

**Centro de Investigación Científica y de Educación
Superior de Ensenada, Baja California**



**Maestría en Ciencias de la Vida con orientación en
Biomedicina y Bionanotecnología**

**Caracterización funcional de miR-1270 y miR-548x-3p
en la osteoclastogénesis**

Tesis

para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de
Maestro en Ciencias

Presenta:

Manuel Carballo Fernández

Ensenada, Baja California - México

2019

Tesis defendida por

Manuel Carballo Fernández

y aprobada por el siguiente Comité

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirector de tesis

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Codirector de tesis

Dr. Alexei Fedorovich Licea Navarro

Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez

Dr. Rafael Velázquez Cruz



Dra. Clara Elizabeth Galindo Sánchez
Coordinador del Posgrado en Ciencias de la Vida

Dra. Rufina Hernández Martínez
Directora de Estudios de Posgrado

Manuel Carballo Fernández © 2019

Queda prohibida la reproducción parcial o total de esta obra sin el permiso formal y explícito del autor y director de la tesis.

Resumen de la tesis que presenta **Manuel Carballo Fernández** como requisito parcial para la obtención del grado de Maestro en Ciencias de la Vida con orientación en Biomedicina y Bionanotecnología.

Caracterización funcional de miR-1270 y miR-548x-3p en la osteoclastogénesis

Resumen aprobado por:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirector de tesis

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Codirector de tesis

La estructura y la fuerza ósea se mantienen en equilibrio por un proceso denominado remodelación ósea, donde la cantidad de hueso que se reabsorbe por los osteoclastos, es restituida por hueso nuevo por los osteoblastos. Ante un proceso patológico, como la osteoporosis, este delicado equilibrio se ve comprometido. La osteoporosis es una enfermedad sistémica caracterizada por una disminución de la masa ósea, deterioro de la microarquitectura ósea, con el consecuente incremento en la fragilidad ósea y la susceptibilidad para las fracturas. A nivel mundial más de 200 millones de personas padecen osteoporosis. Debido al incremento de la población y al aumento en su expectativa de vida, los altos costos de tratamiento y la disminución en la calidad de vida de las personas que padecen osteoporosis, hacen que esta enfermedad se convierta en un problema de salud pública. Los efectos adversos ocasionados por las terapias actuales conducen a buscar diferentes estrategias terapéuticas, las cuales tengan un menor grado de agresividad. Los microRNA (miRNA) son ARN de 20 a 25 nucleótidos que logran ejercer una función regulatoria al unirse a las bases complementarias de la región 3' no traducida del ARN mensajero. Esta función le permite inhibir la transcripción o degradar al ARNm, de esta manera regula la expresión génica. Múltiples estudios experimentales han demostrado la importancia que tienen los microRNA en la regulación fisiopatológica de las enfermedades y han establecido ampliamente su potencial terapéutico. Los microRNA están involucrados en las vías de señalización de los procesos osteogénicos, por lo que hemos decidido realizar la caracterización funcional de miR-1270 y miR-548x-3p, los cuales fueron identificados con un alto nivel de expresión en monocitos circulantes en un grupo de pacientes con osteoporosis. A través de modelos experimentales *in vitro* se evaluará la expresión de los microRNA de interés para evaluar si presentan algún efecto regulatorio en genes asociados a la osteoclastogénesis.

Palabras clave: microRNA, osteoporosis, remodelación ósea, osteoclastogénesis.

Abstract of the thesis presented by **Manuel Carballo Fernández** as a partial requirement to obtain the Master of Science degree in Life Sciences with orientation in Biomedicine and Bionanotechnology.

Functional characterization of miR-1270 and miR-548x-3p in osteoclastogenesis

Abstract approved by:

Dra. Patricia Juárez Camacho
Codirector de tesis

Dr. Pierrick Gerard Jean Fournier
Codirector de tesis

Bone structure and strength are maintained in equilibrium by a process called bone remodeling, where the amount of bone that is reabsorbed by the osteoclasts is restored by the osteoblasts. In the face of a pathological process, such as osteoporosis, this delicate balance is compromised. Osteoporosis is a systemic disease characterized by a decrease in bone mass due to the deterioration of bone microarchitecture, with the consequent increase in bone fragility and susceptibility to fractures. Worldwide more than 200 million people suffer from osteoporosis. Due to increase of population and the increase in their life expectancy, the high treatment costs and the decrease in the quality of life of people suffering from osteoporosis, make this disease become a public health problem. The adverse effects caused by current therapies lead to seek different therapeutic strategies, which have a lower degree of aggressiveness. MicroRNA (miRNA) are RNA of 20 to 25 nucleotides that achieve a regulatory function by binding to the complementary bases of the 3' untranslated region of messenger RNA (mRNA). This function allows the inhibition of transcription or the degradation of mRNA, in this way it regulates the gene expression. Multiple experimental studies have shown the importance of miRNA in the pathophysiological regulation of diseases and have widely established their therapeutic potential. Since microRNA are involved in the signaling pathways of the osteogenic process we decided to perform the functional characterization of miR-1270 and miR-548x-3p, which were found to be highly expressed in blood circulating monocytes of a group of osteoporotic patients. Through experimental in vitro models the expression of these miRNA will be evaluated to determine if they present a regulatory effect in genes associated with osteoclastogenesis.

Keywords: miRNA, osteoporosis, bone remodeling, osteoclastogenesis

Dedicatoria

*A mi esposa Oriana
y a mis hijos Guillermo y Manuel Emilio,
ustedes son el motor de mi vida.
Gracias por creer en mis sueños
y apoyarme en mis locuras.
Los amo.*

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico para realizar mis estudios de posgrado con la beca número 613503.

Al Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada por el apoyo y facilidades otorgadas durante este proceso formativo.

A la Dra. Patricia Juárez y al Dr. Pierrick Fournier por aceptarme en su grupo de trabajo, por compartir sus conocimientos y experiencias, por el apoyo brindado, les estoy profundamente agradecido.

A los miembros del comité de tesis, Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro, Dr. Carlos Alberto Brizuela Rodríguez y Dr. Rafael Velázquez Cruz, les agradezco su tiempo y consejo.

Al Dr. Luis Donis por su oportuna aportación para el desarrollo de mi proyecto.

A Danna Arellano, Florian Dresher y Fernando Guerra muchísimas gracias por su amistad y su ayuda invaluable.

A mis compañeros Mitzuko Fajardo, Brenda Iduarte, Arturo Hernández, Rodrigo Osorio, Carolina Delgado, Cristina Díaz, Enrique Sastré, Daniel Fernández, Teresa Ibarra, Gabriela Camorlinga, Carmel Vilanova, Julián Cota y William Bernal, a todos ustedes les estaré siempre agradecidos por su ayuda y su sincera amistad.

Tabla de contenido

	Página
Resumen en español	ii
Resumen en inglés	iii
Dedicatoria	iv
Agradecimientos	v
Lista de figuras	ix
Lista de tablas	x
Lista de Acrónimos	xi
Capítulo 1. Introducción	
1.1 Patología ósea.....	1
1.2 Osteoporosis.....	1
1.2.1 Epidemiología de la osteoporosis.....	2
1.2.2 Diagnóstico, prevención y tratamiento.....	3
1.3 Generalidades del tejido óseo.....	4
1.3.1 Hueso cortical y hueso esponjosos.....	4
1.3.2 Matriz extracelular del hueso.....	5
1.3.3 Remodelación ósea.....	6
1.3.4 Ciclo de activación, resorción y formación de hueso.....	6
1.3.5 Componentes celulares del hueso.....	8
1.3.5.1 Osteoclastos.....	8
1.3.5.2 Osteoblastos.....	8
1.3.5.3 Osteocitos.....	9
1.4 microRNA.....	9
1.4.1 Biogénesis y función celular.....	9
1.4.2 microRNA en osteogénesis, remodelación ósea, y patología ósea.....	11
1.5 Justificación.....	11
1.6 Hipótesis.....	12
1.7 Objetivo general.....	12
1.7.1 Objetivos específicos.....	12

