contra el ncmtRNA. Esto sugirió que dicho transcrito estaría relacionado de alguna manera con el estatus proliferativo de la célula. Por este motivo, se investigó la expresión de éste RNA en tejido y células normales. Como resultado de estos experimentos, se pudo comprobar que en células y tejidos normales no proliferantes no se obtenía marca con la sonda dirigida contra el ncmtRNA, así como tampoco con la sonda control. Sin embargo, sorprendentemente, en células y tejidos normales proliferantes se encontró marca positiva tanto para el ncmtRNA como con la sonda sentido control (Figura 5).

Este resultado inesperado sugería la existencia de un contraparte complementario al ncmtRNA. Mediante una estrategia experimental análoga a la utilizada para el ncmtRNA original, se logró amplificar y caracterizar dos transcritos antisentido formado por el rRNA 16S antisentido, y repetidos invertidos de 289 y 501 nt respectivamente. Estas moléculas se denominaron ncmtRNA antisentido-1 y ncmtRNA antisentido-2, para diferenciarlo del ncmtRNA sentido (Figura 6).

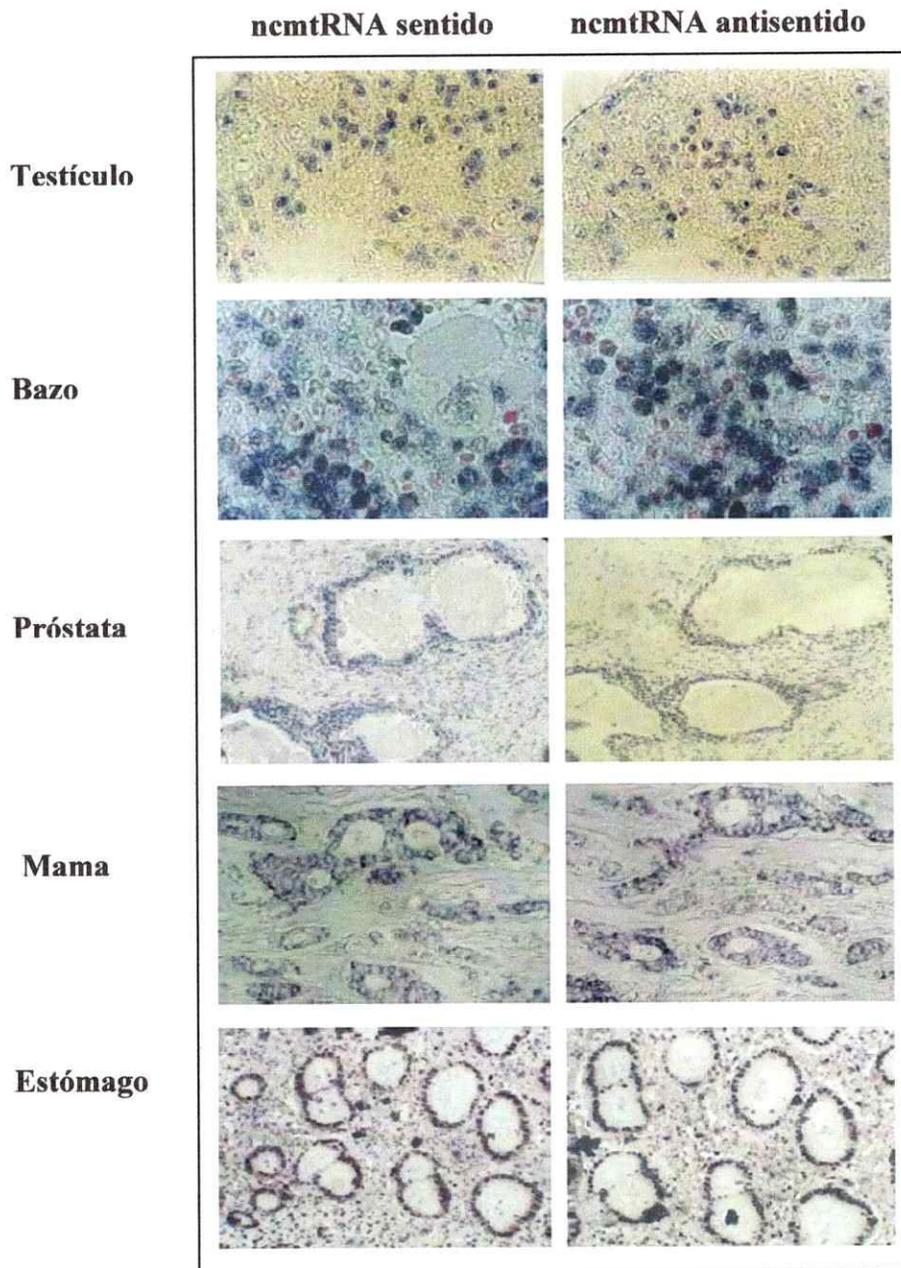


Figura 5.- Expresión de ncmtRNAs en tejidos humanos normales en proliferación:

Hibridación *in situ* con una sonda de DNA complementaria a la región 3' del mtRNA no codificante sentido, para determinar la expresión de éste en cortes obtenidos de biopsias de los tejidos proliferativos normales que se indican. Se observa marca positiva semejante a la observada en las biopsias de tumores humanos. Sin embargo, también se observa una señal de hibridación similar al utilizar la sonda 2, que era el control de hibridación.

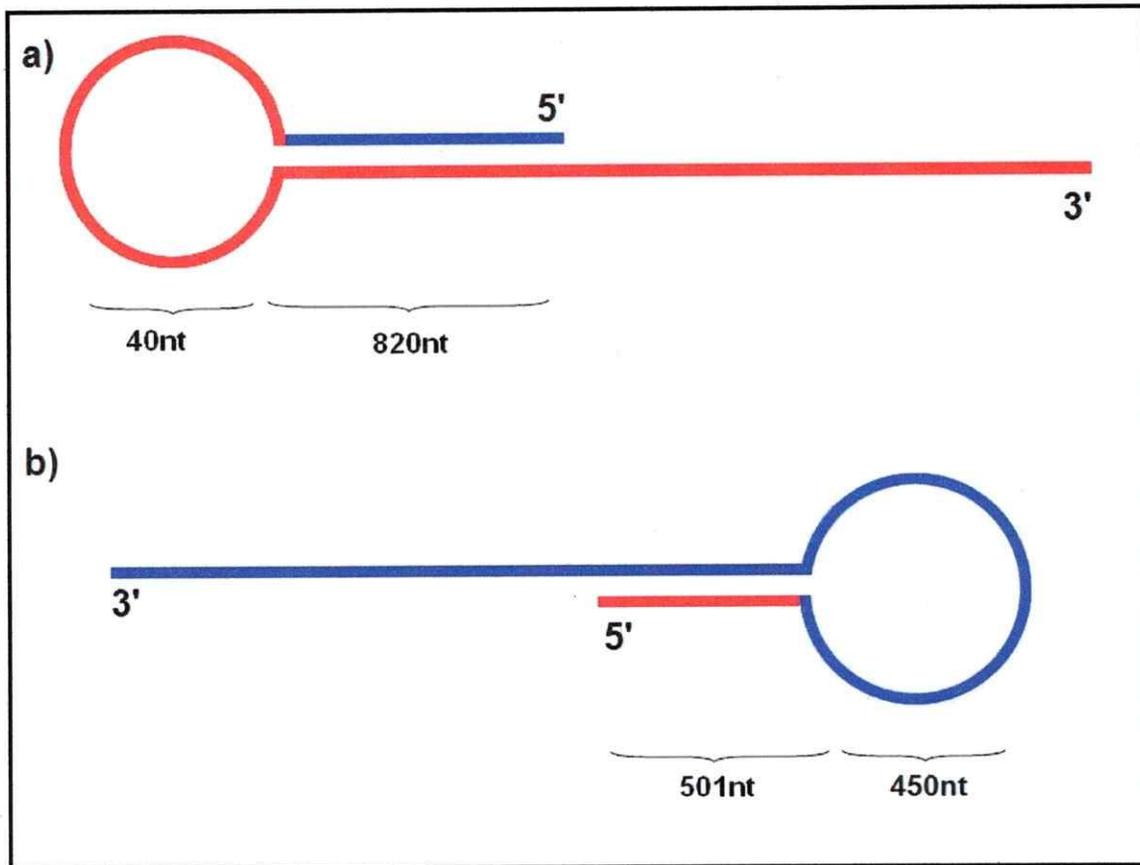


Figura 6.-Esquema de la estructura del ncmtRNA sentido, y de uno de los ncmtRNA antisentido:

En rojo se muestra la hebra sentido, en azul la hebra antisentido. A diferencia del ncmtRNA sentido humano (a), la versión antisentido (b) esta formada por el transcrito de la hebra antisentido del gen 16S ribosomal, unido covalentemente en el extremo 5' con una secuencia correspondientes al transcrito sentido del gen 16S ribosomal, formando un repetido invertido y una asa de 450nt.

Por lo tanto si se compara la expresión de los ncmtRNA mediante HIS, en células normales en proliferación se observa expresión de ambos transcritos, mientras que en células tumorales solo se observa expresión del transcrito sentido. Sin embargo, es necesario estudiar estos resultados con mayor profundidad además de las características de expresión diferencial para estos transcritos en células tumorales, y compararlas con el perfil de expresión tanto en células normales diferenciadas como en células normales proliferantes, con el fin de establecer claramente la manera de identificar cada tipo celular.

Los resultados anteriores también sugieren que la expresión del ncmtRNA sentido está estrechamente relacionada con la proliferación celular. Esta proposición se basa además en la baja o nula detección de este transcrito en células en reposo como linfocitos periféricos, células musculares o células no proliferantes de cerebro o hígado (Villegas 2002, Santander 2004). Otra observación interesante es que linfocitos humanos estimulados con fitohemaglutinina, entran en activa síntesis de DNA y expresan los marcadores de proliferación Ki-67, PCNA e histona H3 fosforilada. Coincidente con esta transformación, los linfocitos activados expresan tanto ncmtRNA sentido como antisentido (Santander, 2004) mostrando nuevamente una relación entre estado de proliferación con la expresión de estos transcritos. Como la expresión de los transcritos antisentido no es detectable en células tumorales pero si en células normales proliferantes, es posible postular un método diferencial, único para distinguir una célula tumoral de una normal. Esta diferencia de fenotipo es corroborada con células normales inmortalizadas con virus oncogénicos. En queratinocitos de prepucio humanos inmortalizados con los virus de papiloma humano 16 y 18, que son responsables de un

90% de los casos de cáncer de cuello uterino, se puede detectar una alta expresión de ncmtRNA sentido, mientras que no se detecta el ncmtRNA antisentido. (Villota, 2006). En contraste, los queratinocitos normales expresan ambos transcritos. Estas células son inmortalizadas por el virus, pero no son tumorales, por lo que se puede concluir que la represión de los transcritos antisentidos es un cambio temprano en la transformación neoplásica.

Basados en los resultados anteriores y presentes de nuestro laboratorio, se está abordando el desarrollo de sistemas de detección y discriminación de células tumorales circulantes provenientes de distintos tipos de cáncer con el fin de crear un método único de detección de células metastásicas o cáncer presente en el sistema linfático o circulatorio, cosa que en la actualidad no existe. Como parte de este proyecto, en esta tesis se desarrolló una aproximación a un sistema de identificación de células tumorales basado en la presencia o ausencia de RNA mitocondrial no codificante, tanto sentido como antisentido, en tres modelos celulares humanos (HL60, Devernelle y la línea de melanoma 42/95). Las células tumorales se marcaron mediante HIS fluorescente (FISH) en fase sólida y en suspensión, utilizando como sondas oligonucleótidos de DNA. Posteriormente se utilizó citometría de flujo para cuantificar y caracterizar las células marcadas, de manera de poder diferenciar células tumorales de células normales.

El trabajo realizado se dividió en tres etapas; la primera fue corroborar los resultados anteriores obtenidos en el laboratorio, en las líneas celulares utilizadas en este trabajo, mediante HIS tanto colorimétrica, como fluorescente.



Posteriormente, se desarrolló un protocolo de hibridación *in situ* fluorescente para células en suspensión, donde se evaluó la característica de la marca para los protocolos desarrollados, buscando coherencia con los resultados anteriores del laboratorio, así como para mantener la especificidad de la marca.

La tercera parte del trabajo consistió en el análisis por citometría de flujo de muestras resultantes de hibridaciones *in situ* en suspensión, evaluación de las características de la marca obtenida y comparación de ésta en distintas poblaciones y subpoblaciones celulares, como células tumorales, normales y normales proliferantes. Por último, se analizó la factibilidad de poder ser capaces de detectar y cuantificar células tumorales en muestras líquidas como una aproximación a un novedoso método de diagnóstico de CTC.

HIPÓTESIS:

“La detección de la expresión diferencial de los RNA mitocondriales no codificantes sentido y antisentido en células tumorales y normales permitirá desarrollar un novedoso método no invasivo para el diagnóstico de células tumorales circulantes”

OBJETIVOS:

Objetivo general:

“Determinar la expresión diferencial de los RNA mitocondriales no codificantes en líneas tumorales y no tumorales como base para un nuevo método de diagnóstico no invasivo de cáncer o metástasis”.

Objetivos específicos:

1. Evaluar la presencia de los mtRNA no codificantes en diferentes líneas celulares por HIS colorimétrico y de fluorescencia.
2. Desarrollar e implementar una variante en suspensión líquida de la HIS, para la detección de los ncmtRNAs.
3. Evaluar la factibilidad de acoplar citometría de flujo como un método de detección cuantitativo con mayor sensibilidad y especificidad, idóneo para detectar células tumorales circulantes (CTC).

4.- MATERIALES Y MÉTODOS:

4.1.- Cultivo celular:

4.1.1.-Cultivo de células HL-60:

La línea celular HL-60, (ATCC CCL-240) correspondiente a una leucemia promielocítica humana, fue cultivada en botellas T-25 y T-75 (Nunc), a 37°C con 5% CO₂ ambiental, en 5 ml (T-25) o 15 ml (T-75) de medio RPMI-1640 (Gibco) con Glutamax[®] y 25 mM HEPES, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino. Para el subcultivo, se tomó 1 ml de la botella de cultivo y se procedió a su recuento en una cámara de Neubauer en microscopio de luz, por cuadruplicado; posteriormente se resuspendieron a 1x10⁵ células/ml, manteniendo una densidad entre 1x10⁵ células/ml y 1x10⁶ células/ml. El medio de cultivo se cambió cada 2 ó 3 días.

4.1.2.-Cultivo de células Devernelle:

La línea celular fue cultivada en botellas T-25 y T-75 (Nunc) , a 37°C con 5% CO₂ ambiental, en 5 ml (T-25) o 15 ml (T-75) de medio RPMI-1640 (Gibco) con Glutamax[®] I y 25 mM HEPES, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina y 20% de suero fetal bovino. Para el subcultivo, se tomó 1 ml de la botella de cultivo y se procedió a su recuento en una cámara de Neubauer en microscopio de luz, por cuadruplicado; posteriormente se resuspendieron a 1x10⁵ células/ml, manteniendo una densidad entre 1x10⁵ células/ml y 1x10⁶ células/ml. El medio de cultivo se cambió cada 2 ó 3 días.

4.1.3.-Cultivo de células 42/95:

La línea celular 42/95, correspondiente a un melanoma humano, fue cultivada en botellas T-25 y T-75 (Nunc), a 37°C con 5% CO₂ ambiental, en 5 ml (T-25) o 15 ml (T-75) de medio RPMI-1640 (Gibco), con GLutamax[®] I y 25 mM HEPES, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino. Para el subcultivo celular, las células se tripsinizaron y el cultivo se diluyó a una densidad de 1×10^4 células/ml y se creció hasta alcanzar una confluencia de 80%.

4.1.4.-Cultivo de células HUVEC:

La línea celular HUVEC, correspondiente a cultivo primario de células endoteliales de cordón umbilical humano, fue cultivada en botellas T-25 y T-75 (Nunc), a 37°C con 5% CO₂ ambiental, en 5 ml (T-25) o 15 ml (T-75) de medio M199 (Gibco), con L-glutamina y 20 mM bicarbonato de sodio, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina, 20 U/ml Heparina, 50 µg/ml suplemento de crecimiento para células endoteliales (ECGS, extracto liofilizado de glándula pituitaria de bovino) y 20% de suero fetal bovino. Para el subcultivo celular, las células se tripsinizaron y el cultivo se diluyó a una densidad de 1×10^4 células/ml y se creció hasta alcanzar una confluencia de 80%.

4.1.5.-Cultivo de fibroblastos de médula ósea:

Cultivo primario de células, proporcionado gentilmente por el Dr. Eduardo Landerer, fue cultivada en botellas T-25 y T-75 (Nunc), a 37°C con 5% CO₂ ambiental, en 5 ml (T-25) o 15 ml (T-75) de medio DMEM/F12 1:1 (Gibco), con GLutamax[®] I y 25 mM HEPES, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 µg/ml sulfato de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino. Para el subcultivo celular; las células se tripsinizaron y el cultivo se diluyó a una densidad de 1×10^4 células/ml y se creció hasta alcanzar una confluencia de 80%.

4.1.6.-Cultivo de queratinocitos de prepucio humano:

Células de cultivo primario de (QPH) fueron gentilmente donadas por el Dr. Enrique Boccardo y la Dra. Luisa L. Villa del Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer, São Paulo, Brasil. Los QPH fueron obtenidos a partir de prepucios de recién nacidos. Los prepucios fueron lavados rápidamente en etanol 70%, lavados en PBS suplementados con SFB 10% y colocados en placa Petri de 100 mm. En seguida todo el tejido conectivo fue retirado utilizando un bisturí. Esta etapa es muy importante para disminuir el número de fibroblastos en el cultivo. Luego, los prepucios fueron cortados en trozos de aproximadamente 2 mm y transferidos a un matraz Erlenmeyer e incubados con 10-20 ml de tripsina 0.25% y EDTA 1 mM por 45 min. a 37°C en agitación continua. Luego el contenido del matraz fue filtrado para eliminar los fragmentos más grandes de tejido. El producto filtrado fue neutralizado con igual volumen de PBS suplementado con SFB 10% y centrifugado por 5 min. a 1000 rpm. El sedimento fue resuspendido en KFSM (medio de queratinocitos

libre de suero) y las células fueron transferidas a placas Petri de 100 mm en las cuales previamente se habían sembrado los alimentadores. Luego fueron adicionados 200 µl/placa de antibióticos PSN (penicilina 5 mg/ml, estreptomycin 5 mg/ml y neomicina 10 mg/ml) y las placas fueron cultivadas a 37°C y en atmósfera de 5% de CO₂. Después de 72 h la concentración de antibiótico fue disminuida a la mitad y posteriormente fueron cultivadas por 48 h en medio KSFM sin antibiótico hasta alcanzar una confluencia de 80-90%. Finalmente las células fueron congeladas en KSFM y DMSO al 10%.

4.1.7.-Obtención de linfocitos en reposo:

Para obtener muestras de células sanguíneas circulantes, se incubó 1 ml de sangre en 14 ml de solución de lisis de eritrocitos (0.17 M NH₄Cl, 0,01 M NaKHCO₃, 0.1 mM EDTA; D. J. Young, *UCSD Cancer center*) durante 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 5 min a 400g y se descartó el sobrenadante. Se lavó el precipitado en PBS 1X estéril, se centrifugó durante 5 min a 300g. Se descartó el sobrenadante, se resuspendió en PBS 1X estéril y se observó al microscopio de contraste de fase Olympus CKX41.

4.2.-Cultivo celular en cámaras sobre portaobjetos para hibridación *in situ*:

4.2.1-Tripsinización de células adherentes:

Después de descartar el medio, células adherentes se lavaron con solución GKN (1X PBS, 10 mM glucosa, 10 μ M rojo fenol) durante 5 min para eliminar restos celulares y de suero fetal bovino, luego se agregó 2X tripsina (tripsina 10X: 0,5% tripsina, 5mM EDTA, 200mM NaCl), y se incubó durante 10 min a 37°C evaluando bajo microscopio de contraste de fase. Para detener la actividad de la tripsina se agregó medio (RPMI o DMEM + F-12) completo con 10% de suero fetal bovino. Las células se diluyeron a 1×10^5 células/ml y se sembraron nuevamente.

4.2.2.-Cultivo celular en cámaras de 16 pocillos montadas sobre portaobjetos:

En un portaobjetos de 16 pocillos (Labtek Chamber Slide[®], Nunc) células adherentes tripsinizadas se sembraron a una densidad de entre 1×10^2 y 5×10^2 células por pocillo (0,3 cm²) en 200 μ l de medio RPMI 1640 con Glutamax[®] y 25mM HEPES, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 μ g/ml sulfato de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino. Al alcanzar entre 70% y 80% de confluencia, las células fueron fijadas en RPMI 1640 con 10% suero fetal bovino y 4% paraformaldehído durante 10 min y posteriormente lavadas con PBS 1X. Las células se conservaron entre 2° C y 8° C en oscuridad por un máximo de 7 días.

4.2.3.-Cultivo celular en cámaras de 8 pocillos montadas sobre portaobjetos:

En un portaobjetos de 8 pocillos (Labtek Chamber Slide®, Nunc) células adherentes 42/95 tripsinizadas se sembraron a una densidad de entre 1×10^2 y 5×10^2 células por pocillo ($0,3 \text{ cm}^2$) en $300\mu\text{l}$ de medio RPMI 1640 con Glutamax® y 25mM HEPES, suplementado a una concentración final de penicilina G 100 U/ml, sulfato de estreptomicina 100 $\mu\text{g/ml}$ y 10% de suero fetal bovino. Al alcanzar entre 70% y 80% de confluencia, las células fueron fijadas en RPMI 1640 con 10% suero fetal bovino y 4% paraformaldehído durante 10 min y posteriormente lavadas con PBS 1X. Las células se conservaron entre 2° C y 8° C en oscuridad por un máximo de 7 días.

4.3.-Diseño de sondas de DNA para hibridación *in situ*:

Se diseñaron sondas sentido y antisentido basadas en la secuencia de los ncmtRNA humanos. (Tabla 1). Como sonda no relacionada se utilizó la sonda ISAV4, complementaria al RNA mensajero de una de las subunidades de la RNA polimerasa del virus de la anemia infecciosa de salmón. Además se utilizó una sonda complementaria al mRNA de la proteína fluorescente verde (GFP)

Tabla 1.- Sondas oligonucleotídicas de DNA utilizadas en HIS:

La tabla A) muestra las sondas de 23 nucleótidos complementarias a la secuencia sentido y antisentido del ncmtRNA, la enumeración indica la posición del primer núcleo con respecto a la secuencia del RNA 16S ribosomal sentido. En la tabla B) se muestra la secuencia de las sondas de 40 nucleótidos para detectar ncmtRNA sentido (sondas antisentido) y antisentido (sondas sentido). En la tabla C) se encuentra detallada la secuencia de las sondas control para los experimentos de hibridación *in situ*.

A	Sonda antisentido	Secuencia	Sonda sentido	Secuencia
	912	5' TGATTATGCTACCTTGCACGGT	912	5' ACCGTGCAAAGGTAGCATATTCA
	1260	5' AATAGGATTGCGCTGTTATCCCTA	1260	5' TAGGGATAACAGCGCAATCCTATT
	1535	5' GTTCTTGGGTGGGTGTGGG	1535	5' CCCACACCCACCCAAGAAC

B	Sonda antisentido	Secuencia
	912	5' CCTATTTAAGGAACAAGTGATTATGCTACCTTGCACGGT
	1535	5' CTGTTCTTGGGTGGGTGTGGGTATAATACTAAGTTGAGAT
	Sonda sentido	
	912	5' ACCGTGCAAAGGTAGCATAATCACTTGTTCCTTAAATAGG
	1535	5' ATCTCAACTTAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAACAG

C	Sonda	Secuencia
	18S as	5' AGTGGACTCATTCCAATTA
	18S as 40	5' CGCGTCTTATTCCATTATTCCTAGCTGCGGTATCCAG
	ISA4 as	5' CTTCCTGTCTTCCCGTTG
	GFP	5' AAGGTAGCATAATCACTTGT
	GFP 40	5' ATCTCAACTTAGTATTATACCCACACCCACCCAAGAACAG

4.3.1.-Preparación de sondas marcadas con Digoxigenina en el extremo 3':

Para marcar con digoxigenina los oligodeoxinucleótidos utilizados como sonda se mezcló 1µl de oligodeoxinucleótidos 50 µM con 4 µl de agua libre de nucleasas; Se agregó 2 µl de tampón TdT 5X (5X: ácido cacodílico 500 mM, DTT 0,5 mM, CoCl₂ 5

mM), 1 μ l dATP 9 mM, 1 μ l digoxigenina-11-dUTP 1mM y 0,5 μ l TdT 30U/ μ l (Promega), y se incubó a 37°C durante 60 min. De esta manera se obtuvieron 10 μ l de sonda de DNA marcada con digoxigenina, a una concentración de 5 μ M (Villegas y col, 2000). Este protocolo se escaló hasta un volumen final máximo de 25 μ l.

4.3.2.-Dot-Blot de sondas marcadas con Digoxigenina:

Para determinar si el marcaje de la sonda se realizó correctamente, se colocó 0,5 μ l de sonda marcada sobre una membrana de nitrocelulosa y se secó en horno UV a 1500 J. La membrana se bloqueó con una solución PBS 1X-BSA 2% durante 30 min, y se incubó con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (DAKO), en dilución 1:1.000, durante 90 min. Se lavó con PBS 1X-BSA 2% con formamida 8% durante 5 min y se reveló con la mezcla de sustrato NBT/BCIP (KPL) en tampón FAL (Tris 0,1 M, NaCl 0,1 M, MgCl₂ 5mM, pH 9,5) en oscuridad, durante 15 min.

4.4.-Hibridación *in situ*:

4.4.1.- Tratamiento de células con RNAsa:

Posterior a la fijación, células crecidas en portaobjetos de 8 pocillos fueron incubadas en 1X PBS, 0.1% Triton X-100 conteniendo 100 mg/ml de una mezcla de RNasa A y T, durante toda la noche a 37°C. Las células se lavaron con 1X PBS durante 10 minutos y se procedió con el protocolo de FISH.

4.4.2.- Tratamiento de células con DNAsa:

Posterior a la fijación, células crecidas en portaobjetos de 8 pocillos fueron incubadas en 1X PBS, 0.1% Triton X-100 conteniendo 100 mg/ml de DNAsa I, durante toda la noche a 37°C. Las células se lavaron con 1X PBS durante 10 minutos y se procedió con el protocolo de FISH.

4.4.3.-Hibridación *in situ* en esparcido celular:

Células no adherentes o tripsinizadas en medio de cultivo se centrifugaron durante 4 min a 2.400 rpm y el precipitado se resuspendió en 50 µl de 1X PBS. Alícuotas de 10 µl se esparcieron sobre portaobjetos silanizados (DAKO), y se dejaron secar a 37°C por 60 min. Las muestras se fijaron en RPMI 1640 10% SFB con 4% paraformaldehído durante 10 min, se lavaron dos veces con 1X PBS durante 5 min cada vez. Las células se trataron con 0,1% PBS/Tritón x-100 (Sigma) durante 10 min y se lavaron con 1X PBS, 2 veces durante 5 min. Las muestras se prehibridaron durante 90 min a 37°C con una solución de hibridación (50% formamida, 4X SSC, 1X Denhart (50X: 1% Ficoll 400, 1% polivinilpirrolidona, 1% BSA), 10% sulfato de dextrano, 150 µg/ml DNA de espermatozoide de arenque, 2mM EDTA, 150 µg/ml tRNA levadura) en cámara húmeda. Posteriormente las células se hibridaron en la misma solución anterior a la cual se le agregó las sondas correspondientes a una concentración final de entre 0,05 y 0,1 µM anteriormente marcadas con digoxigenina (Villegas y col, 2000). Se lavaron con 2X SSC (20X SSC: 3M NaCl, 300mM citrato de sodio, pH 7,0), durante 10 min, 1X SSC durante 10 min, 0,5X SSC durante 20 min a 42° C y 0,5X SSC durante 5 min. Luego las células se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con solución de bloqueo. Para

determinar la presencia de las sondas hibridadas al blanco, las células se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:300 (2.500 mU/ml) en la solución de bloqueo. Luego los portaobjetos se lavaron 2 veces con 1X PBS durante 10 min para eliminar el exceso de anticuerpo. El revelado se realizó incubando con una solución sustratos que contenía NBT/BCIP (KPL) en tampón FAL. Se observó la aparición de la marca bajo microscopio Olympus BX51 y se fotografió.

4.4.4.-Hibridación *in situ* en monocapa celular:

Células adherentes crecidas en portaobjetos de 8 o 16 pocillos se fijaron en RPMI 1640, 20% SFB, 4% paraformaldehído durante 10 min, se lavaron dos veces con 1X PBS durante 5 min cada vez. Las células se trataron con 0,1% PBS/Tritón x-100 (Sigma) durante 10 min y se lavaron con 1X PBS, 2 veces durante 5 min. Las muestras se prehibridaron durante 30 min a 37°C con una solución de hibridación en cámara húmeda. Posteriormente las células se hibridaron en la misma solución anterior a la cual se le agregó las sondas correspondientes a una concentración final de entre 0,2 y 0,1 μ M anteriormente marcadas con digoxigenina (Villegas y col, 2000). Se lavaron con 2X SSC, durante 10 min, 1X SSC durante 10 min, 0,5X SSC durante 20 min a 45°C y 0,5X SSC durante 5 min. Luego las células se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con solución de bloqueo. Posteriormente, las células se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente con un anticuerpo anti digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en dilución 1:300 (2.500 mU/ml) en la solución de bloqueo. Luego los portaobjetos se lavaron 2 veces con 1X PBS durante 10 min para eliminar el exceso de

anticuerpo. El revelado se realizó incubando con una solución sustratos que contenía NBT/BCIP (KPL) en tampón FAL. Se observó la aparición de la marca bajo microscopio Olympus BX51 y se fotografió.

4.5.-Hibridación *in situ* fluorescente (FISH):

4.5.1.-FISH en esparcido celular:

Células en medio de cultivo se centrifugaron durante 4 min a 2.400 rpm (610g) y el precipitado se resuspendió en 50 μ l de 1X PBS. Alícuotas de 10 μ l se esparcieron sobre portaobjetos silanizados (DAKO), y se dejaron secar a 37°C por 20 min. Las muestras se fijaron con 4% paraformaldehído en RPMI 1640 más 10% SFB durante 10 min, se lavaron dos veces con 1X PBS durante 5 min cada vez. Las células se trataron con 0,1% PBS/Tritón x-100 (Sigma) durante 10 min y se lavaron con 1X PBS, 2 veces durante 5 min. Las muestras se prehibridaron durante 2 h a 37°C en solución de hibridación en cámara húmeda. Posteriormente las células se hibridaron en la misma solución anterior a la cual se le agregó las sondas correspondientes marcadas con isotiocianato de fluoresceína (FITC) a una concentración entre 0,5 y 0,2 μ M durante toda la noche. Se lavó con 2X SSC, durante 10 min, 1X SSC durante 10 min, 0,5X SSC durante 20 min a 45° C y 0,5X SSC durante 5 min a temperatura ambiente y dos veces con 1X PBS durante 5 min a temperatura ambiente. Se agrega DABCO (2% 1,4-diazabicyclooctano en solución 90% glicerol) como medio de montaje y se observó la fluorescencia en un microscopio Olympus BX51 con sistema de epifluorescencia, y se fotografió.

4.5.2.-FISH en monocapa celular:

Células adherentes crecidas en portaobjetos de 8 o 16 pocillos se fijaron en RPMI 1640, 20% SFB, 4% paraformaldehído durante 10 min, se lavaron dos veces con PBS 1X durante 5 min cada vez. Las células se trataron con 0,1% PBS/Tritón x-100 (Sigma) durante 10 min y se lavaron con PBS 1X, 2 veces durante 5 min. Las muestras se prehibridaron durante 30 min a 37°C con una solución de hibridación en cámara húmeda. Posteriormente, las células se hibridaron en la misma solución anterior a la cual se le agregó las sondas correspondientes a una concentración final de entre 0,2 y 0,1 μM anteriormente marcadas con digoxigenina (Villegas y col, 2000). Se lavaron con 2X SSC, durante 10 min, 1X SSC durante 10 min, 0,5X SSC durante 20 min a 45°C y SSC 0,5X durante 5 min. Luego las células se incubaron por 30 min a temperatura ambiente con solución de bloqueo. Para detectar la presencia de la sonda de DNA marcada con digoxigenina, las células se incuban con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a rodamina o isotiocianato de fluoresceína diluido 1/200 en solución de bloqueo, durante 2 h, luego se centrifuga durante 4 min a 2.400rpm, se descarta el sobrenadante y se lava 2 veces durante 5 min con PBS 1X, se centrifuga durante 4 min a 2.400rpm. Se evaluó la fluorescencia en un microscopio Olympus BX51 con sistema de epifluorescencia.

4.6.-FISH en suspensión celular:

Se realizaron las siguientes modificaciones al protocolo de FISH para analizar células en suspensión:

4.6.1.-Fijación celular:

Las células se fijaron durante 10 minutos en 4% paraformaldehído en RPMI 1640 con 10% SFB 37°C, en lugar de 4% paraformaldehído en 1X PBS. Al fijar en el mismo medio y a la misma temperatura de cultivo resulta en una mejor conservación de la morfología celular además de minimizar la agregación y el daño estructural celular.

4.6.2.-Permeabilización celular:

La solución de permeabilización (0,3% triton x-100 en PBS 1X) resultó ser muy abrasiva por lo que provocaba daño en la estructura además de agregación celular. Al disminuir la concentración del detergente a 0,1% tritón x-100 en 1X PBS o 0,1% Tween 20 en 1X PBS, obtuvimos un mejor resultado en la conservación de la estructura celular, pero manteniendo la aglutinación, que eventualmente dificultarían la realización de citometría de flujo en dichas muestras. Por otro lado, se utilizaron permeabilizantes no detergentes como 0.2 N HCl (Villegas, 2000) con el fin de prevenir la aglomeración celular obteniendo una mejor preservación de la estructura celular, pero una permeabilización menos eficiente.

Finalmente decidimos permeabilizar con 8mM 2-β-mercapto etanol en 1X PBS, lo cual preserva la estructura celular de mejor manera, y permite una permeabilización suficiente para permitir la hibridación.

4.6.3.-Prehibridación e hibridación:

Debido a que la alta viscosidad de la solución de hibridación provocaba problemas al centrifugar la mezcla de hibridación durante el proceso de lavado posterior, se eliminó el sulfato de dextrano de la solución de hibridación.

4.6.4.-Lavados:

Los lavados posteriores a la hibridación (ver Materiales y Métodos) fueron reemplazados con un único lavado con SSC 2X en 5 veces el volumen de hibridación (posterior a la centrifugación y eliminación del sobrenadante), debido a que la solución SSC 0.2X (30mM NaCl y 3mM citrato de sodio) provoca lisis en las células en suspensión dada su hipotonicidad aún cuando las células están fijadas. Asimismo, los lavados con PBS 1X se reemplazaron por lavados con 1X PBS-BSA 2% los cuales otorgan un precipitado de mejores características en el momento de centrifugar.