Capítulo 2. Metodología

2.1	Extracción ADN genómico.....	13
2.2	Diseño y subclonación de microRNA.....	13
2.2.1	Diseño de oligonucleótidos miR-1270 y miR-548x-3p	13
2.2.2	Amplificación de fragmentos a subclonar (clo-miR-1270 y clo-miR-548x-3p)...	13
2.2.3	Linearización de plásmido.....	15
2.2.4	Extracción de gel de agarosa.....	16
2.2.5	Ensamble y transformación.....	16
2.2.6	PCR de colonias.....	17
2.2.7	Preparación y purificación de plásmido.....	18
2.2.8	Secuenciación.....	19
2.3	Cultivo celular.....	19
2.4	Transfección y transducción con partículas lentivirales.....	20
2.4.1	Transfección celular con Lipofectamina.....	20
2.4.2	Transfección celular con fosfato de calcio.....	21
2.4.3	Partículas lentivirales.....	22
2.4.4	Transducción células de sangre.....	23
2.4.5	Extracción de ARN.....	24
2.4.6	Reverso transcripción para síntesis de ADNc.....	24
2.4.7	Evaluación de expresión génica con RT-qPCR.....	25
2.5	Efecto de miR548x y miR1270 en genes asociados a osteoclastogénesis.....	25
2.6	Diferenciación de osteoclastos.....	27
2.6.1	Aislamiento de células PBMC.....	27
2.6.2	Diferenciación de precursores osteoclasticos.....	27
2.6.3	Titulación de anticuerpo CD14 positivo.....	28
2.6.4	Tinción TRAP de osteoclastos.....	28
2.7	Análisis estadístico.....	28

Capítulo 3. Resultados

3.1	Subclonación de miR-1270 y miR-548x-3p.....	29
3.2	Transfección y transducción.....	32
3.2.1	Transfección celular con Lipofectamina.....	32
3.2.2	Transfección celular con fosfato de calcio.....	33
3.2.3	Evaluación expresión génica de miR-1270 y miR-548x con el gen RPL32.....	34

3.2.4	Transducción células de sangre.....	35
3.3	Efecto de miR-548x y miR1270 en genes asociados a osteoclastogénesis.....	37
3.4	Diferenciación de osteoclastos.....	38
3.4.1	Ensayos en células PBMC y THP-1.....	38
3.4.2	Células PBMC CD14 positivo.....	39
3.4.3	Diferenciación de osteoclastos a partir de células PBMC CD14+.....	41
Capítulo 4. Discusión		
4.1	Subclonación de miR1270 y miR548x en un vector lentiviral.....	43
4.2	Transfección y transducción.....	44
4.3	Efecto de miR-548x y miR1270 en genes asociados a osteoclastogénesis.....	45
4.4	Diferenciación de osteoclastos.....	46
Capítulo 5. Conclusiones.....		48
Literatura citada.....		50
Anexos.....		54

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Matriz ósea del hueso esponjoso normal y con osteoporosis.....	2
Figura 2. Microestructura ósea del hueso compacto y hueso esponjoso.....	5
Figura 3. Fases del proceso de remodelación ósea.....	7
Figura 4. Biogénesis de los microRNA.....	10
Figura 5. Esquema de transfección con plásmidos en células 293T.....	20
Figura 6. Métodos de transducción con partículas lentivirales.....	23
Figura 7. Reacciones de amplificación por PCR de oligonucleótidos miR-1270 y miR-548x.....	30
Figura 8. Digestión enzimática de pLenti-GFP-PURO, por XbaI y Sall.....	30
Figura 9. Linearización de pLenti-GFP-PURO.....	31
Figura 10. PCR de colonias para miR-1270 y miR-548x.....	32
Figura 11. Transfección con Lipofectamina de células 293T con pLenti-GFP.....	33
Figura 12. Citometría de flujo células transfectadas con fosfato de calcio.....	33
Figura 13. Gel de agarosa donde se muestra la integridad del RNA extraído, (a) pLenti-GFP, (b) pLenti-1270, (c) pLenti-548x.....	34
Figura 14. Expresión génica de miR1270 y miR548x en relación al gen constitutivo RPL32.....	34
Figura 15. Citometría de flujo de la transducción de células MDA-231 y PBMC con pLJM1-eGFP.	36
Figura 16. Citometría de flujo de la transducción por spinulación de células MDA-231 y PBMC con pLenti-CMV-GFP-Hygro.....	36
Figura 17. Eficiencia de transfección de pLenti-GFP en células 293T por citometría de flujo.....	37
Figura 18. Efectos de miR548x y miR1270 sobre la expresión relativa de genes asociados a osteoclastos.....	38
Figura 19. Células THP-1 con 12 días de estimulación con PMA, M-CSF y RANKL.....	39
Figura 20. Titulación de anticuerpo CD14+ para en 250,000 células.....	40
Figura 21. Ensayo de aislamiento de células PBMC para tinción con Ab CD14+.....	40
Figura 22. Células PBMC estimuladas con M-CSF y RANKL.....	41
Figura 23. Tinción TRAP de osteoclastos.....	42

Lista de Tablas

	Página
Tabla 1. Mezcla para PCR.....	14
Tabla 2. Digestión enzimática de pLenti GFP PURO con enzimas XbaI y Sall.....	15
Tabla 3. Relación en pmol de los fragmentos de la reacción de ensamble.....	16
Tabla 4. Reacción de ensamble de pLentiPURO, miR548x y miR12470.....	17
Tabla 5. Concentraciones de plásmidos para transfección con Lipofectamina.....	21
Tabla 6. Mezcla de los plásmidos utilizados en el sistema lentiviral para transfección.....	22
Tabla 7. Secuencias de los cebadores qmiR-1270 y qmiR-548x para RT-qPCR.....	25
Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados en RT-qPCR para genes FOS1, GSK3B y CTSK...	26
Tabla 9. Diseño de los cebadores para miR-1270 y miR-548x.....	29
Tabla 10. Espectrofotometría de los productos de ensamble pLenti-mir548x y pLenti-miR1270.....	32
Tabla 11. Cuantificación de RNA total de células 293T transfectadas.....	34
Tabla 12. Cuantificación de RNA total de células 293T transfectadas para ensayo de RT-qPCR...	37
Tabla 13. Porcentaje de células PBMC con tinción CD14+ sometidas a incubación.....	41

Lista de Acrónimos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
bp	Pares de bases (base pairs)
BSA	Albúmina de suero bovino
CD14	Grupo de diferenciación 14
CTSK	Catepsina K
Dkk	Proteína Dickkopf
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
ddNTP	Didesoxinucleótidos
dNTP	Desoxinucleótidos
DU145	Células de cáncer prostático
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FOS-1	Gen codificante de cFOS, regulador de la expresión de RANKL en osteoclastos
GFP	Proteína verde fluorescente
GSK3B	Glucógeno sintasa cinasa 3
HeLa	Células derivadas de cáncer cervicouterino
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)piperazin-1-iletanosulfónico
HPRT	Gen codificante para Hipoxantina Fosforibosiltransferasa
IGF	Factor de crecimiento insulínico
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MDA231	Células derivadas de cáncer de mama
MEM	Medio esencial mínimo de Eagle
microRNA	Micro ácido ribonucleico
OPG	Osteoprotegerina
PBMC	Células mononucleares de sangre periférica
PBS	Solución salina amortiguadora con fosfato
PCR	Reacción en cadena de polimerasa
PC3	Células de cáncer prostático
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
Pre-miRNA	microRNA monocatenario
Pri-miRNA	microRNA bicatenario primario
RANK	receptor activador para el factor nuclear kappa- β
RANKL	ligando de receptor activador para el factor nuclear kappa- β
rhPTH	Hormona paratiroidea recombinante (humana)

RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RNasa	Ribonucleasas
RPL32	Proteína ribosomal L32 (gen codificante)
RPMI	Medio de cultivo del instituto memorial Roswell Park
RT-qPCR	Reacción en cadena de polimerasa cuantitativa en tiempo real
RUNX2	factor de transcripción regulador de la formación ósea
THP-1	Células monocíticas humanas derivadas de leucemia monocítica aguda
TGF- β	factor de crecimiento transformante beta 1
Tm	Temperatura de fusión para cebadores
TRAP	Fosfatasa ácida resistente al tartrato
UTR	Región no traducida de los genes
293T (HEK)	Células humanas derivadas de riñón embrionario
α MEM	Medio esencial mínimo de Eagle – modificación alfa

Capítulo 1. Introducción

1.1 Patología ósea

Las enfermedades óseas engloban un amplio rango de trastornos y afecciones que causan el desarrollo óseo anormal, estas pueden ser de carácter congénito, autoinmune o neoplásico. Como resultado causan huesos debiles que presentan pérdida excesiva de la fuerza y de la densidad del hueso, que conllevan a su fractura.

Las enfermedades más comunes que pueden afectar a los huesos son las relacionadas con el metabolismo de calcio y fósforo como el hiperparatiroidismo, raquitismo, osteomalacia, enfermedades endocrinas como el hipertiroidismo y síndrome de Cushing y enfermedades óseas propiamente como la osteopenia, la osteogénesis imperfecta y la osteoporosis. Siendo esta última el tema de interés para este trabajo.

1.2 Osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad metabólica de los huesos en donde ocurre una degradación progresiva de la masa y la microarquitectura ósea (Fig.1). Esto resulta en una mayor fragilidad de los huesos y un mayor riesgo de fracturas. Se presenta cuando ocurre un desequilibrio en la homeóstasis de los osteoblastos y de los osteoclastos, causando una reabsorción ósea desproporcionada o una formación de hueso nuevo insuficiente (McNamara, 2011).

La osteoporosis se clasifica como osteoporosis primaria, la cual ocurre naturalmente en el cuerpo, o como osteoporosis secundaria, que resulta de la presencia o el tratamiento de enfermedades preexistentes como anorexia nerviosa, fibrosis quística y diabetes mellitus tipo I (Lerner 2016). La osteoporosis primaria se subdivide en tipo I, presentes en mujeres posmenopáusicas, y tipo II, la cual ocurre como parte del proceso natural del envejecimiento. La osteoporosis tipo I ocurre debido al decremento de los niveles de estrógenos ocasionados por la menopausia. Estos cambios afectan el proceso de remodelación ósea y existe una diferencia en la incidencia de fracturas entre mujeres y hombres, ya que la mujer durante la menopausia experimenta gran pérdida de calcio de los huesos, proceso al que el hombre no está sometido.

La osteoporosis tipo II se desarrolla más lentamente y es debida a la menor concentración de testosterona y estrógeno disponible en la vejez, afectando a ambos sexos (Riggs et al., 2002).

La osteoporosis secundaria es causada por la presencia de una patología que predispone al individuo a desarrollar osteoporosis, tales como el hipotiroidismo, enfermedad renal crónica, cáncer, o alguna enfermedad gastrointestinal. La osteoporosis resultante del uso de algunos medicamentos también se clasifica como osteoporosis secundaria.

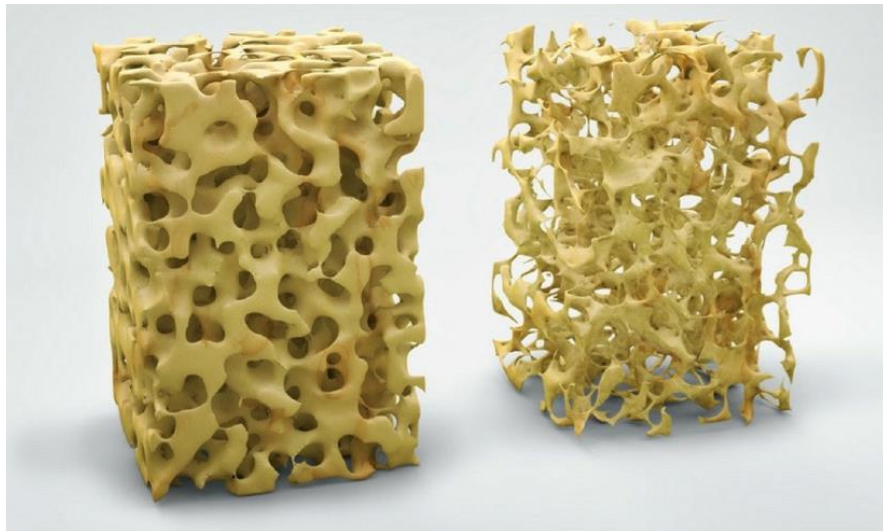


Figura 1. Matriz ósea del hueso esponjoso. El hueso esponjoso normal presenta mayor densidad. el hueso esponjoso con osteoporosis presenta un incremento del espacio intratrabecular en el hueso con osteoporosis.

1.2.1 Epidemiología de la osteoporosis

La osteoporosis es la patología ósea más común en el mundo, afecta a más de 200 millones de personas, se estima que una de tres mujeres y uno de cinco hombres por encima de los 50 años padecen osteoporosis. La incidencia de osteoporosis aumentará en paralelo con el aumento de la longevidad de las personas a nivel mundial, resultando en un incremento en las fracturas derivadas de la osteoporosis, ejemplo de esto son las fracturas de cadera, las cuales cuentan una tasa incidental de 1.6 millones de casos al año, se esperan 6.3 millones de casos para el 2050 (Holroyd et al., 2008).

La alta incidencia de fracturas en esta población tiene un gran impacto en su calidad de vida, pero a pesar del gran impacto personal, también se debe considerar el alto impacto económico que sostienen los sistemas de salud del mundo al tratar a estos pacientes.

1.2.2 Diagnóstico, prevención y tratamiento

La osteoporosis es una enfermedad que a menudo cursa silenciosamente y se manifiesta hasta presentarse una fractura. Como parámetro diagnóstico se ha establecido la medición de la densidad ósea. La densidad ósea se estima mediante un instrumento que utiliza niveles bajos de rayos X para determinar la proporción de minerales en los huesos. Para interpretar los resultados, se utiliza un criterio diagnóstico de acuerdo con la OMS, denominado "T-Score" de -2.5 el cual corresponde a dos y medio desviaciones estándar de la densidad ósea de una persona saludable de 30 años (Kanis et al., 1994).

La prevención de la osteoporosis comprende una dieta saludable rica en vitamina D y calcio, cambio en el estilo de vida promoviendo el ejercicio y evitar riesgos para prevenir caídas.

Las terapias farmacológicas disponibles van dirigidas a inhibir la resorción ósea y/o a promover la formación de hueso. Los bifosfonatos son los medicamentos más utilizados y estos actúan inhibiendo la osteoclastogénesis y promoviendo la apoptosis de los osteoclastos, como efecto adverso se ha asociado a la osteonecrosis mandibular. La terapia de remplazo hormonal a base de estrógenos ayuda a mantener la densidad ósea, especialmente cuando se comienza a tomar inmediatamente después de la menopausia. Esta inhibe el desarrollo de los osteoclastos, bloquean la activación del osteoclasto maduro e incrementan su apoptosis. Sin embargo, la terapia con estrógeno puede aumentar el riesgo de coágulos sanguíneos, de cáncer mamario y cáncer endometrial (Cauley et al., 2003).

Otros compuestos terapéuticos que se utilizan son los moduladores selectivos de los receptores de estrógeno (Raloxifeno), que actúan simulando la actividad de los estrógenos. Estos compuestos, asociados a la ingesta de calcio y vitamina D, han mostrado incrementar la densidad de masa ósea (Neele et al., 2002). El uso de anticuerpos monoclonales, inhibidores de RANKL (Denosumab), ha sido efectivo al evitar que RANKL se asocie al receptor RANK, controlando de este modo la diferenciación, proliferación y supervivencia de los osteoclastos (Rizzoli et al., 2010).

El único fármaco aprobado por la Administración Federal de Drogas de los Estados Unidos, como agente formador de hueso es la hormona paratiroidea recombinante (rhPTH), que actúa como regulador del calcio y su uso a bajas dosis estimula a los osteoblastos, muestra una habilidad para incrementar la densidad ósea y disminuir la tasa de fracturas (Zanchetta et al., 2009). Este tratamiento se administra de manera

intermitente ya que de forma continua estimula la resorción ósea, sin embargo, su uso se ha asociado al probable desarrollo de osteosarcoma (Saag et al., 2009).

1.3 Generalidades del tejido óseo

El hueso es un tejido conectivo fuerte y rígido (Standring-Gray, 2016), el cual se caracteriza por la mineralización de su matriz extracelular. Los huesos proporcionan un marco de soporte para los tejidos blandos del cuerpo, además funciona como un reservorio de contenido mineral, almacenando calcio y fósforo.

Los huesos del esqueleto están conectados uno con otro mediante articulaciones y dependientes de su estructura permiten diferente grado de movimiento (Hall-Guyton, 2011).

El hueso de acuerdo a su microestructura se puede clasificar en dos categorías diferentes, siendo este hueso esponjoso y hueso cortical. El hueso esponjoso es el sitio principal para el intercambio de minerales con el fin de mantener la fuerza y calidad esquelética, mientras que el hueso cortical participa en las respuestas metabólicas típicamente cuando están bajo deficiencia mineral prolongada o en la edad adulta tardía (Griffith-Genant, 2008).

1.3.1 Hueso cortical y hueso esponjoso

El hueso cortical (compacto) se organiza como columnas paralelas, conocidas como sistemas de Havers u osteonas, que se extienden longitudinalmente por el eje de los huesos largos (Fig.2). Estas columnas están compuestas de laminillas dispuestas en cilindros concéntricos que rodean un canal central, denominado como canal de Havers. Los canales de Havers contienen los nervios, vasos sanguíneos y sistema linfático del hueso. Los canales paralelos de Havers están conectados entre sí por los canales perpendiculares de Volkmann (Standring-Gray, 2014). El hueso cortical es esencial para dar fuerza y brindar lugares de inserción a tendones y músculos, éste forma el 80% del esqueleto, formando una capa densa y externa este envuelve al hueso trabecular (Felsenberg-Boonen, 2005). La función del hueso cortical es soportar la carga y transmitir las fuerzas mecánicas de los músculos para facilitar el movimiento (Currey, 2012).