4.6.5.-FISH en suspensión de células:

Células tripsinizadas o crecidas en suspensión fueron centrifugadas durante 4 min a 2400 rpm (610 g) a 4°C, el sobrenadante fue descartado y las células fueron fijadas durante 15 min en medio RPMI 1640 con 10% SFB y 4% paraformaldehído a temperatura ambiente y luego centrifugadas durante 4 min a 2.400rpm. El sobrenadante fue descartado, y las células se lavaron con 1X PBS durante 2 min, y se centrifugaron durante 4 min a 2.400 rpm. EL sobrenadante fue descartado y las células se permeabilizaron con una solución fresca de 8mM 2-β-mercapto etanol en 1X PBS durante 10 min a temperatura ambiente y luego centrifugadas durante 4 min a 2.400rpm.

Las células se lavaron con PBS 1X durante 2 min, y se centrifugaron durante 4 min a 2.400rpm. Las células se prehibridaron durante 2 h en solución de prehibridación sin sulfato de dextrano en cámara húmeda a 37°C. Se agregó la sonda de DNA marcada con digoxigenina, diluida en solución de hibridación, a una concentración entre 0,5 y 0,1 μM y se hibridó a 42°C en cámara húmeda durante toda la noche. Se centrifuga durante 4 min a 2400rpm. El sobrenadante se descartó y las células se lavaron con 2X SSC durante 5 min, las células se centrifugaron durante 4 min a 2.400rpm. Luego se lava con 1X PBS durante 5 min y se centrifugó durante 4 min a 2.400rpm. Para detectar la presencia de la sonda de DNA marcada con digoxigenina, las células se incubaron con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a isotiocianato de fluoresceína diluido 1/200 en solución de bloqueo, durante 2 h, luego se centrifugó durante 4 min a 2400rpm, se descartó el sobrenadante y se lava 2 veces durante 5 min con 1X PBS, se centrifuga durante 4 min a 2.400rpm. La fluorescencia se evaluó en un microscopio Olympus BX51 con sistema de epifluorescencia o se conservaron en PBS 1X con azida de sodio 0,1% y en oscuridad, para su posterior análisis mediante citometría de flujo.

4.7.- Tinción de elementos subcelulares:

4.7.1.-Tinción nuclear mediante DAPI:

Para identificar el núcleo celular con fines de comparación se utilizó tinción con DAPI (4'-6-Diamidino-2-fenilindol), compuesto fluorescente que forma complejos con el DNA de doble hebra, principal componente del núcleo celular. Posterior al protocolo de hibridación *in situ*, las células se lavaron con PBS 1X, y posteriormente se incuban en PBS 1X con 10 $\mu\text{g/ml}$ DAPI durante 15 min. Posteriormente las células se lavan con

PBS 1X y se procedió al montaje para microscopía de epifluorescencia y posterior observación excitando a una longitud de onda de 350 nm.

4.7.2.-Identificación de mitocondrias por microscopía de epifluorescencia:

Para efectos comparativos, se utilizó MitoTracker[®] (Molecular Probes) para visualizar la ubicación de las mitocondrias en contraste con la marca obtenida para el mtRNA no codificante. Células 42/95 crecidas en portaobjetos de 8 pocillos (Labtek Chamber Slide[®], Nunc), hasta un 70% a 80% de confluencia, fueron lavadas con medio GKN (1X PBS, 10 mM glucosa, 10 μ M rojo fenol) y se les agregó medio completo (RPMI 1640 con Glutamax[®] y 25mM HEPES, suplementado a una concentración final de 100 U/ml penicilina G, 100 μ g/ml sulfato de estreptomicina y 10% de suero fetal bovino) con 70 nM de MitoTracker[®] Red. Se incubó durante 30 min a 37°C, y posteriormente se lavó con PBS 1X durante 5 min. Las células fueron fijadas en RPMI 1640 con 10% SFB y 4% paraformaldehído durante 10 min y posteriormente lavadas con PBS 1X. Los portaobjetos se conservaron entre 2° C y 8° C en oscuridad por un máximo de 7 días.

4.7.3.-Inmunocitoquímica para detectar PCNA:

Para determinar la coexpresión de los ncmtRNAs y el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) se utilizó la detección inmunocitoquímica de este antígeno en conjunto con FISH. Durante realización del protocolo de FISH, tras los lavados posteriores a la hibridación, se lavó las células con PBS 1X y se incubaron con anticuerpo monoclonal anti-PCNA hecho en ratón, en solución de bloqueo, por 2 h a

temperatura ambiente. Se lavó con PBS-BSA 2% por 5 min, y se incubó con anti-IgG de ratón conjugado a Alexa Fluor^{MR} 555 para detectar el PCNA y con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a FITC para detectar la sonda hibridizada. Se lavó con PBS 1x y se procedió a montar para observar bajo el microscopio de epifluorescencia.

4.8.-Microscopía de epifluorescencia:

4.8.1.-Microscopía de epifluorescencia para FISH de esparcido celular:

Sobre los portaobjetos en los cuales se realizó FISH se agregó 10 µl de DABCO o de Fluoromount^{MR} (Southern Biotech) y luego se utilizó un cubreobjetos para cerrar la muestra. Se observó bajo el objetivo de 40X (400X aumento total) en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51, utilizando un filtro cúbico (excitación de 506 y emisión de 529 nm). La documentación fue realizada con una cámara digital para microscopía (Qimaging digital camera) con el software QCapture Pro (Qimaging Corp.)

4.8.2.-Microscopía de epifluorescencia para FISH en monocapa celular:

En portaobjetos de 8 o 16 pocillos, se descartó la solución PBS 1X presente, luego utilizando el dispositivo proporcionado por el fabricante se desmontaron los pocillos del portaobjetos; se agregó 3 µl de DABCO o de Fluoromount^{MR} (Southern Biotech) por pocillo y luego se utilizó un cubreobjetos para cerrar la muestra. Se observó bajo el objetivo de 40X (400X aumento total) en un microscopio de epifluorescencia Olympus BX51, utilizando un filtro cúbico (excitación de 506 y emisión de 529 nm). La documentación fue realizada con una cámara de microscopía (Qimaging digital camera) con el software QCapture Pro (Qimaging Corp.)

4.9.-Citometría de flujo:

El análisis de la marca obtenida por FISH en suspensión se realizó mediante microscopía de epifluorescencia, detallado en el punto anterior, y además mediante citometría de flujo en el Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile.

Posterior al protocolo de FISH, se llevó la muestra a una concentración de 500.000 células/ml en PBS 1X y se procedió al análisis en el citómetro de flujo (Becton Dickinson FACScan) bajo la dirección de la Dra. María Rosa Bono. Se utilizó un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a FITC y anticuerpo anti-FITC conjugado a Alexa Fluor^{MR} 488, detectado mediante emisión de fluorescencia en el rango de los 530 nm, al ser excitado por un láser de Argón a 488 nm. Se tomó un mínimo de 10.000 eventos por muestra y la adquisición de datos se realizó mediante el programa Cell Quest (Becton Dickinson). Los análisis de datos se realizaron utilizando el programa WinMDI 2.9 (<http://facs.scripps.edu/wm29w98.exe>).

5.-RESULTADOS:

5.1.-Expresión de los ncmtRNAs:

5.1.1.-Expresión diferencial de los ncmtRNA sentido y antisentido en células tumorales:

Para corroborar los resultados anteriormente descritos en nuestro laboratorio se realizó HIS en cultivos de células 42/95, HL60 y Devernelle, como modelos de células tumorales. Las células 42/95 son adherentes y crecen en forma de monocapas, mientras que las células HL60 y Devernelle crecen en suspensión lo que las hace buen modelo de células tumorales circulantes.

En todas las células se detecta ncmtRNA sentido, observándose en células 42/95 una marca perinuclear, mientras que no es posible observar marca para el ncmtRNA antisentido (Figura 7). En las células HL60 y Devernelle la marca es más difícil de localizar, debido a la pequeña cantidad de citoplasma (Figura 7B y 7C). Estos resultados corroboran que existe una expresión diferencial de estos transcritos en células tumorales, detectable mediante HIS. Se utilizó la sonda 18S as como control positivo y la sonda ISAV4 como control negativo.

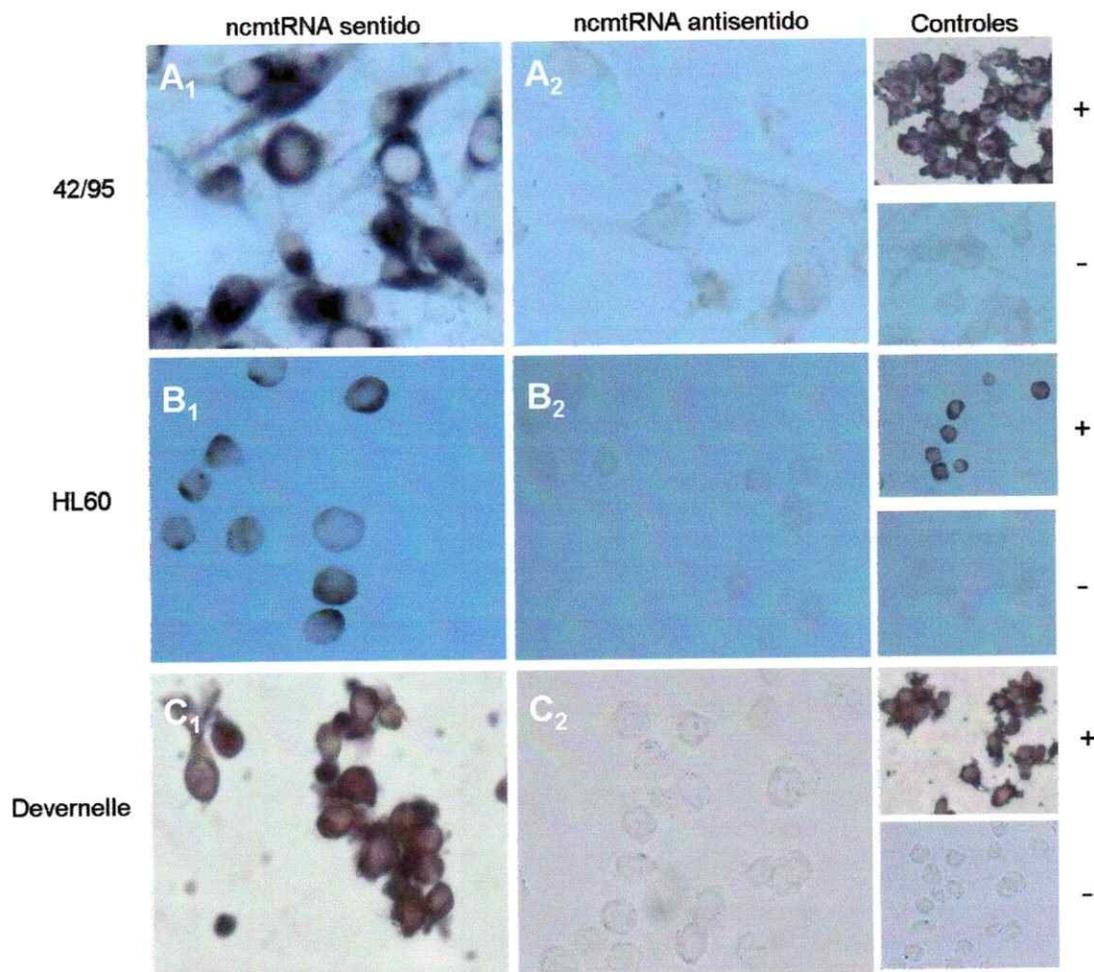
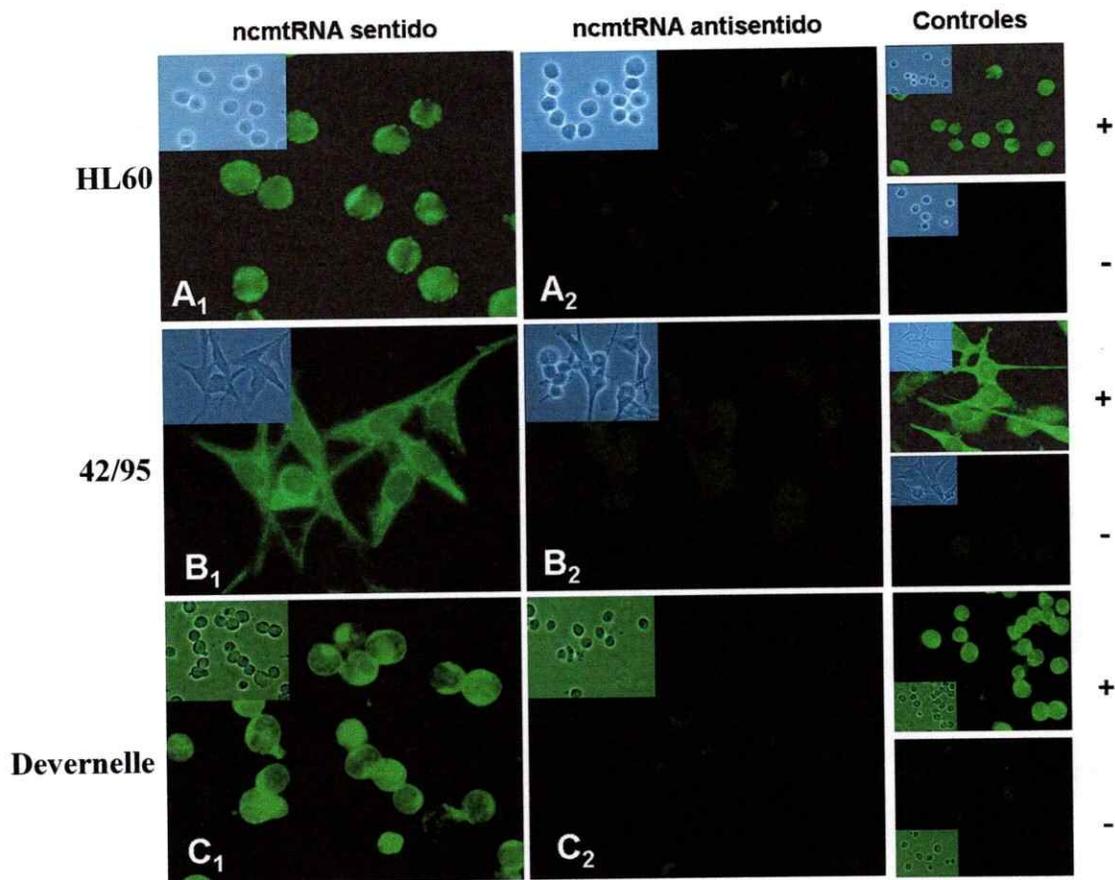


Figura 7.- Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en líneas tumorales humanas:

Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido (1) y antisentido (2) mediante hibridación *in situ* con la sonda 912as-DIG y 912s-DIG respectivamente en cultivos primarios humanos. Para evidenciar la hibridación de las sondas, las células se incubaron con anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina como esta descrito en materiales y métodos. Células de melanoma 42/95 (A), HL60 (B) y Devernelle (C), expresan solamente ncmtRNA sentido, mientras que no es posible detectar el transcrito antisentido. Se utilizó la sonda 18S as (+) como control positivo y la sonda ISAV4 como control negativo (-). Objetivo 40X.

5.1.2.-Expresión diferencial de ncmtRNA sentido y antisentido en células tumorales mediante FISH:

Con el objetivo de establecer un punto de comparación entre la técnica de HIS en fase sólida y de HIS fluorescente en suspensión, se realizó FISH en cultivos celulares correspondientes a células tumorales, 42/95, HL60 y Devernelle. Se analizó la expresión del ncmtRNA sentido y antisentido, así como el 18S rRNA. Como sonda no relacionada se utilizó la sonda ISAV4 as-DIG. Para detectar la sonda hibridada mediante microscopía de epifluorescencia, se reveló utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC, Roche). En las células estudiadas, se observa marca para el ncmtRNA sentido (Figura 8, subíndice 1), mientras que no se observa señal para el ncmtRNA antisentido (Figura 8, subíndice 2). En las células 42/95 se puede observar una distribución perinuclear para el ncmtRNA sentido, coherente con los resultados obtenidos anteriormente (Figura 7). Los controles 18S as (+) e ISAV (-) mostraron los resultados esperados.



8.- Expresión del ncmtRNA sentido y antisentido en líneas celulares tumorales revelada mediante FISH. La expresión del ncmtRNA sentido (1) y antisentido (2) fue evaluada mediante FISH en las líneas tumorales HL60 (A), 42/95 (B) y Devernelle (C), utilizando la sonda 912as-DIG y 912s-DIG para detectar el ncmtRNA sentido y antisentido respectivamente. Se observa una clara expresión diferencial de los transcritos en las tres líneas celulares, obteniendo señal de hibridación para el transcrito sentido (A₁, B₁, C₁), mientras que no se aprecia una señal para el transcrito antisentido (A₂, B₂, C₂). Este patrón de expresión es el mismo para las tres líneas celulares. Como controles de hibridación se utilizó la sonda 18S as-DIG (+) e ISAV4 as-DIG (-) para cada tipo celular. Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo de la muestra. Objetivo 40X.