El hueso esponjoso no contiene osteonas, por lo que las laminillas están organizadas como una red de trabéculas de varios anchos y longitudes que rodean las cavidades de la médula ósea (Fig.2). La orientación, el grosor y el espaciamiento de la trabécula, así como el grado de interconexión de la misma, son componentes importantes de la fuerza del hueso (Felsenberg-Boonen, 2005). El hueso trabecular es prominente en las vértebras espinales y en las epífisis de los huesos largos, suscitándose comúnmente fracturas en estos sitios al presentarse una debilidad ósea (Griffith-Genant, 2008).

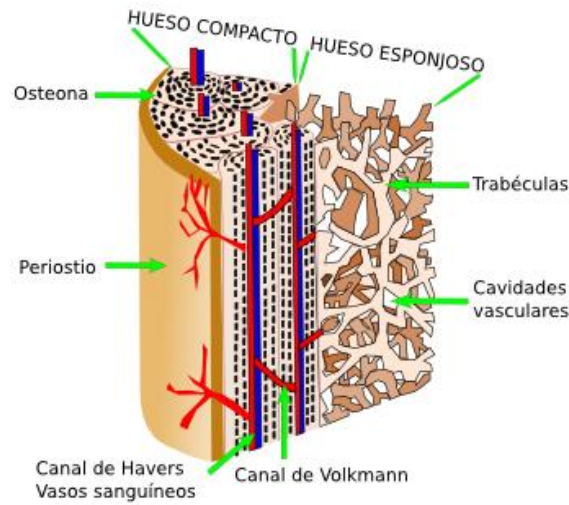


Figura 2. Microestructura ósea del hueso compacto y el hueso esponjoso. El hueso compacto se conforma de osteonas, que son o láminas de hueso rígido dispuestas de manera concéntrica que rodean un canal central, el canal de Havers. El canal de Havers contiene los nervios del hueso y los suministros de sangre. El hueso esponjoso presenta una estructura trabecular originando un espacio donde se aloja la médula ósea.

1.3.2 Matriz extracelular del hueso

La matriz ósea es el material extracelular mineralizado del hueso; como el tejido conectivo general, consta de una sustancia fundamental en la que se incrustan numerosas fibras de colágeno, normalmente ordenadas en arreglos de ramificados en paralelo.

En el hueso maduro, la matriz está moderadamente hidratada, y el 10 al 20% de su masa es agua. De su peso seco, del 60 al 70% está compuesto de sales minerales inorgánicas. La matriz extracelular es un almacén mineral importante, que contiene el 99% de calcio corporal y el 88% de fósforo corporal. La matriz ósea inorgánica se compone principalmente de cristales de hidroxapatita en forma de placa o de huso

que miden hasta 200nm de longitud, lo que ofrece una gran superficie disponible para el intercambio mineral, aproximadamente 10 m²/g de hueso (Gentili, 2009).

1.3.3 Remodelación ósea

La remodelación ósea es el proceso por el cual se renueva el hueso para mantener la resistencia ósea y la homeostasis mineral. La remodelación implica la eliminación continua de paquetes discretos de hueso viejo, la sustitución de estos paquetes con una matriz proteínica recién sintetizada y la subsiguiente mineralización de la matriz para formar hueso nuevo permitiendo la reparación activa de los micro-daños estructurales y la adaptación de la microarquitectura ósea a las condiciones locales de estrés (Clarke, 2008; Brennan, 2011). La remodelación ósea reemplaza aproximadamente el 10% del tejido esquelético por año, por lo que la mayor parte del esqueleto adulto se reemplaza cada 10 años (Tortora-Derrickson, 2014). La remodelación ósea es necesaria para reparar los daños o deformidades óseas, aumentar la resistencia ósea, mantener la mineralización y prevenir la acumulación de hueso viejo, que puede perder fuerza y convertirse en frágil y quebradizo.

1.3.4 Ciclo de activación, resorción y formación de hueso

La función de los osteoblastos y los osteoclastos es mantener la homeostasis ósea (Raggatt-Partridge, 2010). El hueso es un tejido dinámico constantemente sometido a un proceso de remodelación el cual se da a través de varias fases (Fig.3), primero la retracción de las células de revestimiento y la acción de la colagenasa sobre la membrana endosteal, dan lugar a la fase de "activación". En esta etapa se da el reclutamiento y la activación de los precursores mononucleares de los osteoclastos monocito-macrófagos encontrados en la circulación (Bruzaniti-Baron, 2007), estos se unen a la superficie ósea y se fusionan para formar osteoclastos grandes y multinucleados.

Los osteoclastos inician la fase de resorción por la secreción de iones hidrógeno y enzimas lisosómicas, en particular la catepsina K, que puede degradar todos los componentes de la matriz ósea, incluyendo el colágeno. Los osteoclastos acidifican la interfaz unida y disuelven lentamente la matriz. Este proceso, mediado por los macrófagos, permite la liberación del factor de crecimiento transformante beta (TGF-β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y factores de crecimiento insulínico I y II (IGF - I y II),

así como también la liberación de calcio al torrente sanguíneo que se utiliza para varias funciones del cuerpo. La resorción osteoclástica da lugar a cavidades profundas denominadas conos cortantes, esta fase tarda aproximadamente 2-4 semanas durante cada ciclo de remodelación (Kini-Nandeesh, 2012).

Durante la fase de “inversión”, la resorción ósea cambia a formación ósea. Las cavidades de resorción contienen una variedad de células mononucleares, incluyendo monocitos, osteocitos y preosteoblastos, que han sido reclutados para comenzar la formación de hueso nuevo. Durante la fase de inversión, la superficie resorbida se prepara para la siguiente fase.

La fase de “formación” comienza cuando las células osteoprogenitoras migran hacia las cavidades, este fenómeno de agrupamiento es dado por factores de crecimiento liberados de la matriz que actúan como quimiotácticos. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia de adhesión sobre la cual se une el nuevo tejido y expresan proteínas morfogénicas óseas (BMP2, BMP3, BM7) responsables de la diferenciación, convirtiéndose finalmente en osteoblastos. Luego, estos depositan dentro de las cavidades una matriz ósea no mineralizada denominada osteoide.

La última fase comienza 30 días después del depósito del osteoide donde se da un proceso de “mineralización” con calcio y fósforo, formando así el hueso nuevo. La superficie ósea se restaura y se cubre por las células protectoras de revestimiento que cubren completamente la superficie ósea recién formada (Kini-Nandeesh, 2012).

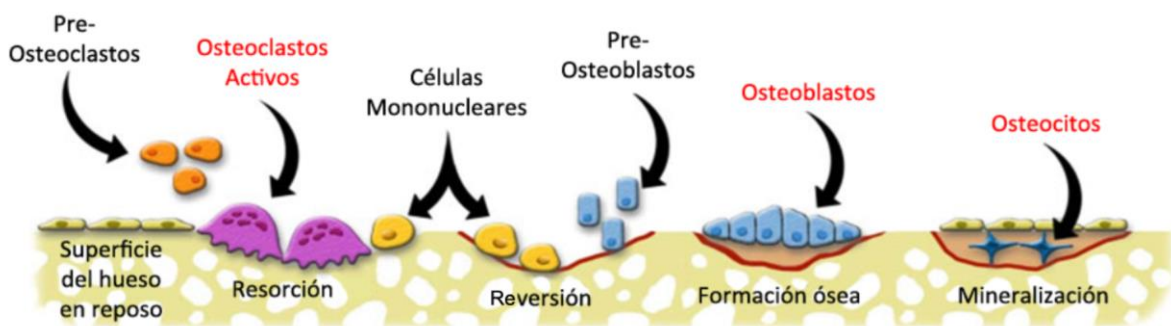


Figura 3. Fases del proceso de remodelación ósea. Fase de reposo hay retracción de osteoblastos que tapizan superficies óseas. Fase de activación hay reclutamiento de pre-osteoclastos que se unen a la superficie ósea, estos se fusionan para formar osteoclastos grandes y multinucleados. Fase de resorción, los osteoclastos disuelven la matriz ósea y producen cavidades en el hueso. Fase de reversión, células mononucleares son reclutadas para comenzar la formación de hueso nuevo. Fase de formación, los preosteoblastos sintetizan una sustancia de adhesión sobre la cual se une el nuevo tejido y finalmente se convierten en osteoblastos y depositan dentro de las cavidades una matriz ósea no mineralizada. Fase de mineralización con calcio y fósforo, formando así el hueso nuevo. Fuente de imagen: <http://ns.umich.edu/Releases/2005/Feb05/bone.html>

1.3.5 Componentes celulares del hueso

1.3.5.1 Osteoclastos

Los osteoclastos son células multinucleadas que son responsables de la eliminación local del hueso durante el crecimiento óseo y posterior remodelación de osteonas y hueso superficial. La inducción del desarrollo y la activación de osteoclastos se dan por la unión de RANKL (ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa-B) al receptor RANK (receptor activador para el factor nuclear kappa-B), estimulando la osteoclastogénesis, el receptor señuelo que se une a RANKL, denominado OPG inhibe la osteoclastogénesis al competir contra RANK.

Los osteoclastos causan la desmineralización del hueso mediante la liberación de protones, lo que crea un ambiente ácido y la destrucción de la matriz orgánica mediante la liberación de enzimas lisosómicas (catepsina K) y no lisosómicas (colagenasa).

Los factores que estimulan a los osteoclastos para resorber al hueso incluyen las señales derivadas de osteoblastos; las citocinas liberadas por macrófagos y linfocitos; factores sanguíneos como la hormona paratiroidea y el calcitriol. La calcitonina, producida por las células C del folículo tiroideo, reduce la actividad de los osteoclastos (Tortora-Derrickson, 2014).

1.3.5.2 Osteoblastos

Los osteoblastos son las células de construcción del hueso que se encuentran en la superficie de la matriz mineralizada. Estas células se diferencian de las células madre mesenquimales en la médula ósea, los precursores de osteoblastos proliferan y alinean la superficie ósea, como se diferencian en pre-osteoblastos, estos implantan colágeno tipo I formando una matriz osteoide; finalmente como osteoblastos maduros, mineralizan la matriz con cristales de hidroxiapatita, una forma de fosfato de calcio (Standring-Gray, 2014). Un factor importante, RUNX2, es responsable de estimular la diferenciación en la vía osteoblástica (Abdallah et al., 2015). RUNX2 también es un factor de transcripción para estimular la expresión de genes específicos de los osteoblastos (Bruderer et al., 2014).

En osteoblastos completamente diferenciados, la vía de señalización osteoblastogénica Wnt es responsable de la secreción de osteoprotegerina (OPG), un factor que inhibe la función RANKL, el cual es un factor de osteoclastogénesis. La alta estimulación de la vía Wnt induce mayor liberación de OPG y por lo tanto disminuye la osteoclastogénesis. DKK y esclerostina actúan como antagonistas de la vía Wnt. Se piensa que esta vía está activada, en parte, por estrés mecánico local, induciendo remodelación ósea (Colaïanni et al., 2014).

1.3.5.3 Osteocitos

Los osteocitos son las células más abundantes en el tejido óseo maduro. Los osteoblastos diferenciados, al formar la matriz ósea, quedan encajados dentro de cavidades conocidas como lagunas (Mullen et al., 2013). Se encuentran incrustados en toda la matriz ósea interconectados por finos procesos dendríticos los cuales se ramifican varias veces, formando una red celular compleja. En sus puntos distales se ponen en contacto con los procesos de las células adyacentes, formando uniones de comunicación con estas células, lo que significa que están en continuidad eléctrica y metabólica. Debido a esta red funcional, se cree que los osteocitos actúan como una red de extensómetros que controlan el entorno mecánico directamente y que reclutan otras células para alterar la masa ósea según se requiera.

1.4 microRNA

Los micro ácido ribonucleico (microRNA) fueron descubiertos en 1993 durante el estudio del gen lin-14 en un modelo de *C. elegans*, al observar cómo la abundancia de la proteína LIN-14 estaba regulada por un ARN de 22 nucleótidos, al que después le llamaron microRNA (Almeida et al., 2011). Desde ese descubrimiento inicial, se han detectado miles de microRNA y se han estudiado para elucidar su funcionamiento.

1.4.1 Biogénesis y función celular

Los microRNA son ácido ribonucleico (ARN) no codificante conformados por alrededor de 20 a 25 nucleótidos. Los microRNA a través del apareamiento de bases con secuencias complementarias del ARN

mensajero (ARNm) reprimen la producción de proteínas mediante la desestabilización del ARNm, el silenciamiento del ARNm, o la degradación del ARNm. El microRNA ejerce control sobre el desarrollo celular o el metabolismo al jugar un papel importante en la expresión génica postranscripcional.

La biogénesis de microRNA (Fig.4), involucra primero la transcripción del ADN por la ARN polimerasa II, como un gran transcrito primario, en donde se forma una horquilla y se genera una ARN bicatenario denominado "pri-miRNA". Posteriormente el pri-miRNA es procesado por la enzima nuclear Drosha, para formar un precursor microRNA de aproximadamente 70 nucleótidos (pre-miRNA). Este precursor es transportado fuera del núcleo hacia el citoplasma por la exportina 5, donde es procesado por una segunda enzima RNasa III denominada DICER, quien lo fragmenta a una longitud de alrededor de 22 nucleótidos como un microRNA maduro.

El microRNA maduro se incorpora a una partícula ribonuclear para formar el complejo silenciador inducido por ARN (RISC) que media el silenciamiento génico al unirse al extremo 3' de la región no traducida (UTR) del ARNm (Carthew, Sontheimer, 2009). El silenciamiento del ARNm se da por la escisión de la hebra de ARNm en dos piezas, por el acortamiento de la cola poli-A o por la traducción deficiente en proteínas por los ribosomas.

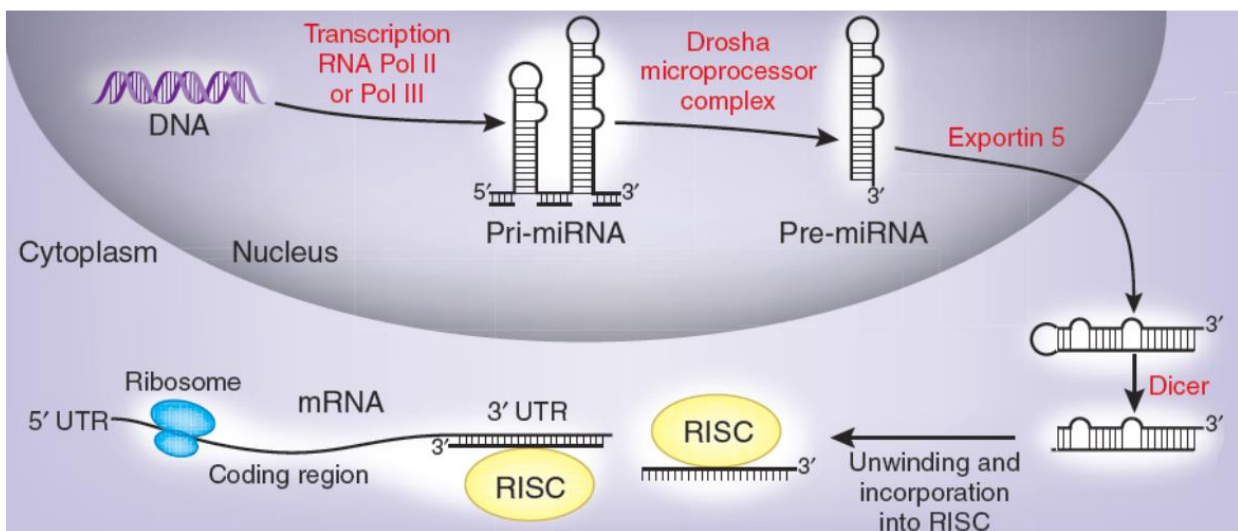


Figura 4. Biogénesis de los microRNA. Esquema del procesamiento del microRNA desde un microRNA primario (pri-miRNA) en el núcleo hasta el complejo miRNA-RISC el cual regula negativamente la expresión génica postranscripcional hibridando con secuencias complementarias en la región 3' no traducida (UTR) de un ARNm diana, inhibiendo la traducción de la proteína o promoviendo la degradación del ARNm. Imagen de Katie Ris-Vicari.

1.4.2 microRNA en osteogénesis, remodelación ósea y patología ósea

En las diferentes vías de señalización inherentes a la formación y resorción de hueso se encuentran muchos ARNm que su expresión pudiera ser regulada por algún microRNA. Antecedente de ello son los múltiples estudios experimentales elaborados en los últimos años.