5.1.3.-Expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en células normales proliferantes:

Para evaluar la expresión de los ncmtRNA en células normales, se realizó hibridación *in situ* en cultivos primarios de no más de 4 pasajes de fibroblastos de médula ósea, células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) y queratinocitos de prepucio humano. Para detectar ncmtRNA sentido y antisentido, se utilizó la sonda 912as-DIG y 912s-DIG respectivamente. Como se describió anteriormente, como control positivo se utilizó la sonda 18Sas-DIG para detectar rRNA 18S, mientras que se utilizó como control no relacionado la sonda ISAV4as-DIG antisentido para virus ISAV. En células HUVEC, fibroblastos de médula ósea y queratinocitos de prepucio humano se puede detectar tanto el ncmtRNA sentido como el transcrito antisentido (Figura 9). Estos resultados muestran una diferencia en el perfil de expresión de estos transcritos entre células normales proliferantes y células correspondientes a distintas líneas tumorales humanas, específicamente para el transcrito no codificante mitocondrial antisentido. Los controles 18S as (+) e ISAV (-) mostraron los resultados esperados.

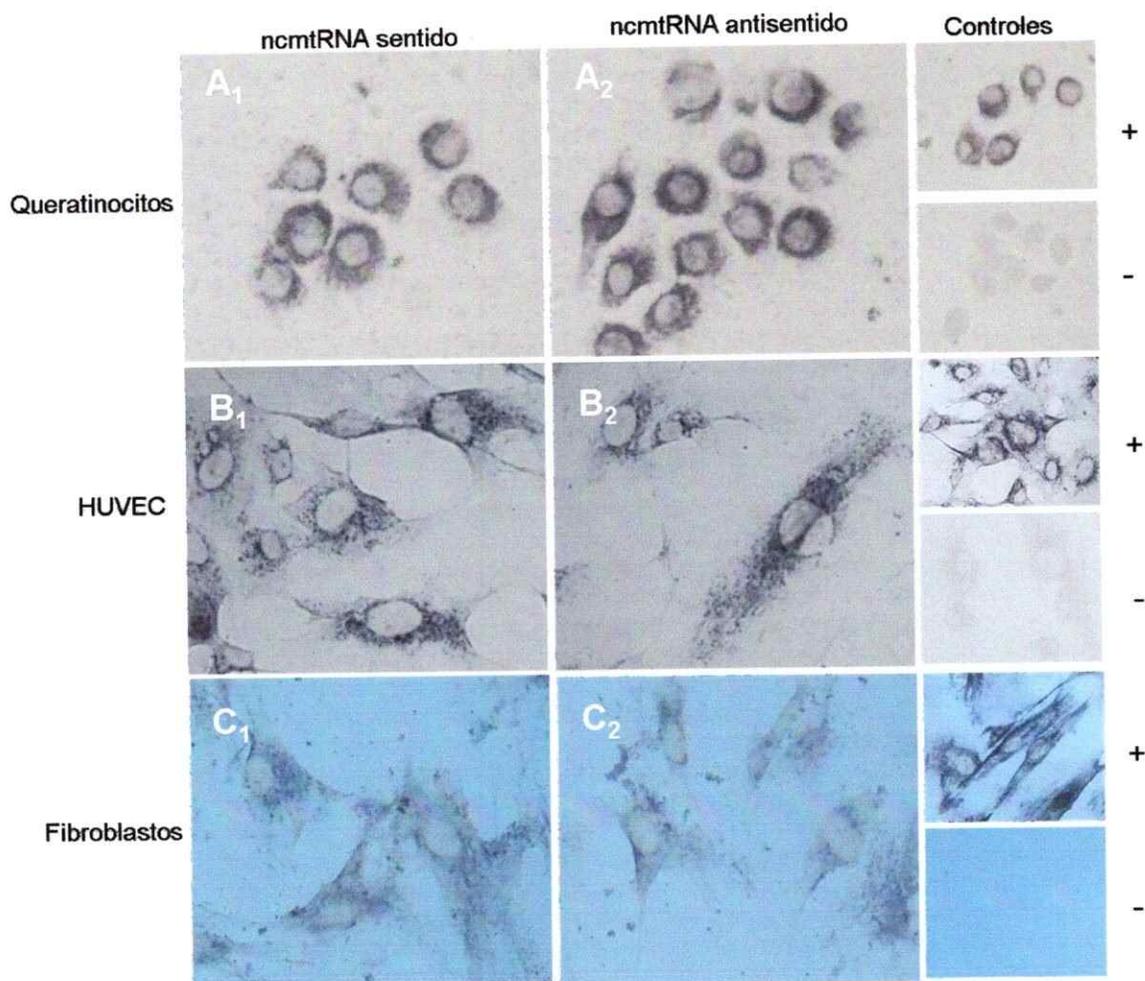


Figura 9.- Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en células normales proliferantes:

Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido (1) y antisentido (2) mediante hibridación *in situ* con la sonda 912as-DIG y 912s-DIG respectivamente en cultivos primarios humanos. Para evidenciar la hibridación de las sondas, las células se incubaron con anti-digoxigenina conjugada con fosfatasa alcalina como esta descrito en Materiales y Métodos. Queratinocitos de prepucio humano (A), células HUVEC (B) y fibroblastos de médula ósea (C) de no más de 4 pasajes, expresan tanto ncmtRNA sentido como antisentido, con una marca de similar intensidad. Se utilizó la sonda 18S as (+) como control positivo y la sonda ISAV4 como control negativo (-). Objetivo 40X.

5.1.4.-Determinación mediante FISH de la expresión de los ncmtRNAs en células normales proliferantes:

Para el objetivo fundamental de esta tesis, se estudió mediante FISH la expresión del ncmtRNA en cultivos primarios de células HUVEC, fibroblastos de médula ósea y queratinocitos de prepucio humano, como modelos de células normales en proliferación. De igual manera, se utilizó las sondas de DNA 912as y 912s para detectar la expresión del ncmtRNA sentido y antisentido, respectivamente. Como control positivo se utilizó la sonda 18Sas-DIG. Como sonda no relacionada se utilizó la sonda ISAV4as-DIG. Podemos apreciar señal de hibridación tanto para ncmtRNA sentido como antisentido en células HUVEC, fibroblastos de médula ósea y queratinocitos de prepucio humano (Figura 10), corroborando el resultado observado mediante inmunocitoquímica (Figura 9). Es importante mencionar que la intensidad de la marca es similar para ambos transcritos, y que el 100% de las células presenta marca. Se utilizó la sonda 18S as como control positivo y la sonda ISAV4 como control negativo.

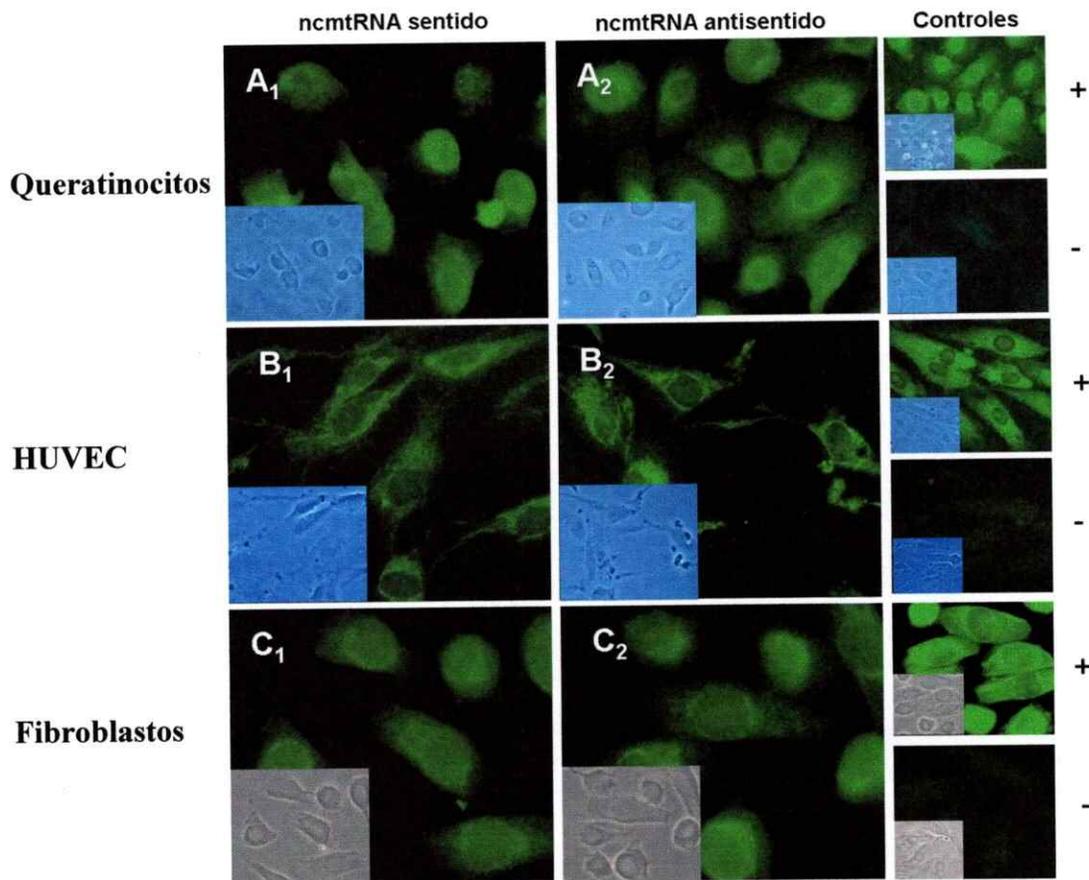


Figura 10.- Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en cultivos primarios de células normales proliferantes mediante FISH:

Determinación de la expresión de los ncmtRNA sentido (1) y antisentido (2) mediante hibridación *in situ* fluorescente con la sonda 912as-DIG y 912s-DIG respectivamente en cultivos primarios humanos. Para evidenciar la hibridación de las sondas, las células se incubaron con anti-digoxigenina conjugada con FITC. Queratinocitos de prepucio humano (A), células HUVEC (B) y fibroblastos de médula ósea (C) de no más de 4 pasajes, expresan tanto ncmtRNA sentido como antisentido, con una marca de similar intensidad. Como control positivo se utilizó la sonda 18S as (+) y como control negativo la sonda ISAV4 as (-). Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo en la muestra. Objetivo 40X.

5.1.5.-Determinación de la expresión de los ncmtRNAs en células no proliferantes:

Se realizó FISH en linfocitos humanos en reposo como modelo de células normales no proliferantes (Figura 11). Los linfocitos fueron obtenidos mediante hemólisis hipotónica de muestras de sangre de un individuo sano. Los linfocitos no presentan expresión de ncmtRNA sentido ni antisentido, coincidiendo con resultados anteriores de nuestro laboratorio, (Santander, 2004). Similares resultados se obtuvieron con linfocitos de otros donantes sanos.

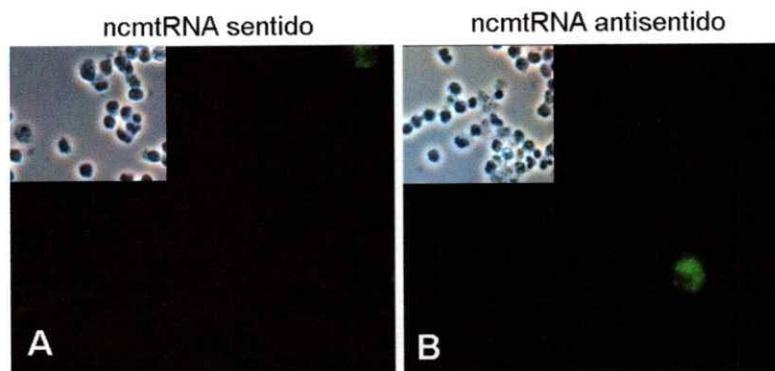


Figura 11.-Determinación de la expresión de los ncmtRNAs en linfocitos en reposo:

FISH en linfocitos humanos en reposo para determinar la expresión del ncmtRNA sentido (A) y antisentido (B). Prácticamente no es posible observar marca para ninguno de los transcritos. En el panel B se observa un linfocito marcado de un total de 35 células en el mismo campo. Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo en la muestra. Objetivo 40x.

5.1.6.-Co-expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) y los ncmtRNAs:

Con el objetivo de evidenciar la relación que existe entre la expresión del ncmtRNA tanto sentido como antisentido y el estado proliferativo en células tumorales (melanoma humano, 42/95) y normales proliferantes (queratinocitos de prepucio humano), se realizó inmunocitoquímica para detectar el antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) simultáneamente con FISH en células tumorales y células normales proliferantes. La inmunocitoquímica para PCNA y el FISH para el transcrito sentido o antisentido se realizaron en muestras separadas para cada una de estas líneas celulares. En células tumorales (Figura 12A) existe una co-expresión entre el ncmtRNA sentido y PCNA mientras que no hay señal para el transcrito antisentido. En células provenientes de cultivo primario de queratinocitos de prepucio humano (Figura 12B), hay co-expresión de PCNA tanto con el ncmtRNA sentido como con el antisentido. El FISH reveló la aparición de una leve marca nuclear tanto para el transcrito sentido como antisentido, no presente en células tumorales.

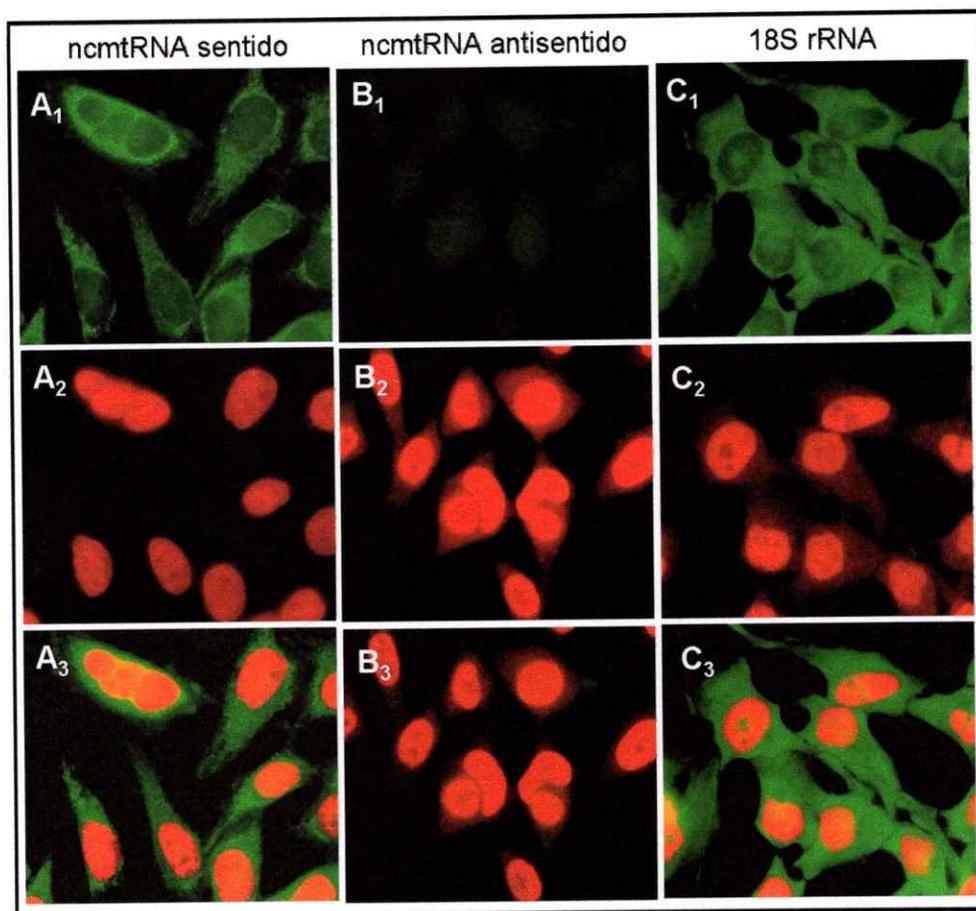


Figura 12A.- Co-expresión de los ncmtRNAs y PCNA en células tumorales:

FISH (1) en células 42/95 utilizando sondas oligonucleotídicas de DNA específicas para ncmtRNA sentido (A), antisentido (B) y RNA 18S ribosomal como control positivo (C), realizada en paralelo con inmunocitoquímica para detectar el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) (2). La superposición (3), indica que en células tumorales existe una coexpresión del ncmtRNA sentido y PCNA, mientras que esta co-expresión no ocurre con el ncmtRNA antisentido. Objetivo 40X.

Queratinocitos

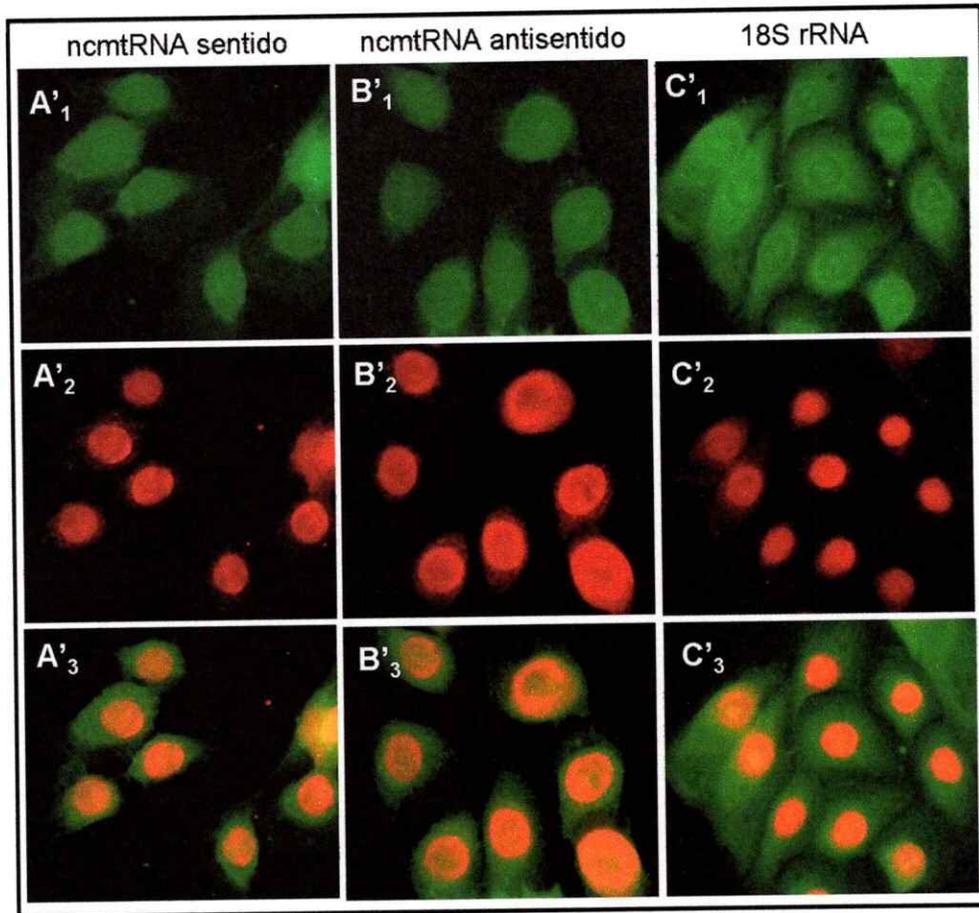


Figura 12B.-Co-expresión de los ncmtRNAs y PCNA en células normales proliferantes:

FISH (1) Queratinocitos de prepucio humano utilizando sondas oligonucleotídicas de DNA específicas para ncmtRNA sentido (A'), antisentido (B') y RNA 18S ribosomal como control positivo (C'), realizada en paralelo con inmunocitoquímica para detectar el antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) (2). La superposición (3), indica que en cultivo primario de células normales existe co-expresión de ambos transcritos con PCNA (A'₃, B'₃).Objetivo 40X.

5.1.7.- Determinación de la especificidad de la reacción de FISH:

Para confirmar que la marca obtenida por FISH se debe a la detección de RNA y no de DNA mitocondrial, previamente a la HIS, células 42/95 se trataron con una mezcla de RNAsa A y T o con DNAsa I como está descrito en materiales y métodos. La figura 13 muestra el resultado de un FISH para detectar ncmtRNA sentido y antisentido, sin tratamiento previo (A), tratado con RNAsa (B) y con DNAsa (C).

El tratamiento con RNAsa elimina completamente la señal de hibridación, tanto para el ncmtRNA sentido como para el control positivo 18S rRNA, lo que demuestra que la marca obtenida es debido a la hibridación de la sonda con RNA. La contratinción con DAPI muestra que el DNA celular está intacto y que no hay hibridización entre la sonda y éste. No se observa marca para el ncmtRNA antisentido.

Al tratar con DNAsa, se observa una disminución de la intensidad en la tinción de DAPI debido a la degradación del DNA celular, pero no se observa diferencia en el resultado de FISH en comparación con la muestra sin tratamiento, confirmando el resultado anterior.

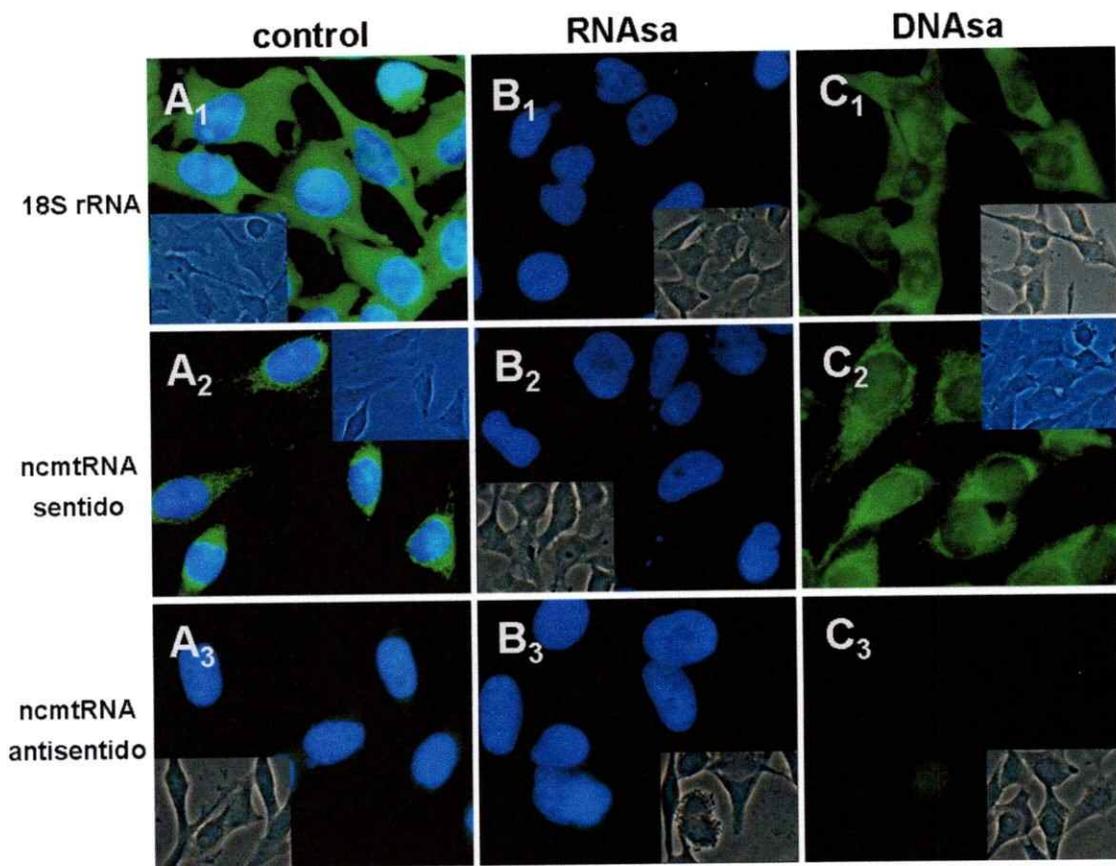


Figura 13.-Efecto del tratamiento con RNAsa o DNAsa en la señal de hibridación obtenida mediante FISH:

FISH y tinción con DAPI en células 42/95 (A), con previo tratamiento de RNAsa (B) y DNAsa (C). La marca para rRNA 18S (1), ncmtRNA sentido (2) desaparece al tratar la muestra con RNAsa antes de realizar la hibridación (B₁ y B₂ respectivamente). Como es de esperar, no hay detección del ncmtRNA antisentido (3). Al tratar las muestras con DNAsa (C) podemos observar una disminución de la tinción con DAPI, pero la marca para los ncmtRNA y para el 18S rRNA permanece idéntica a las muestras no tratadas. Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo en la muestra. Objetivo 40X.

5.2.-Optimización del método de FISH:

5.2.1.-Sondas oligonucleotídicas marcadas con FITC en el extremo 3':

Con el objeto de lograr una señal más específica de FISH para el ncmtRNA, se utilizó la sonda 912 sentido y antisentido marcadas en el extremo 3' con FITC (912s-FITC y 912as-FITC), evitando utilizar anticuerpo secundario, y así teóricamente obtener una señal más específica. Además, se utilizó una concentración de sonda que varió desde 0.025 μM hasta 1 μM (Figura 13).

En células 42/95 es posible visualizar una marca definida para el ncmtRNA sentido a una concentración de 0.25 μM , la cual incrementa al utilizar una concentración de 1 μM (Figura 14, comparar A₂ con A₃) A concentraciones de sonda inferiores a 0.25 μM no es posible distinguir una clara señal de hibridación (Figura 14, A₁). En el caso del ncmtRNA antisentido, no es posible observar señal de hibridación en los rangos desde 0.05 μM hasta 1 μM de sonda oligonucleotídica. Tanto para el control negativo (ISAV) como el positivo (18S rRNA) los resultados son los esperados en el rango de concentraciones de sonda utilizadas en los experimentos (Fig. 14, C y D).

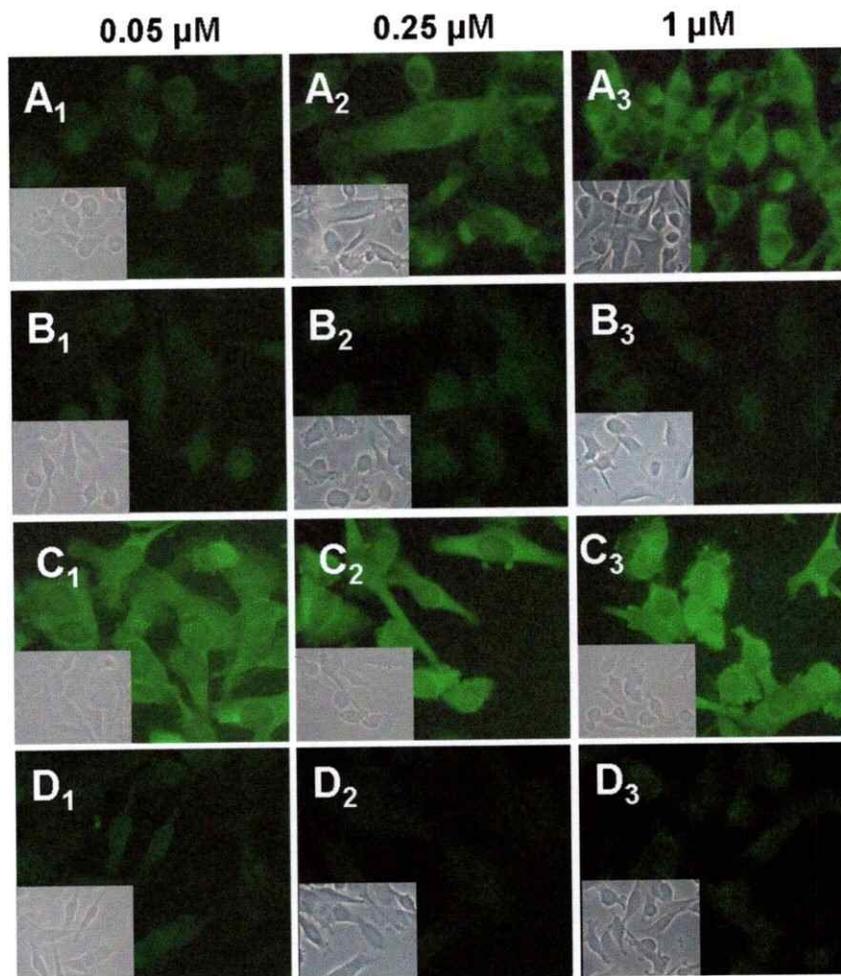


Figura 14.-Efecto de la concentración de la sonda fluorescente:

Con el objetivo de obtener una señal de hibridación más específica, células 42/95 se hibridaron con la sonda 912as-FITC (A) y 912s-FITC (B) a concentraciones de 0.05 μM (subíndice 1), 0.25 μM (subíndice 2) y 1 μM (subíndice 3). A una concentración de 0.050 μM no es posible detectar señal de hibridación para el ncmtRNA sentido (A₁), mientras que sobre 0.25 μM se obtiene también una señal positiva. Para el ncmtRNA antisentido, no es posible detectar señal de hibridación en el rango de concentración estudiado. En C) se muestran los controles positivos (18S as-FITC) y en D) se muestran los resultados del control negativo (GFP-FITC) a las distintas concentraciones analizadas. Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo en la muestra. Objetivo 40X.

5.2.2.- Uso de sondas oligonucleotídicas de mayor tamaño:

Tomando en cuenta que el tamaño de las sondas oligonucleotídicas utilizadas es menor a las utilizadas para FISH en la literatura (Urisman y col, 2006), existe la posibilidad que la hibridación entre la sonda y el transcrito blanco no sea óptima y que el híbrido se disocie parcialmente durante los lavados y obteniéndose una señal de hibridación de menor intensidad. Además, la presencia de digoxigenina y su brazo o el grupo FITC en el extremo 3' podría causar un grado de impedimento estérico para una hibridación total de la sonda. Por lo tanto, para determinar si la señal de hibridación dependía del largo de la sonda, se diseñaron versiones de 40 nucleótidos de las sondas 18S as, ISAV, 912s, 912as, 1535s y 1535as (Tabla 1) consistentes en la adición de 10 nucleótidos a cada extremo de la sonda original. Para mantener la especificidad, se aumentó la temperatura de hibridación de 42°C a 50°C.

En células 42/95 pudimos observar, que la señal obtenida con la sonda 912as de 40 nt fue similar al obtenido con la sonda de 20 nucleótidos (Figura 15, A). La sonda 912s de 20 o 40 nt no presenta señal de hibridación (Figura 15, B). Sorprendentemente, en el caso de la sonda 1535as, la señal de hibridación se pierde al utilizar la sonda de 40 nucleótidos de largo, en contraste con la clara señal que se obtiene al usar la sonda 1535as de 20 nucleótidos de largo que es comparable a la obtenida con las sondas 912as (Figura 15 C). La señal de hibridación para la sonda 1535s fue negativa en ambos casos (Figura 15 D). Se utilizó la sonda 18Sas positivo y la sonda ISAV como negativo (Figura 15, E y F respectivamente). Los controles positivo (sonda 18S as) y negativo (sonda ISAV) dieron los resultados esperados.

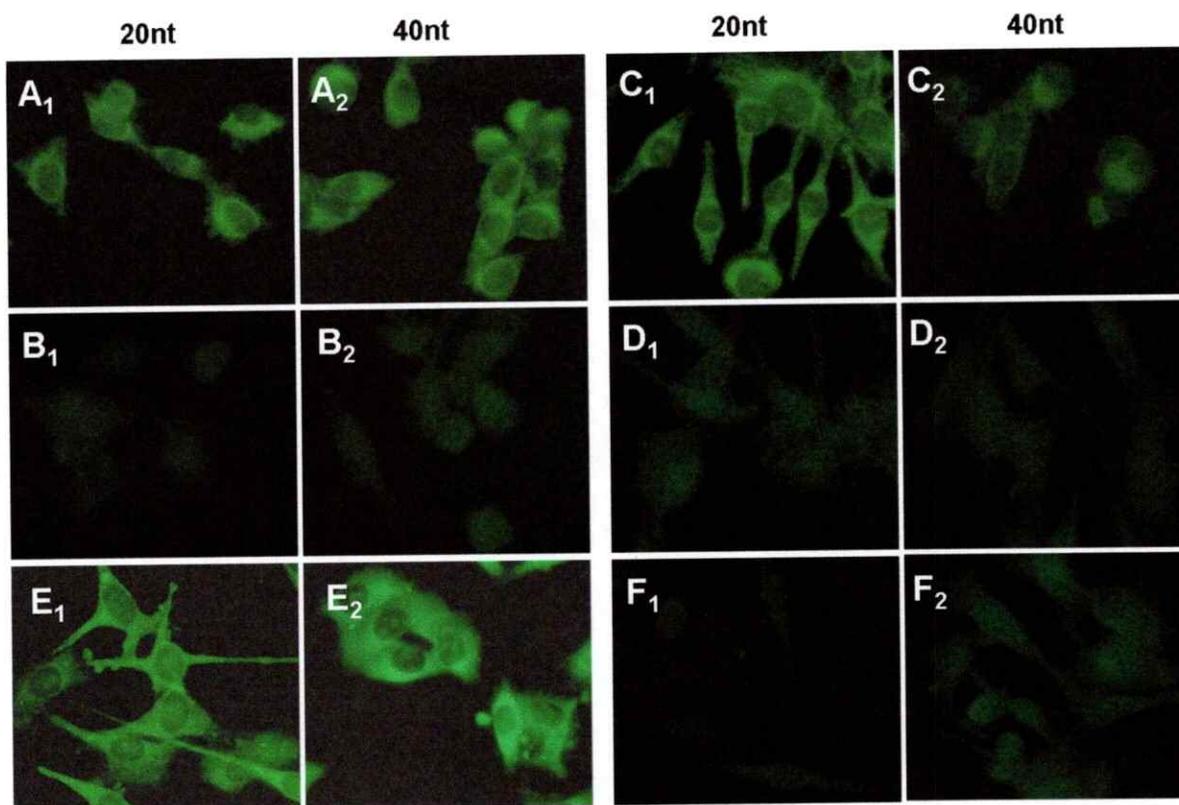


Figura 15.-Comparación de FISH utilizando sondas 20 y 40 nucleótidos de largo:

Se realizó FISH en células 42/95 utilizando las sondas 912as-DIG (A), 912s-DIG (B), 1535as-DIG (C), 1535s-DIG (D), 18Sas-DIG (E), ISAV4as-DIG (F), cada una en su versión de 20 nucleótidos (subíndice 1) y 40 nucleótidos (subíndice 2). La intensidad de señal para el ncmtRNA sentido es similar al utilizar la sonda 912as de 20 nt (A₁) y 40 nt (A₂) mientras que no hay señal de hibridación para el ncmtRNA antisentido al utilizar las sondas 912s, y 1535s en sus dos tamaños. Sorprendentemente, no hay una clara señal para el ncmtRNA sentido utilizando la sonda 1535as de 40 nt (C₂) mientras que la misma sonda de 20 nt produce una clara marca de hibridación (C₁). Objetivo 40X.

5.2.3.-Utilización simultánea de varias sondas:

Para amplificar la señal de hibridación se planteó utilizar una serie de sondas complementarias a secuencias de distintas regiones de la molécula de ncmtRNA tanto sentido como antisentido. Teóricamente, las moléculas de ncmtRNA estarían hibridadas con cada una de las sondas, lo que amplificará la intensidad de la señal de hibridación (Figura 16).