Sugatani y Hruska (2007) suprimieron la expresión de miR-223 en células RAW264.7 y observaron osteoclastos mediante tinción TRAP. No obstante la sobreexpresión de pre-miR233 bloqueó la formación de estas células multinucleadas, estableciendo la importancia de miR-233 en la diferenciación osteoclástica. Man et al. (2010) presentaron un mecanismo de represión de la diferenciación osteoclástica por miR-155, donde la sobreexpresión de miR-155 resultaba en que los progenitores monocíticos se comprometían a una diferenciación como macrófagos activos, en lugar de seguir la vía de regulada por RANKL para osteoclastogénesis.

Krzeszinski et al., (2014) demostraron en modelos murinos cómo el *knockout* de miR-34a promovía la pérdida de la densidad de volumen óseo, y en ratones ovariectomizados inoculados con nanopartículas de quitosano con miR-34a mantenían la densidad de volumen óseo inhibiendo la osteoclastogénesis. Li et al., (2016) de manera similar, demostraron que miR214-3p inhibía la formación. Utilizando ratones ovariectomizados con niveles elevados de miR-214-3p mostraron una reducción en la formación ósea, la cual se rescató al someterse a tratamiento con antagomir-214-3p dirigido a los osteoclastos. Demostraron que el miR-214-3p derivado de osteoclastos se transfiere a los osteoblastos para inhibir la actividad de los osteoblastos in vitro y reducir la formación ósea in vivo, más aun la inhibición de miR-214-3p dirigida a los osteoclastos promueve la formación de hueso en ratones OVX envejecidos.

Por lo anterior se ha decidido caracterizar a los miR-1270 y miR-548x-3p, los cuales fueron identificados por el Dr. Rafael Velázquez del Instituto Nacional de Medicina Genómica, encontrándose estos altamente expresados en pacientes con osteoporosis.

1.5 Justificación

La osteoporosis es un problema grave a nivel mundial que compromete la salud de millones de personas y conlleva a costos elevados en el tratamiento. En México 1 de 4 personas sobre la edad de 50 años sufre

osteoporosis. La dinámica demográfica de México está cambiando y su población está envejeciendo, se espera que el grupo etario de los 60 años aumente a 36.4 millones de individuos para 2050. Dado que las fracturas osteoporóticas y por fragilidad son enfermedades asociadas con el envejecimiento, se espera que su incidencia crezca de manera acorde. Este hecho conlleva a un incremento en los costos de atención médica de los sistemas de salud en el país, tan solo en 2006 el gasto del sector salud fue alrededor de 97 millones de dólares (Zanchetta, et al., 2012).

En la actualidad hay varias opciones terapéuticas que han mostrado eficacia y aun así han presentado efectos adversos de importancia. Debido a que los miRNA juegan un papel importante en la fisiopatología de la osteoporosis y se ha establecido en la literatura su potencial terapéutico, se ha determinado estudiar a los miR-1270 y miR-548x-3p los cuales han sido identificados en pacientes con osteoporosis mostrando altos niveles de expresión, por lo cual podrían tener un papel regulatorio importante en el desarrollo de la enfermedad.

1.6 Hipótesis

Los microRNA miR-1270 y miR-548x-3p causan un incremento de la osteoclastogénesis.

1.7 Objetivo General

Caracterizar el papel de los miR-1270 y miR-548x-3p en la osteoclastogénesis.

1.7.1 Objetivos específicos

Subclonación de miR-1270 y miR-548x-3p en un vector lentiviral.

Evaluar el efecto de miR-1270 y miR-548x-3p en la osteoclastogénesis (genes asociados).

Inducir la diferenciación de osteoclastos a partir de células mononucleares de sangre periférica.

Capítulo 2. Metodología

2.1 Extracción de ADN genómico

En la amplificación de nuestros fragmentos de interés se empleó un molde de ADN genómico proveniente de sangre humana. Para realizar la extracción de ADN genómico se utilizó el equipo de purificación de ADN genómico de Promega Wizard, siguiendo el protocolo del fabricante.

Se obtuvo una muestra sanguínea en un tubo con anticoagulante (EDTA). Se lisaron los glóbulos rojos mediante una solución de lisis celular y se precipitaron las células blancas por centrifugación. Desechando el sobrenadante se resuspendieron las células restantes en el líquido residual. Se agregó una solución de lisis nuclear para lisar las células blancas, seguido se agregó un precipitador de proteínas al lisado nuclear y se agitó vigorosamente. Mediante centrifugación adicional se obtuvo un precipitado oscuro correspondiente a las proteínas, el sobrenadante se transfirió a un tubo con isopropanol. Al mezclarse se formaron fibras blancas correspondientes al ADN que se separó por centrifugación. Se lavó el DNA con etanol al 70% y de nueva cuenta se centrifugó, rehidrató y se almacenó para su uso posterior.

2.2 Diseño y subclonación de microRNA

2.2.1 Diseño de oligonucleótidos miR-1270 y miR-548x

Para la estrategia de clonación de miR-1270 y miR-548x se realizó el diseño de los oligonucleótidos con la herramienta “NEBuilder Assembly tool” de New England Biolabs, el plásmido utilizado es pLenti-PURO y los sitios de restricción empleados fueron XbaI y Sall.

2.2.2 Amplificación de fragmentos a subclonar (clo-miR-1270 y clo-miR-548x-3p)

Para la determinación de las temperaturas de hibridación óptima que permiten la amplificación del producto a subclonar se preparó una mezcla de PCR de 60µL (Tabla 1), la cual se dividió en seis alícuotas de 10µL que fueron utilizadas en la reacción con un gradiente de temperatura.

Tabla 1. Mezcla de PCR

H ₂ O libre de nucleasas	variable
Plantilla de ADN	variable
Mezcla de dNTP mix (40mM total, 10mM cada una)	1.2 µL
Cebador sentido (10µM)	3.0 µL
Cebador antisentido (10µM)	3.0 µL
5X Q5 solución amortiguadora	12.0 µL
5X Q5 potenciador de GC (opcional)	12.0 µL
Q5 ADN polimerasa de alta fidelidad	0.6 µL
Total	60.0 µL

Se homogenizó la mezcla y se transfirieron 10µL de la mezcla de PCR a cada uno de los tubos, posteriormente se incubaron en el termociclador pasando por un proceso de desnaturalización inicial a 98°C por 30 segundos, luego 35 ciclos de desnaturalización a 98°C por 10 segundos. La hibridación tomó lugar a un gradiente de 50 a 72°C por 10 segundos, una extensión a 72°C por 10 segundos y una extensión final a 72°C por 2 minutos.

La temperatura de fusión (T_m) de los cebadores se calculó utilizando la calculadora NEB T_m. Se aseguró calcular el T_m de la secuencia que se unió a la plantilla de ADN, y no el T_m del cebador en su totalidad. Para la temperatura de hibridación, se utilizó un margen de hasta 4°C por encima y por debajo de la temperatura sugerida por la calculadora, manteniéndose dentro del intervalo de 50°C a 72°C. El tiempo mínimo de extensión fue de 30 segundos, para productos <1kb.

Una vez terminada la PCR se separaron por electroforesis los productos de la PCR utilizando un buffer de carga en un gel de agarosa para analizar la amplificación de los productos. En el gel de agarosa se cargaron en los pocillos del gel, 5µL de cada producto de PCR (en solución amortiguadora de carga 1X) y 5µL del marcador de pesos de ADN y se realizó la electroforesis a 100V por una hora. Se visualizó el gel y se identificaron las diferentes condiciones para las que sólo hubo un producto o banda de PCR del tamaño deseado.

Al amplificar un fragmento de ADN genómico o ADN complementario, se recomienda añadir un paso confirmatorio para asegurarnos que el producto de la amplificación es el esperado. Un método simple es identificar los sitios para las enzimas de restricción dentro del producto amplificado y digerir unos

microlitros con estas enzimas y confirmar que el perfil de restricción esperado se haya obtenido en el gel de agarosa. Los productos de PCR pueden ser utilizados o se pueden congelar a -20°C .

2.2.3 Linearización de plásmido

La linearización de los plásmidos utilizados en esta tesis se realizó mediante el uso de enzimas de restricción. Se preparó una solución del plásmido a linearizar, posteriormente se agregaron las enzimas de restricción y se procesaron en el termociclador. Las enzimas de restricción son enzimas que cortan ADN. Cada enzima reconoce un número pequeño de secuencias blanco y corta el ADN en las secuencias o cercanas a ellas. Muchas enzimas de restricción hacen cortes escalonados que producen extremos sobresalientes de ADN de cadena sencilla. Sin embargo, algunos producen extremos romos. En el caso de los enzimas de restricción la cantidad de éstas en la reacción no superó el 10% del volumen total, ya que la actividad enzimática puede resultar inhibida a causa del glicerol que contienen las preparaciones de las enzimas.