Al realizar este experimento en células 42/95, la señal de hibridación para el ncmtRNA sentido mostró tener en todas las células la misma distribución subcelular que la señal obtenida al utilizar las sondas por separado, pero con un notable aumento de la intensidad de la fluorescencia (Figura 17 D₁). Es importante hacer notar que siempre que se utilizó una sola sonda (Figura 17 A, B o C; o Figuras anteriores), la señal de hibridación fue menor que la obtenida con el control positivo 18S rRNA. En cambio, al utilizar las tres sondas, las señales de hibridación son comparables en intensidad con la del 18S rRNA (Figura 17, comparar D con E). En el caso de la señal de hibridación para el ncmtRNA antisentido, no hubo un aumento significativo en la intensidad de hibridación al utilizar distintas sondas simultáneamente, mostrando que la técnica mantiene su especificidad a pesar aumentar la cantidad y concentración de las sondas (Figura 16 D₂).

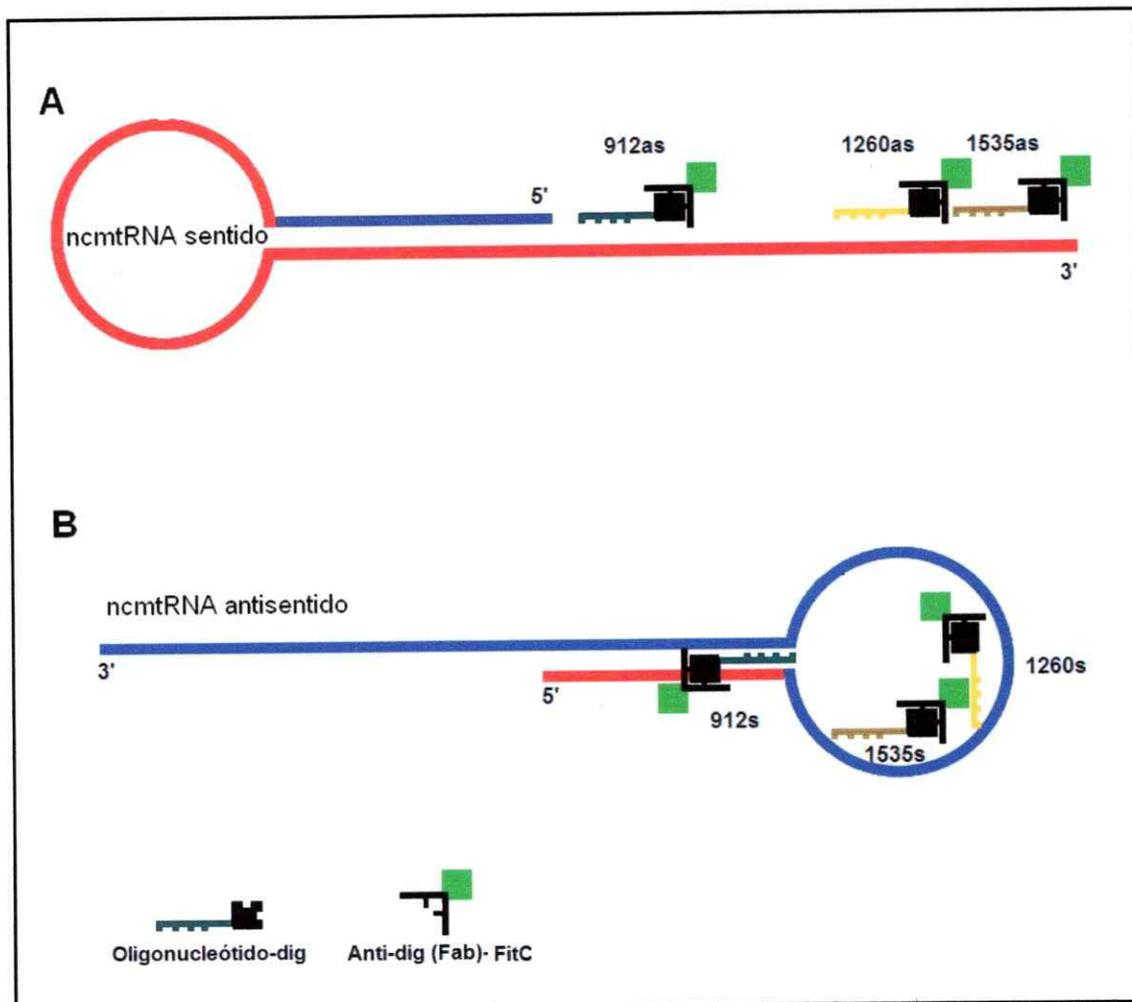


Figura 16.-Esquema de la hibridación de distintas sondas oligonucleotídicas específicas para el ncmtRNA sentido y antisense:

Tres pares de sondas específicas para los transcritos hibridan en distintas zonas del ncmtRNA sentido y antisense. En rojo la secuencia correspondiente al transcrito sentido del gen 16S ribosomal, en azul la secuencia correspondiente al transcrito antisense. Estas sondas son utilizadas simultáneamente durante la hibridación *in situ* con el fin de lograr una marca de mayor intensidad, manteniendo la especificidad del método.

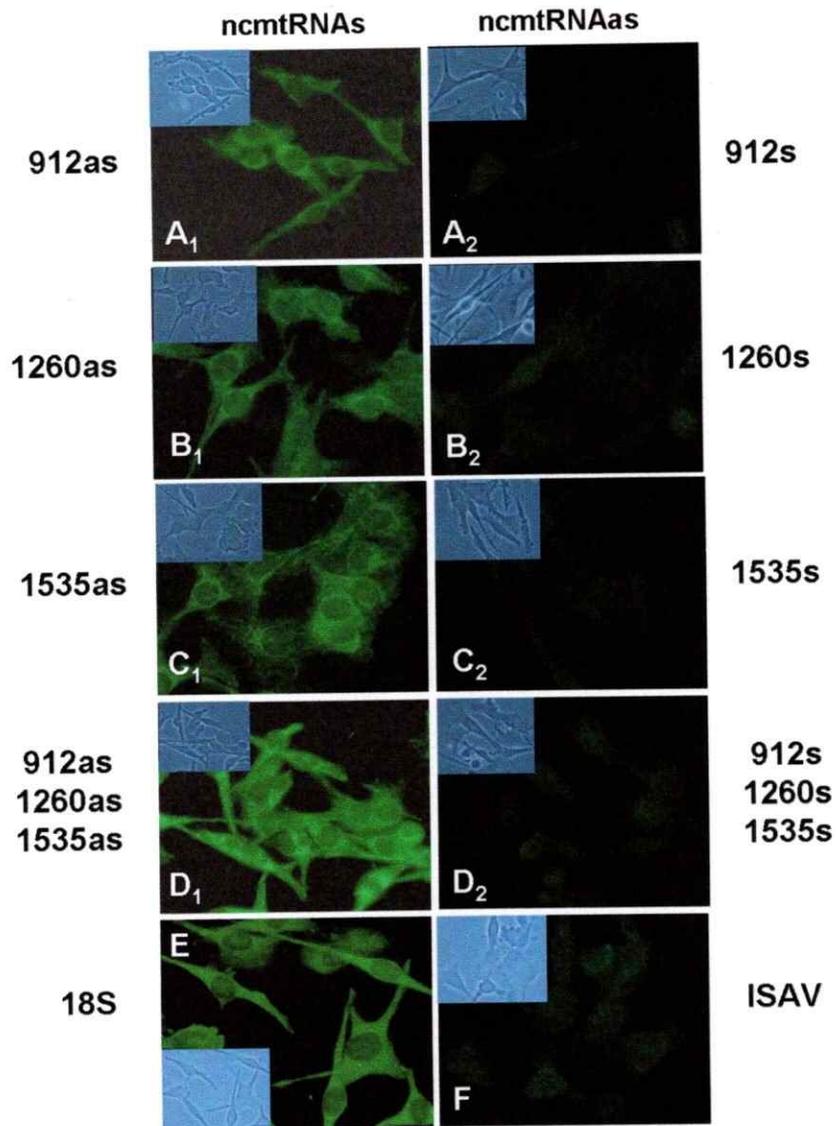


Figura 17.- FISH en células 42/95 utilizando múltiples sondas:

Células 42/95 fueron hibridadas con las sondas 912as, 1260as y 1535as) en forma separada o en mezcla (D₁). La misma hibridación en paralelo se realizó con las sondas sentido separadas (A₂, B₂ y C₂ respectivamente) o en mezcla (D₂). E y F son los controles positivo (18S rRNA) y negativo (ISAV4as) respectivamente. Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo en la muestra. Objetivo 40X.

5.3.-Desarrollo de un protocolo para FISH en suspensión:

Uno de los objetivos de esta tesis era desarrollar un protocolo de FISH para CTCs, es decir células en suspensión y por lo tanto para desarrollar este objetivo se utilizaron células HL60. Sin embargo, el protocolo de FISH descrito anteriormente (ver Materiales y Métodos) inducía una masiva lisis celular, por lo cual, se analizó cada paso del protocolo de FISH para optimizar la hibridación en células en suspensión.

5.3.1.- Cambio de agente permeabilizante por uno no detergente:

Se realizó la hibridación en células HL60 en suspensión, utilizando distintos agentes permeabilizantes (Figura 18). El uso de detergentes como 0.3% Triton X-100 (B), 0.1% Tween 20 (C), producían una gran cantidad de lisis y agregación celular. Sin embargo, al utilizar 8 mM β -mercapto Etanol en 1X PBS (Fig. 18, D) se aprecia una conservación de la morfología celular, mientras que aun existe una permeabilización suficiente para obtener una buena señal de hibridación. Aunque el uso de agentes detergentes en concentraciones menores (0.05% y 0.01%) no producía lisis celular, aún persistía un grado de agregación celular y una disminución considerable del porcentaje de células marcadas.

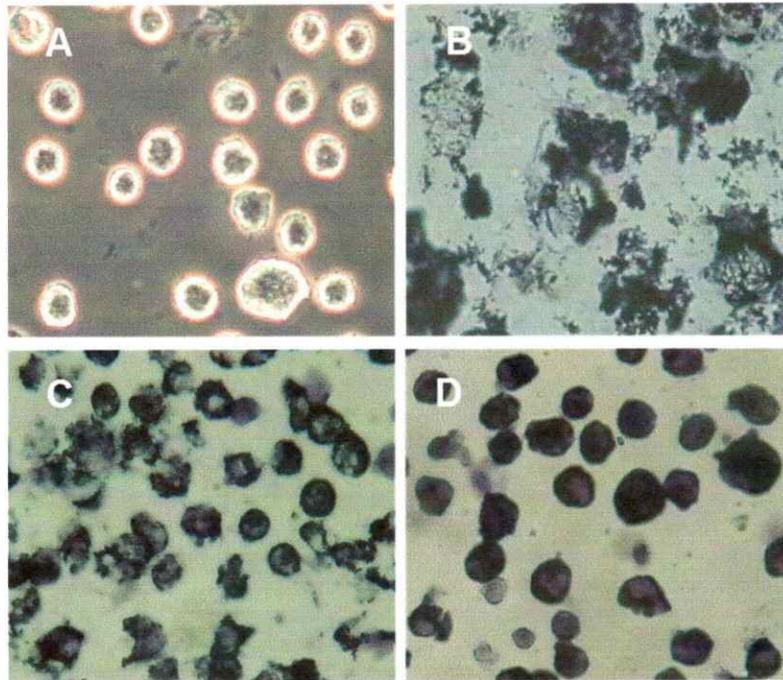


Figura 18.- Efecto de la permeabilización en la morfología de células HL60 al realizar hibridación *in situ*.

Células HL60 fijadas (A) fueron hibridadas permeabilizando con 0.3% Triton X-100 (B), 0.1% Tween 20 (C) y 8nM β -mercapto Etanol en 1X PBS (D) durante 10 min. El resultado de la hibridación corresponde al uso de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a fosfatasa alcalina. Al evaluar los resultados de la hibridación *in situ*, se aprecia un alto porcentaje de lisis celular al utilizar agentes detergentes para permeabilizar, mientras que el uso de 8mM β -mercapto etanol mantiene la morfología celular y la eficiencia de la marca. Objetivo 40X.

5.3.1.1.- Porcentaje de recuperación celular:

Un aspecto importante en el desarrollo de este protocolo era maximizar la recuperación de células posterior a la hibridación *in situ* en suspensión. Al utilizar detergentes como permeabilizantes, la recuperación celular una vez finalizado el protocolo ascendía a un promedio de 2.1×10^5 células, de un número inicial de 1.0×10^6 células, correspondiente a un 21 % de recuperación. Utilizando 8mM β -mercapto etanol como agente permeabilizante, obtuvimos un 64% promedio de recuperación celular, desde 1.0×10^6 células iniciales. Mientras que al eliminar el sulfato de dextrano de la solución de hibridación y eliminar el lavado con 1X y 0,2X SSC, logramos recuperar un promedio de 8.25×10^5 células de una muestra inicial de 1.0×10^6 células, equivalente a un 82.5% de recuperación.

5.3.2.-FISH en células en suspensión:

Una vez optimizado el protocolo para FISH en suspensión, se procedió evaluar la detección de los ncmtRNA. Tanto células HL60 como células 42/95 tripsinizadas fueron sometidas a la hibridación, utilizando las sondas 912as-DIG y 912s-DIG para detectar la presencia del ncmtRNA sentido y antisentido respectivamente. La sonda 18S as-DIG e ISAV4as-DIG fueron utilizadas como control positivo y negativo, respectivamente. La señal de hibridación en ambos tipos celulares fue clara para la sonda 912as, observando una leve marca con la sonda 912s, que corresponde al ruido de fondo como se describió anteriormente (Figura 19 A₂ y B₂)

Debido a que las células no se encuentran adheridas a una matriz sólida, éstas tienen forma esférica, lo cual hace imposible determinar de manera clara si se mantienen

la misma localización subcelular del ncmtRNA sentido como se observó en FISH realizado en células adheridas. En ambos tipos celulares, la señal de hibridación fue nítida para el 18S rRNA, y negativa para ISAV (Figura 19, + y - respectivamente).

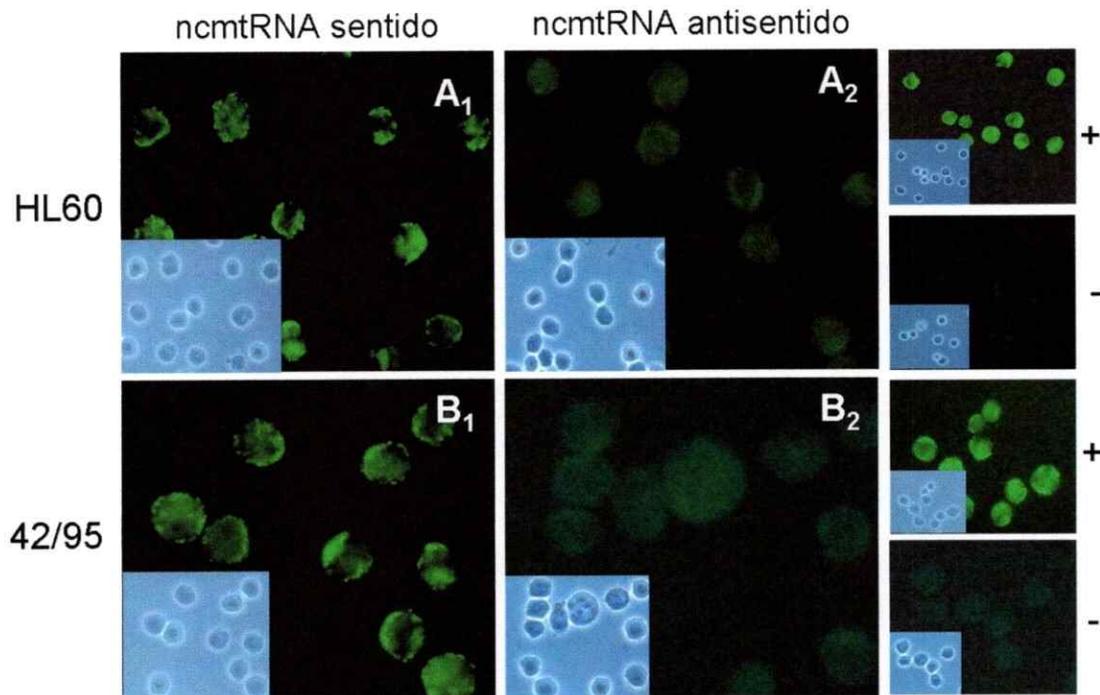


Figura 19.- FISH en suspensión de células HL60 y 42/95:

Se realizó FISH en suspensión en células HL60 (A) y 42/95 (B) utilizando la sonda 912as-DIG y 912s-DIG para detectar ncmtRNA sentido (1) y antisentido (2) respectivamente. Aunque la señal de hibridación no es tan intensa comparada con los experimentos realizados en portaobjetos, se puede apreciar una diferencia entre la detección de los transcritos sentido y antisentido del ncmtRNA. Se utilizó la sonda 18Sas-DIG (+) e ISAV4as-DIG (-) como control positivo y negativo respectivamente. Los insertos en cada fotografía representan una imagen en microscopía de fase del mismo campo en la muestra. Objetivo 40X.

5.4.- Evaluación de la expresión de ncmtRNA mediante citometría de flujo:

El análisis de muestras por citometría de flujo permite una mayor sensibilidad, capacidad de cuantificar, discriminar entre niveles de fluorescencia muy similares, tiene alta reproducibilidad de las lecturas y permite identificar eventos de rara ocurrencia. Estas características permiten utilizar este método como una poderosa herramienta a la hora de comparar la diferencia de expresión de ncmtRNA sentido y antisentido en muestras consistentes de células en suspensión líquida, como serían las CTC, otorgando lecturas más exactas de fluorescencia, versus un método primordialmente cualitativo, como lo es la microscopía de epifluorescencia.

5.4.1.- Determinación de la dilución óptima de anticuerpo anti-Digoxigenina conjugado a FITC:

Con el fin de determinar la concentración adecuada de anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a FITC para realizar el análisis de mediante citometría de flujo, se realizó FISH en suspensión en células HL60 utilizando solamente los controles positivo (18Sas-DIG) y negativo (ISAV4as), y variando la dilución del anticuerpo desde 1/50 hasta 1/200. Los resultados muestran que a pesar que en las tres diluciones de anticuerpo se obtiene una buena relación señal/ruido, a una dilución de 1/200 se obtiene un mejor resultado, que las demás diluciones utilizadas (Figura 20, A₂, B₂, C₂). Como era de esperar, no hay desplazamiento de señal cuando no se utilizó sonda (Fig. 20, A₁, B₁, C₁) o cuando se usó la sonda control negativo para ISAV (Figura 20, A₃, B₃, C₃)

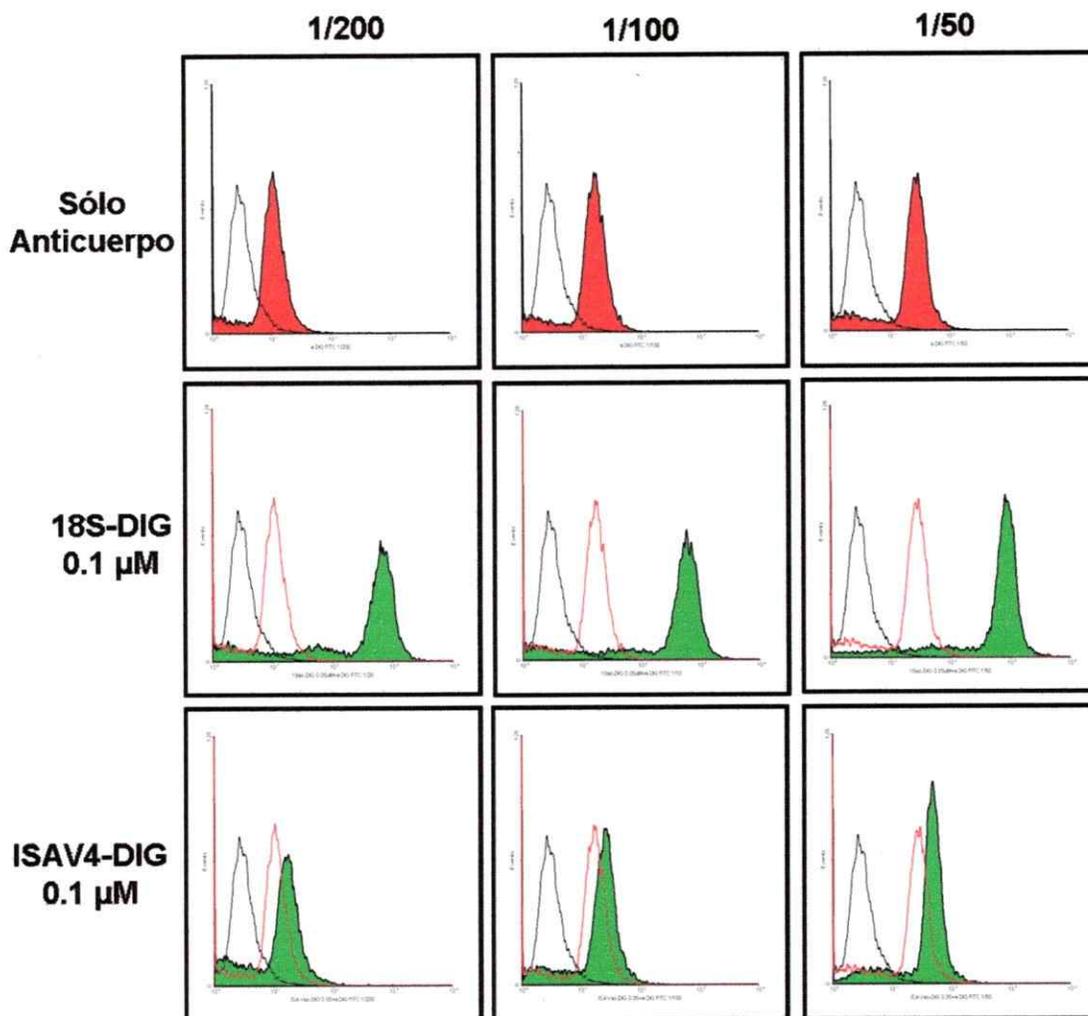


Figura 20.- Determinación de la dilución óptima de anticuerpo anti digoxigenina-FITC para citometría de flujo:

Para determinar la dilución correcta de anticuerpo anti digoxigenina, se realizó hibridación *in situ* en suspensión en células HL60, utilizando sólo anticuerpo (primera serie) positivo 18Sas-DIG (segunda serie) y control negativo ISAV4as-DIG (tercera serie) para tres diluciones de anticuerpo, 1/200 (primera columna), 1/100 (segunda columna) y 1/50 (tercera columna). El eje de las abscisas representa unidades arbitrarias de fluorescencia, el eje de las ordenadas representa el número de eventos. Para cada concentración de anticuerpo, la línea negra representa la fluorescencia de células HL60 tratadas sin sonda, sin anticuerpo. El área y línea roja representan la fluorescencia obtenida al utilizar sólo el anticuerpo. El área verde es la fluorescencia obtenida al utilizar sonda 0.1 µM y revelar con anticuerpo a las diluciones indicadas.

5.4.2.-Comparación de dos metodologías de FISH citometría de flujo:

El objetivo de estos estudios fue analizar si la detección de los ncmtRNAs sentido y antisentido mediante FISH y análisis por citometría de flujo, podía discriminar entre células tumorales y normales proliferantes con el objeto de extrapolar este conocimiento a células tumorales circulantes presentes en sangre o médula ósea.

La figura 21 muestra un resultado representativo de cuatro hibridaciones de células 42/95 a las cuales se les realizó FISH en suspensión y análisis posterior mediante citometría de flujo. La detección de los ncmtRNA mediante uso de sonda marcada con DIG y anticuerpo anti DIG-FITC, no entregó resultados concluyentes ya que la diferencia entre las señales de hibridación para cada transcrito no fueron suficientes para discriminar uno del otro o del control con sólo anticuerpo (Figura 21, panel I). Sin embargo el sistema discrimina perfectamente el FISH para el 18S rRNA (Figura 21, panel I, D).

Por otro lado, el uso de sondas marcadas con FITC en el extremo 3' permitió discriminar claramente entre la expresión del ncmtRNA sentido del antisentido. Mientras la señal del ncmtRNA sentido 5 veces mayor que el control sin sonda, la señal del transcrito antisentido fue idéntica al del control (Figura 21, panel II, A', B'). Además, este enfoque experimental también discriminó claramente la sonda control positivo de la sonda control negativo (Figura 21, comparar B' con D'). Estos resultados indican que el uso de sondas de DNA directamente marcada con FITC, es el método más apropiado, entre los utilizados, para analizar la expresión diferencial de los ncmtRNAs sentido y antisentido mediante citometría de flujo.

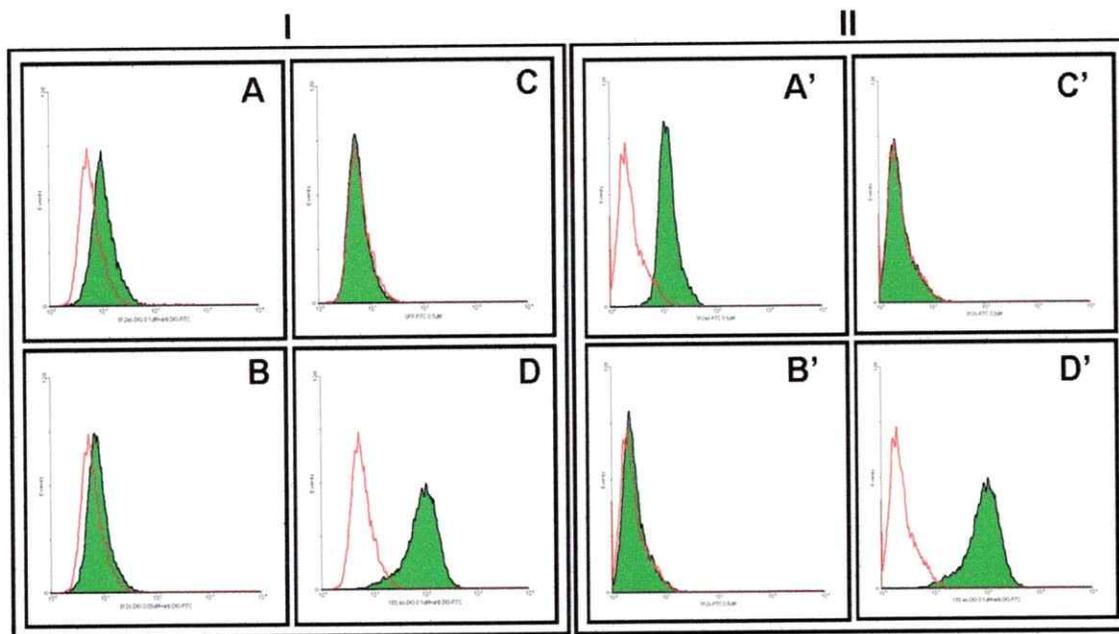


Figura 21.- Determinación de la expresión de los ncmtRNAs mediante citometría de flujo en células tumorales:

En el panel I se grafican los resultados obtenidos al evaluar mediante citometría de flujo la detección de los ncmtRNA sentido (A) y antisentido (B) utilizando sonda de DNA marcada con digoxigenina y anticuerpo anti-digoxigenina conjugado a FITC, en células 42/95. En rojo esta representada la señal obtenida al incubar las células solo con el anticuerpo para el panel I y sin sonda para el panel II. El eje de las abscisas representa unidades arbitrarias de fluorescencia, el eje de las ordenadas representa el número de eventos. C y D representan los controles de sonda no relacionada y 18Sas como control positivo, respectivamente. En el panel II se grafica los resultados obtenidos al realizar el mismo experimento, pero utilizando sonda de DNA directamente marcada con FITC en el extremo 3'. Por este método, es posible detectar la expresión del ncmtRNA sentido (A'), mientras que no hay señal de hibridación al utilizar una sonda de DNA específica para el ncmtRNA antisentido (B'). C' y D' representan los controles de sonda no relacionada y control positivo respectivamente. Ambos paneles son representativos de 5 experimentos consistentes en 10.000 eventos independientes cada uno.

5.4.3.-Expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en células normales en proliferación:

El siguiente desafío fue determinar si el protocolo de FISH con sondas directamente marcadas con FITC en el extremo 3' eran capaces de detectar la expresión de los ncmtRNA sentido y antisentido en células normales en proliferación. Para ello se sometieron células HUVEC a FISH en suspensión post-tripsinización y análisis por citometría de flujo. Como se puede observar en la figura 22, el resultado representativo de tres determinaciones muestra claramente que citometría permite detectar la expresión tanto del transcrito sentido como antisentido en las células HUVEC. Estos resultados fueron confirmados por la clara detección del control positivo (Figura 22, D) y la ausencia de señal del control negativo (Figura 22, C).

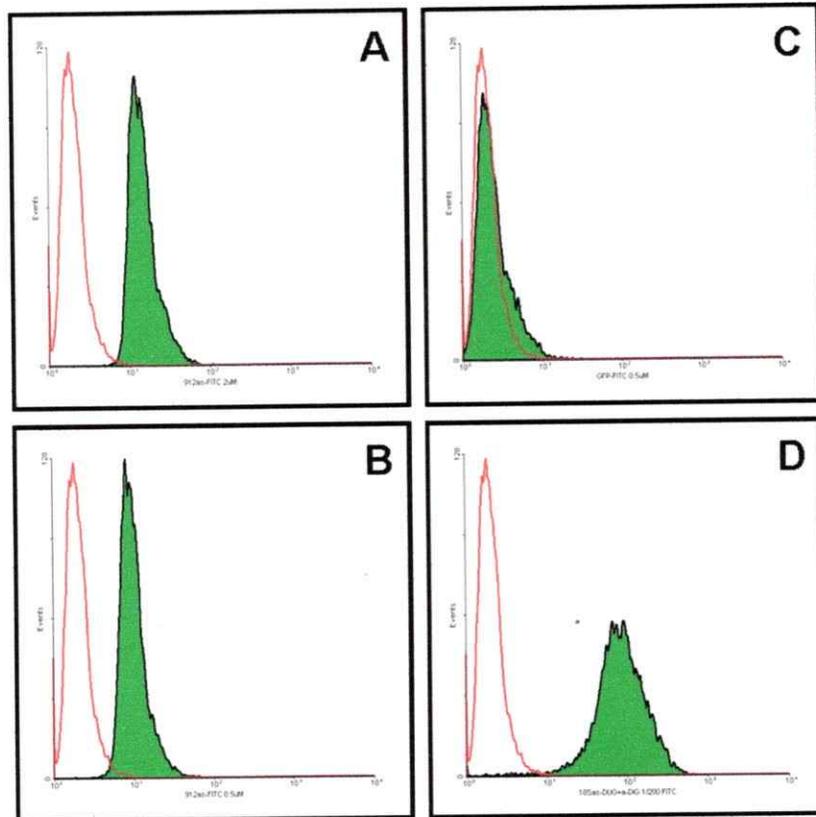


Figura 22.- Determinación de la expresión de los ncmtRNAs en células normales proliferantes mediante FISH en suspensión y citometría de flujo:

Mediante citometría de flujo se determinó la expresión de los ncmtRNA sentido (A) y antisentido (B) utilizando sonda de DNA marcada con FITC, en células HUVEC post tripsinización. En rojo esta representada la señal obtenida al evaluar células tratadas sin utilizar sonda. El eje de las abscisas representa unidades arbitrarias de fluorescencia, el eje de las ordenadas representa el número de eventos. C y D representan los controles de sonda no relacionada y 18Sas como control positivo, respectivamente.

6.-DISCUSIÓN:

Los RNA mitocondriales no-codificantes.

Existen muchas interrogantes aún por elucidar acerca del proceso de modificación post transcripcional que da origen al RNA mitocondrial no codificante sentido y antisentido, y su rol específico dentro del proceso de proliferación celular.

Como su nombre lo indica, existen fuertes evidencias que estos transcritos son de origen mitocondrial. Las secuencias de ambos transcritos muestran un 99.9% de identidad con genoma mitocondrial humano. Además, podemos encontrar estos transcritos en mitocondrias aisladas tratadas previamente con RNasa A, para evitar contaminación con transcritos citoplasmáticos. Más aún, la síntesis de estos ncmtRNAs es completamente anulada en células DU145, después de tratarlas con rodamina 6G o células HeLa tratadas con bromuro de etidio, conocidos inhibidores específicos de la transcripción mitocondrial (Hayakawa y col, 1998; Williams y col, 1999; Felty y col, 2005). Estos resultados, además de constituir fuertes demostraciones de su origen mitocondrial, descartan, que estos transcritos sean productos de transcripción de pseudogenes mitocondriales presentes en el DNA nuclear (Woischnik, M. y col, 2002).

La transcripción del genoma mitocondrial es un proceso simétrico para ambas hebras (H y L), dependiendo de promotores distintos y de funcionamiento independiente, dando origen a transcritos policistrónicos de ambas hebras, que eventualmente son procesados, obteniendo los distintos transcritos funcionales descritos (Taanman, J.W. 1999). Sin embargo, la síntesis de los ncmtRNAs (sentido y antisentido) presenta un desafío adicional. La secuencia de estos transcritos no se encuentra en forma

lineal en el mtDNA, por lo que su síntesis requiere de procesos post-transcripcionales aún desconocidos. Sin descartar otras posibilidades, hipotéticamente, se puede postular que el proceso de unión del RI (proveniente del transcrito de la hebra L del mtDNA) al extremo 5' del 16S mtRNA podría involucrar una reacción catalizada por una RNA ligasa. Esta última enzima juega un rol importante en el proceso de edición de RNA mitocondriales en eucariontes inferiores (Blanc y col. 1999).

Expresión de los ncmtRNA:

Aunque la función de los ncmtRNA no está aún definida a nivel molecular, existen evidencias entregadas tanto por este trabajo, como por otros realizados en nuestro laboratorio, que permiten inferir una estrecha relación entre la expresión del ncmtRNA sentido y proliferación celular. Independiente de si se trata de una célula tumoral o normal proliferante, siempre hay sobre expresión del transcrito sentido. La misma correlación existe en células de ratón (Villegas, 2000; Restovic, 2006). Al contrario, células humanas o de ratón en reposo o senescentes no expresan el ncmtRNA sentido. Un estudio que confirma el papel que juega este transcrito en proliferación, fue la determinación de la expresión del ncmtRNA sentido en linfocitos circulantes estimulados con fitohemaglutinina (PHA). Los linfocitos recién aislados de sangre periférica no expresan el transcrito sentido. Sin embargo, al estimularlos con PHA, fuera de entrar en fase S del ciclo celular y sintetizar activamente DNA, sobre expresan el transcrito sentido. La expresión de esta molécula coincide además con la expresión de antígenos de células proliferantes como Ki-67 y PCNA. En conjunto, estos resultados

sugieren que esta molécula podría tener una participación activa durante la compleja regulación del ciclo celular.