El procedimiento consistió en realizar una mezcla del plásmido de interés, solución amortiguadora con albumina de suero bovino (Buffer Cutsmart NEB), agregando las enzimas de restricción Xba1 y Sal1, correspondientes a nuestro plásmido e incubarlo a 37°C por un periodo 2 horas (Tabla 2). Para valorar el desempeño de las enzimas de restricción se realizó la electroforesis de los productos obtenidos para valorar visualmente la linearización del plásmido.

Tabla 2. Preparado para digestión enzimática de pLenti GFP PURO con enzimas Xba1 y Sal1.

Tubo	#1	#2	#3	#4
pLenti GFP PURO + Buffer Cutsmart	9.0 μL	9.0 μL	9.0 μL	9.0 μL
Enzima digestión diluida: Xba1	---	0.5 μL	---	0.5 μL
Enzima digestión diluida: Sal1	---	---	0.5 μL	0.5 μL
Diluyente (H_2O)	1.0 μL	0.5 μL	0.5 μL	---

2.2.4 Extracción de gel de agarosa

La extracción de gel está diseñada para la purificación rápida de fragmentos de ADN linear o plásmidos. Los fragmentos de ADN de interés se extrajeron del gel de agarosa, mediante cortes bajo la visualización con luz UV, posteriormente se solubilizaron y colocaron en una columna con membrana de sílice para su separación. Se quitaron los contaminantes mediante centrifugación y finalmente el ADN contenido en la membrana fue eludido y quedó listo para su uso. Se utilizó el equipo comercial “Gen Elute Extraction Kit” de Sigma Aldrich siguiendo el protocolo del fabricante.

2.2.5 Ensamble y transformación

Para la reacción de ensamble y transformación de los microRNA: miR-1270 y miR-548x con el plásmido pLenti-PURO se utilizó el protocolo del fabricante del equipo de ensamble Gibson NEB y los productos de PCR obtenidos en la amplificación de los productos a subclonar (miR-1270 y miR-548x). Para el ensamble se recomienda un total de 0.02-0.5 pmols de fragmentos de ADN cuando se ensambla 1 o 2 fragmentos dentro de un vector. La eficiencia de ensamble disminuye al aumentar el número de fragmentos o el tamaño de los mismos. Para calcular el número de pmols de cada fragmento para el ensamble óptimo, basados en la longitud y el peso del fragmento, se recomienda la siguiente fórmula: $\text{pmols} = (\text{peso en ng}) \times 1000 / (\text{pares de bases} \times 650 \text{ daltons})$. La masa de cada fragmento puede ser medida utilizando el NanoDrop, con absorbancia de 260 nm. (50 ng de 5000 pares de bases de ADN de doble cadena es alrededor de 0.015 pmols por lo que 50 ng de 500 pares de bases de ADN de doble cadena es alrededor de 0.15 pmols), en la Tabla 3 se muestran la relación para las preparaciones de 10 μL y 2 μL . El procedimiento requiere preparar en hielo la reacción de ensamble la cual se muestra en la Tabla 4.

Tabla 3. Relación en pmol de los fragmentos de la reacción de ensamble.

Para 10 μL	0.02 pmol (20 fmol)	0.5 pmol (500 fmol)
Plásmido	1.8 fmol	45 fmol
Fragmento	18 fmol	450 fmol
Para 2 μL	0.02 pmol (20 fmol)	0.5 pmol (500 fmol)
Plásmido	0.36 fmol	9 fmol
Fragmento	36 fmol	90 fmol

Tabla 4. Reacción de ensamble de pLentiPURO, miR548x y miR1270.

	Tubo #1	Tubo #2	Control
Control positivo	---	---	2 μ L
pLenti-PURO	0.5 μ L	0.5 μ L	---
miR1270	0.5 μ L	---	---
miR548x	---	0.5 μ L	---
Gibson Master Mix	1 μ L	1 μ L	---

Para el ensamble de 2 a 3 fragmentos, se incubaron las muestras en el termociclador a 50°C por 15 minutos. Posterior a la incubación se guardaron las muestras en hielo o a -20°C para la transformación subsecuente. Se transformaron las células competentes de E.coli NEB 5- α con 2 μ L del producto de la reacción de ensamble, siguiendo el protocolo de transformación de Gibson (modificado).

Se descongelaron las células competentes en hielo (16 μ L de bacterias E.coli) y se agregaron 0.6 μ L del producto de ensamble a las células competentes. Se mezcló gentilmente por pipeteo, sin utilizar el vórtex. Se colocó la mezcla en hielo por 30 minutos. Seguido se da un golpe de calor a 42°C por 30 segundos, sin mezclar. Luego se transfirieron los tubos al hielo por 2 minutos y se agregó 317 μ L de medio SOC temporizado al tubo y se incubó a 37°C por 60 minutos, bajo agitación vigorosa (250 rpm).

Se utilizaron placas de LB agar con antibiótico a 37°C y se sembraron 70 μ L de las células a las placas de selección. Se utilizaron placas con antibiótico para el control positivo. Se centrifugó el resto de las bacterias transformadas a 15,000 g x minuto, el precipitado se resuspendió a 70 μ L y sembró en placa, finalmente se incubó sobrenoche a 37°C.

2.2.6 PCR de colonias

Mediante la técnica de PCR de colonia se pueden examinar rápidamente colonias de bacterias de E. coli transformadas en busca de construcciones viables de vectores de ADN. Por lo tanto, cualquier colonia que dé lugar a un producto de amplificación del tamaño esperado es probable que contenga la secuencia de ADN correcta. En este trabajo se utilizó el protocolo de Promega para la polimerasa GoTaq Flexi.

En hielo, en un microtubo estéril sin nucleasas se combinó: la solución amortiguadora 5X Green GoTaq, solución de MgCl₂, la mezcla de nucleótidos de PCR, el cebador sentido y antisentido, la ADN polimerasa GoTaq, la plantilla de ADN y agua libre de nucleasas. Luego se realizó la reacción de PCR en el termociclador con una desnaturalización inicial de 2 minutos a 95°C, seguido de 35 ciclos, constituidos por una desnaturalización secundaria de 30 segundos a 95°C, un alineamiento de 30 segundos de los cebadores a un gradiente de temperatura preestablecidas (T_m), y una extensión realizada por la Taq polimerasa a 72°C durante 1 minuto, finalmente se realiza una extensión a 72°C durante 5 minutos. Se separaron los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa y se visualizaron con bromuro de etidio en luz ultravioleta.

2.2.7 Preparación y purificación de plásmido

Los productos de ensamble se cultivaron toda la noche en medio de cultivo con antibiótico en una incubadora de agitación a 37°C. Al día siguiente, el cultivo de bacterias se sedimentó por centrifugación, se eliminó el sobrenadante y el precipitado se procesó con el equipo GenJet Plasmid Miniprep Kit de Thermo Scientific, siguiendo el protocolo del fabricante.

Las bacterias se resuspendieron en una solución que contiene ribonucleasas, asegurando su homogenización completa para que no queden grumos. Se agregó una solución amortiguadora de lisis, la cual presenta un pH alto y contiene detergentes que interrumpen las membranas bacterianas, lo que provocó la lisis de las bacterias.

Luego, se agregó una solución neutralizante para contrarrestar el efecto de la solución amortiguadora de lisis. Por centrifugación se precipitó el ADN genómico y las proteínas, mientras que el ADN plasmídico permaneció en el sobrenadante. Este sobrenadante se colocó en la columna de purificación y se lavó con una solución con alto contenido de sal la cual eliminó las endonucleasas, el ARN, las proteínas y las impurezas de bajo peso molecular dejando que el ADN permanezca unido a la membrana de sílice de la columna. El ADN del plásmido se liberó con una solución de elución quedando listo para su uso.

2.2.8 Secuenciación

La secuenciación del ADN proporciona la caracterización más completa del ADN plasmídico recombinante. Usando cebadores dirigidos a la cadena principal del plásmido y/o a la secuencia insertada, se puede determinar la identidad y el orden de las bases de nucleótidos.

La técnica de secuenciación de Sanger es el método más utilizado para determinar secuencias de ADN de plásmidos recombinantes. La secuenciación de Sanger implica el uso de una ADN polimerasa, un cebador, desoxinucleótido trifosfatos (dNTP) sin marcar y didesoxinucleótidos trifosfato (ddNTP) marcados fluorescentemente, donde cada base está marcada con un fluoróforo único. La incorporación de un ddNTP en la cadena recién sintetizada evita la adición de nucleótidos posteriores, deteniendo la elongación adicional de la molécula de ADN y dando como resultado un producto de ADN con un ddNTP marcado con fluorescencia al final de la cadena. La secuencia de nucleótidos se determina posteriormente separando los productos de ADN por tamaño. Se utilizó los servicios de Genewiz® para realizar la secuenciación. Una vez corroborada la secuencias, se prepararon plásmidos adicionales para su uso posterior.