El ncmtRNA antisentido, por otro lado, se expresa en células proliferantes normales, mientras que su expresión es reprimida en células tumorales. Estos resultados nos permiten especular que el ncmtRNA podría modular la función del ncmtRNA sentido, ya que existe una alta probabilidad de interacción entre estos transcritos debido a la complementariedad de sus secuencias. Existen evidencias experimentales de interacción y modulación de transcritos no-codificantes funcionales por sus homólogos antisentido. El ejemplo más representativo es el del transcrito Xist y su antisentido Tsix. Xist es un RNA no-codificante encargado de la inducción de la heterocromatización de uno de los cromosomas X durante la compensación génica en mamíferos hembra. Por otro lado, la acción de Xist es reprimida por el RNA no-codificante proveniente del gen antisentido apropiadamente llamado Tsix (Xist al revés), proveniente de uno de los cromosomas X que eventualmente permanecerá activo. Este transcrito antisentido interacciona por complementariedad de bases con Xist, inactivando su función biológica (Lee J.T. y col, 1999, 2003; Shibata y Lee J.T, 2003). Este mecanismo de regulación podría ser análogo al que podríamos estar observando en una célula normal en proliferación, en la cual el ncmtRNA antisentido cumpliría un rol modulador de la función del transcrito sentido en el ciclo celular. Como la característica más notoria de una célula tumoral es la desregulación del ciclo celular, la represión de la síntesis del ncmtRNA antisentido sería un mecanismo adicional de desregulación que ocurriría durante la transformación neoplásica.

Desarrollo de FISH fluorescente en suspensión y análisis mediante citometría de flujo:

Uno de los objetivos fundamentales de este trabajo fue desarrollar una metodología de FISH que permitiera la detección de los transcritos en células tumorales circulantes, para lo cual fue necesario desarrollar un protocolo de hibridación *in situ* fluorescente en suspensión líquida. Además esta metodología no presentaría problemas para el posterior análisis por citometría de flujo. La resistencia mecánica de las células en suspensión es considerablemente menor que la de las células que se encuentran adheridas a una matriz sólida formando una monocapa. Por lo tanto, fue necesario realizar ajustes al protocolo de tal manera de disminuir al máximo la pérdida de células debido al tratamiento. Estos cambios involucraron nuevos métodos de permeabilización y alteración del protocolo de hibridación. Con estas modificaciones pudimos aumentar el porcentaje de recuperación desde menos de un 20% con el protocolo inicial, hasta un 80% utilizando el protocolo de hibridación desarrollado.

Otro de los objetivos fue mejorar la señal de FISH utilizando variaciones en la manera de detectar la sonda hibridada mediante tres métodos. El primer procedimiento fue utilizar sondas de DNA marcadas directamente con FITC en el extremo 3'. Existen reportes clásicos que afirman que este método tiene una mayor especificidad y sensibilidad que el uso de otros métodos de detección (Bauman J.G, 1981, 1985). Sin embargo, los resultados mostraron que la señal de hibridación era menor que la obtenida con sonda de DNA unida a digoxigenina y revelada con anticuerpo anti-digoxigenina marcado con FITC. La razón de este resultado puede deberse a que sólo hay una molécula de fluoróforo por sonda, en comparación a múltiples residuos de FITC unidos

al anticuerpo. Sin embargo, paradójicamente, se demostró posteriormente por citometría de flujo que el uso de sondas marcadas con FITC, era mucho más adecuado que con el uso de anticuerpo.

El segundo método utilizado fue el diseño de sondas de DNA de mayor tamaño. Según la literatura, sondas para hibridación *in situ* varían su tamaño desde varios cientos de nucleótidos, (Urisman A. y col. 2006) hasta 20 nt como en el presente trabajo. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos con sondas diseñadas de 40 nt, no hay una mejoría en la calidad de la señal de hibridación. Más aún, para la sonda 1535as sorprendentemente se pierde la señal de hibridación al utilizar la sonda de 40 nt, mientras que existe una clara marca cuando se usó la sonda de 20 nucleótidos complementaria a la misma región del transcrito (Figura 14). Esta pérdida de señal podría deberse a que mientras más larga es una sonda, hay más probabilidades de que ésta forme estructuras secundarias muy estables. Asimismo, también es más probable que el blanco también esté formando estructuras secundarias complejas y por lo tanto, una sonda de menor tamaño tendría mejor acceso a la secuencia blanco. Como se mostró en la introducción, el ncmtRNA sentido tiene un asa de 40 nt, sin embargo, por la torsión inducida por la región doble hebra del transcrito, esta asa adquiere una estructura de difícil acceso.

Finalmente, se logró amplificar la señal de hibridación mediante el uso simultáneo de tres sondas específicas para el ncmtRNA sentido y antisentido. El uso simultáneo de las sondas 912, 1260 y 1535 para FISH resultó en una señal más intensa para células tumorales (células 42/95) que sólo una sonda. Más interesante, es que la presencia de los mismas tres sondas pero con secuencias complementarias a los ncmtRNAs antisentido

no mostraron marca. Si bien es cierto, estos resultados fueron observados mediante microscopía de fluorescencia, su extrapolación a citometría de flujo es más que razonable.

La citometría de flujo es una mejor aproximación experimental para el análisis de FISH en suspensión por varias razones: 1) nos brinda una visión más cuantitativa y sensible que el análisis por medio de microscopía de epifluorescencia. 2) Por medio de la citometría de flujo se puede analizar todas las células dentro de una muestra, lo que permite una detección más eficiente en eventos de baja ocurrencia. 3) En relación a diagnóstico, citometría de flujo es más fácil de automatizar en comparación con microscopía de fluorescencia.

El resultado más promisorio de este trabajo es que es posible discriminar entre células normales proliferantes y tumorales. Pese a que estos experimentos solo se realizaron en poblaciones uniformes de cultivos de líneas celulares, el hecho de poder diferenciar poblaciones de células tumorales de normales mediante microscopía de fluorescencia y citometría de flujo es promisorio para el futuro desarrollo de métodos de detección de células tumorales circulantes. La sangre posee muchos tipos celulares, entre los cuales se encuentran linfocitos, monocitos, eosinófilos, basófilos, etc. Sin embargo estas células no deberían influir en el resultado final de la citometría. Como se mostró en este trabajo, la fracción de células blancas no mostraron señal fluorescente post-FISH. Aún así, trabajos futuros deberían determinar un “*cut-off*” en el análisis por citometría de flujo.

Trabajos futuros:

Mediante el uso simultáneo de varias sondas fue posible amplificar de manera específica la intensidad de fluorescencia para FISH en células adherentes y mediante microscopía de fluorescencia (Figura 17). Esta misma aproximación debe ser implementada para FISH y citometría en células en suspensión de manera de aumentar el desplazamiento del pico de señal de las células positivas con respecto a las negativas y los controles. Esta implementación permitirá tener un método más claro para discriminar entre células normales y tumorales. Otro punto importante en el cual se debe trabajar es la determinación y cuantificación del mínimo de células que se puede detectar mediante el método desarrollado en esta tesis. Existen reportes donde se describe la detección de alrededor de 12 células epiteliales por ml de sangre en pacientes con metástasis, mediante análisis por citometría de flujo, (Racila y col. 1998, Allard y col, 2004), la cual es una meta posible de alcanzar dada la especificidad de la marca y la sensibilidad del método de citometría de flujo.

La detección de células tumorales circulantes mediante FISH y citometría de flujo puede también ser utilizada a futuro para identificar células leucémicas y el análisis de muestras de médula ósea, en busca de células tumorales que aparecen en enfermedad residual post-tratamiento.

7.-Conclusiones:

- Mediante FISH se puede demostrar la expresión diferencial de ncmtRNA sentido como el transcrito antisentido en líneas celulares humanas.
- El desarrollo de un protocolo de FISH en suspensión permite determinar eficientemente la expresión de los ncmtRNAs en muestras de células suspendidas en medio acuoso.
- Mediante FISH en suspensión y citometría de flujo es posible diferenciar poblaciones de líneas celulares tumorales de células normales proliferantes.

BIBLIOGRAFIA:

- Allard, W. Jeffrey, Jeri Matera, M. Craig Miller, Madeleine Repollet, Mark C. Connelly, Chandra Rao, Arjan G. J. Tibbe, Jonathan W. Uhr, and Leon W. M. M. Terstappen. (2004) **Tumor cells circulate in the peripheral blood of all major carcinomas but not in healthy subjects or patients with nonmalignant diseases.** *Clinical Cancer Res.* 10, 6897-6904.
- Attardi, G. (1986). **The elucidation of the human mitochondrial genome: a historical perspective.** *Bioassays*, 5, 34-39.
- Bauman JG, Bayer JA, van Dekken H. (1991) **Fluorescent *in-situ* hybridization to detect cellular RNA by flow cytometry and confocal microscopy.** *J Microsc.* 157:73-81.
- Bauman JG, Bentvelzen P. (1988) **Flow cytometric detection of ribosomal RNA in suspended cells by fluorescent *in situ* hybridization.** *Cytometry*; 9, 6; 517-524.
- Bauman J.G. (1985) **Fluorescence microscopical hybridocytochemistry.** *Acta Histochem Suppl*; 31, 9-18.
- Blanc, Valerie, Juan D. Alfonzo, Ruslan Aphasizhev, and Larry Simpson. (1999). **The mitochondrial RNA Ligase from *Leishmania tarentolae* can join molecules bridged by a complementary RNA.** *JBC*, 274; 34, 24289-24296.
- Braisant, O., Wahli, W. (1998) **A simplified *in situ* hybridization protocol using non-radioactively labeled probes to detect abundant and rare mRNAs on tissue sections.** *Biochemica* 1; 10-16.
- Burzio LO, Villegas J, Burzio V. 2005. **Markers for pre-cancer and cancer cells and the method to interfere with cell proliferation therein.** Patent Cooperation Treat (PCT/US2004/015929).
- Cerchia, L., De Franciscis, V. (2006) **Non-coding RNAs in cancer medicine.** *JBB*; 73104 1-8.
- Clayton, D. 1992. **Transcription and replication of animal mitochondrial DNAs.** *Int. Cytol.*; 141: 217-232
- Covalán, A., Koriyama, C., Akiba, S., Eizuru, Y., Backhouse, C., Palma, M., Argandoña, J. and Tokunaga, M. (2001) **Epstein-Barr virus in gastric carcinoma is associated with location in the cardia and with diffuse histology: a study in one area of Chile.** *Int. Cancer.* 94, 527-530.

- Eul, J., Graessmann, M. and Graessmann, A. (1995) **Experimental evidence for RNA translicing in mammalian cells.** *EMBO J.*, 14, 3226-3235.
- Felty Q, Singh KP, Roy D. 2005. **Estrogen-induced G1/S transition of G0-arrested estrogen-dependent breast cancer cells is regulated by mitochondrial oxidant signaling.** *Oncogene*; 24: 4883-4893.
- Hayakawa, T., Noda, M., Yasuda, K., Yorifuji, H., Taniguchi, S., Miwa, I., Sakura, H., Terauchi, Y., Hayashi, J., Sharp, GW., Kanazawa, Y., Akanuma, Y., Yazaki, Y., Kadowaki, T. 1998. **Ethidium bromide-induced inhibition of mitochondrial gene transcription suppresses glucose-stimulated insulin release in the mouse pancreatic betacell line betaHC9.** *J. Biol. Chem.*; 273: 20300-20307.
- Kampa, Dione, Jill Cheng, Philipp Kapranov, Mark Yamanaka, Shane Brubaker, Simon Cawley, Jorg Drenkow, Antonio Piccolboni, Stefan Bekiranov, Gregg Helt, Hari Tammana and Thomas R. Gingeras. 2004. **Novel RNAs Identified From an In-Depth Analysis of the Transcriptome of Human Chromosomes 21 and 22** *Genome Res*: 14: 331-342.
- Lee JT, Davidow LS, Warshawsky D. (1999). **Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre.** *Nat Genet.*; 21(4):400-4.
- Lee JT. (2003) **Functional intergenic transcription: a case study of the X-inactivation centre.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;358(1436):1417-23
- Llorens, P (1999) **Gastric cancer in Chile.** *Gastrointestinal Endoscopy*, 49, N°4.
- Lowe AW, Olsen M, Hao Y, Lee SP, Taek Lee K, Chen X, van de Rijn M, Brown. (2007) **Gene Expression Patterns in Pancreatic Tumors, Cells and Tissues.** *PO.PLoS ONE*; 2(3) 323.
- Lu, Jun, Gad Getz, Eric A. Miska, Ezequiel Alvarez-Saavedra, Justin Lamb, David Peck, Alejandro Sweet-Cordero, Benjamin L. Ebert, Raymond H. Mak, Adolfo A. Ferrando, James R. Downing, Tyler Jacks, H. Robert Horvitz & Todd R. Golub. (2005) **MicroRNA expression profiles classify human Cancers.** *Nature*, Vol 435 (9) 834-838.
- Lu YJ, Williamson D, Clark J, Wang R, Tiffin N, Skelton L, Gordon T, Williams R, Allan B, Jackman A, Cooper C, Pritchard-Jones K, Shipley (2001) **Comparative expressed sequence hybridization to chromosomes for tumor classification and identification of genomic regions of differential gene expression.** *J.Proc Natl Acad Sci USA*; 98(16): 9197-9202

- Mullink, H y col. (1989) **Combined Immuno- and Non-radioactive Hybridocytochemistry on Cells and Tissue Sections: Influence of Fixation, Enzyme Pre-treatment, and Choice of Chromogen on detection of Antigen and DNA sequences.** J. Histochem. & Cytochem; 37 (5) 603-609.
- Paillason, S., Van der Corput, M., Dirks R.W., Tanke H.J., Robert-Nicoud, M. and Ronot X. (1997) **In Situ Hybridization in Living Cells: Detection of RNA Molecules.** Experimental Cell Research 231, 226-233.
- Racila, Emilian, David Euhus, Arthur J. Weiss, Chandra Rao, John McConnell, Leon W. M. M. Terstappen, and Jonathan W. Uhr. (1998) **Detection and characterization of carcinoma cells in the blood.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 95, 4589-4594.
- Restovic, F. (2006) **Expresión de RNAs mitocondriales no codificantes durante proliferación y diferenciación de mioblastos de ratón.** Tesis para optar al título de Ingeniero en Biotecnología Molecular. Fac. de Ciencias. U. de Chile.
- Santander M., Villegas J., Villota C., Burzio V. & Burzio L. **Estimulación de linfocitos humanos con PHA induce la sobre expresión del RNA quimérico.** XLV reunión anual de la sociedad de Biología de Chile. 12 al 16 de Noviembre Puyehue, Chile 2002
- Shibata, S., Lee J.T. (2003) **Characterization and quantification of differential Tsix transcripts: implications for Tsix function.** Human Mol. Gen; 12(2) 125-136
- Steinhäuser, U. Heike Starke, Angela Nietzel, Joerg Lindenau, Peter Ullmann, Uwe Claussen and Thomas Liehr. (2002) **Suspension (S)-FISH, a New Technique for Interphase Nuclei.** J. Histochem. & Cytochem. 50(12) 1697-8.
- Taanman JW. (1999). **The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication.** Biochimica et Biophysica Acta., 1410, 103-123
- Travali S, Ku D, Rizzo MG, Ottavio L, Baserga R, Calabretta B. 1989. **Structure of the human gene for the proliferating cell nuclear antigen.** J Biol Chem.; 264: 7466-7472.
- Urisman, A., Molinaro R. J., Fischer, N., Plumier, S.J., Casey, G., Klein, E.A., Malathi, K., Magi-Galluzzi, C., Tubbs R.R., Ganem, D. Silverman R.H. and DeRisi J.L. (2006) **Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q RNaseL variant.** PLoS path. 2; (3) 211-225.
- Villegas, J., Burzio, V., Villota, C., Martinez, R., Pinto, R., Vera, MI and Burzio, LO (2006) **The human mitochondrial chimeric RNA: a non-coding RNA with a long double-stranded structure.** Manuscrito enviado a publicación.

- Villegas, J., Burzio, V., Villota, C., Martínez, R., Vidaurre, S., and Burzio, L.O. (2005) **A novel family of mitochondrial RNAs as target to induce cell death of cancer cell.** First Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. September 15-18, New York, USA.
- Villegas, J., Zárraga, A.M., Müller I., Montecinos, L., Werner, E., Brito, M., Meneses, A.M. and Burzio, L.O. (2000) **A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm.** DNA & Cell Biol. 19, 579-588.
- Villegas, J., Müller, I., Arredondo, J., Pinto, R. and Burzio, L.O. (2002) **A putative RNA editing from U to C in a Mouse mitochondrial transcript.** Nucleic Acid Res., 30, 1895-1901.
- Villegas, J., Araya, P., Bustos-Obregón, E., and Burzio, L.O. (2002) **Localization of the 16S mitochondrial rRNA in the nucleus of mammalian spermatogenic cells.** Mol. Human Rep., 8, 977-983.
- Villota, Claudio (2006) **Control de la expresión y localización de los RNA mitocondriales no codificantes por el virus del papiloma humano.** Tesis para optar al grado de Doctor en ciencias. P. Universidad Católica de Chile.
- Williams AJ, Murrell M, Brammah S, Minchenko J, Christodoulou J. (1999). **A novel system for assigning the mode of inheritance in mitochondrial disorders using cybrids and rhodamine 6G.** Human Molecular Genetics.; 8: 1691-1697.
- Woischnik, M. and Moraes, C.T. (2002) **Pattern of organization of human mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome.** Genome Res. 12, 885-893