2.3 Cultivo celular

El cultivo celular es un método para mantener células in vitro bajo condiciones controladas. El manejo de los cultivos celulares primarios, que son células obtenidas directamente a partir de tejidos, y los cultivos de líneas celulares, las cuales son células inmortalizadas, se realizaron en condiciones asépticas y con medios de cultivo comercial como DMEM, α MEM, MEM y RPMI 1640, los cuales fueron suplementados con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico y antimicótico.

Los cultivos se trabajaron dentro de campanas con flujo laminar. Las células se incubaron a 37°C en un ambiente enriquecido con CO₂, cambiando medios cada tercer día. Las líneas celulares utilizadas fueron células 293T, MDA-MB-231, THP-1, PC3, Hela, DU145 y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). También se prepararon alícuotas de 293T, MDA-231 y THP-1 para criopreservación a -80°C.

2.4 Transfección celular y transducción con partículas lentivirales

2.4.1 Transfección celular con Lipofectamina

La transfección es la introducción forzada de moléculas pequeñas como ADN, ARN o anticuerpos en células eucariotas. La transfección basada en lípidos (Lipofectamina) es una técnica que da como resultado la transferencia de material genético a una célula por medio de liposomas. Los liposomas son vesículas que pueden fusionarse fácilmente con una membrana celular, ya que ambas están hechas de una bicapa de fosfolípidos.

Para realizar la transfección se sembraron 100000 células 293T en una placa de 24 pozos aforados a 500 μ L de medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de antibiótico/antimicótico (Fig.5). Los plásmidos utilizados fueron pLenti-GFP, el cual funcionó como control positivo, pLenti-miR1270 y pLenti-miR548x los cuales se obtuvieron en los ensambles previos. Nuestro control negativo fueron células no transfectadas.

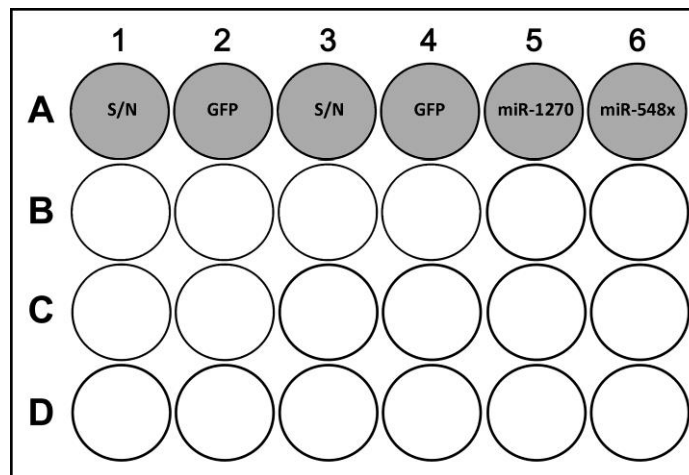


Figura 5. Esquema de transfección de 100000 células 293T en una placa de 24 pozos. Se establecen grupo control sin plásmido, grupo control con plásmido pLenti-GFP, grupos con plásmidos pLenti-miR1270 y pLenti-miR548x.

Los plásmidos de interés se diluyeron en medio basal a una concentración definida (Tabla 5), igualmente 2.4 μ L de Lipofectamina 2000 se diluye en medio basal. Se agregaron en partes iguales la Lipofectamina diluida a la solución del plásmido correspondiente y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Luego se transfirió la solución de Lipofectamina-Plásmido a la placa de 24 pozos de células 293T y se homogenizó con el medio, la placa se regresó a incubación.

Tabla 5. Preparación de plásmidos para transfección con Lipofectamina.

	Concentración del plásmido	Concentración requerida	Cantidad de diluyente	Volumen requerido
pLenti-miR1270	95.1 ng/ μ L	2.9 μ L (275 ng)	+ 10.85 μ L DMEM basal	→ 13.75 μ L
pLenti-miR548x	130.1 ng/ μ L	2.1 μ L (275 ng)	+ 11.65 μ L DMEM basal	→ 13.75 μ L
pLenti-GFP-PURO	57.1 ng/ μ L	9.6 μ L(550 ng)	+ 17.9 μ L DMEM basal	→ 27.5 μ L

A las 48 horas el control positivo se observó utilizando el microscopio de fluorescencia. Adicionalmente, los pozos preparados en duplicado (control positivo y control negativo) se prepararon para ser evaluados por citometría de flujo, los pozos de los plásmido de interés se pueden someter a extracción de RNA para su análisis mediante RT-qPCR.

2.4.2 Transfección celular con fosfato de calcio

La transfección con el método de fosfato de calcio utiliza una solución amortiguadora para formar un coprecipitado de ADN y fosfato de calcio sobre el cultivo celular. El fosfato de calcio facilita la unión del ADN condensado en el coprecipitado a la superficie de la célula y el ADN entra en la célula por endocitosis, así se dispersa en las células cultivadas.

Para este método se prepararon dos soluciones, la primera solución "A" es 20 μ L de solución amortiguadora 2x HBS, el cual está constituido por 50mM de HEPES, 280mM de NaCl y 1.5mM de Na₂HPO₄ ajustado a un pH de 7; la segunda solución "B" está conformada por 250ng de ADN (plásmido), 2.4 μ l de 2M CaCl₂ y agua destilada (ddH₂O) hasta 20 μ l.

Se agregó la solución "B" lentamente a la solución "A", mientras se sometió a ligera agitación con el vórtex (>300 rpm), siendo sumamente importante este momento ya que aquí se forma el coprecipitado de DNA/fosfato de calcio. Después de mezclar las dos soluciones, se incubó durante 1 minuto a temperatura ambiente. La solución se tornó opaca mientras se formaron los precipitados. Luego se agregó lentamente y de manera uniforme al medio. Finalmente se incubó a 37 °C con 5% de CO₂ por 24 horas, seguido de cambio del medio. A las 48 horas de transfectar las células, estas se evaluaron mediante microscopia de fluorescencia y por citometría de flujo.

2.4.3 Partículas lentivirales

Los genes lentivirales se deben expresar en células 293T para permitir la generación de partículas lentivirales. Nosotros utilizamos un sistema lentiviral de tercera generación donde se utilizaron cuatro plásmidos, un plásmido proporcionó las enzimas de transcripción e integración, otro las proteínas virales y la núcleo-cápside, otro la cápside viral y otro es un vector de transferencia para nuestro gen de estudio.

Para transfectar las células 293T con el plásmido para producir las partículas lentivirales se mezcló medio basal DMEM con los plásmidos del sistema lentiviral (Tabla 6) y se utilizó un método de transfección por lipofectamina o fosfato de calcio.

Tabla 6. Mezcla de los plásmidos utilizados en el sistema lentiviral para transfección de células diana.

	Tamaño del plásmido	Cantidad del plásmido	Concentración del Plásmido	Volumen
DMEM basal				58.44 μL
pLP1	8,889 bp	517.2 ng	186.2 ng/ μL	2.78 μL
pLP2	4,180 bp	243.2 ng	119.2 ng/ μL	2.04 μL
pMD2G	5,824 bp	338.8 ng	126.5 ng/ μL	2.68 μL
pLenti-PURO (GFP)	8,608 bp	500.8 ng	35.6 ng/ μL	14.07 μL
Total	27,501 bp	1600 ng		80.0 μL

El manejo de partículas lentivirales se realizó en una cabina de flujo laminar con nivel de Bioseguridad 2+ (BSL2+) para prevenir la contaminación por partículas lentivirales en aerosol. Al día siguiente de la transfección se cambió el medio. Pasadas 48 horas se verificó la presencia del fluorocromo por microscopia de fluorescencia, el sobrenadante celular se recolectó y almacenó ya que este es el que contiene las partículas lentivirales.

Pasadas 24 horas adicionales, de nueva cuenta se recolectó el sobrenadante celular y se agregó al anterior. Las partículas lentivirales se utilizaron para transducir las células diana donde el ARN viral se transcribe de forma inversa, se importa en el núcleo y se integra de forma estable en el genoma del huésped.

2.4.4 Transducción células de sangre

La transducción se realizó con el método convencional y el método de spinoculación (Fig.6), utilizando células PBMC y células MDA 231. Para la primera se recolectó 5 mL de sangre periférica en un tubo con anticoagulante y se centrifugó a 350g por 5 minutos, seguido se eliminó el sobrenadante y se añadió 20 mL de la solución amortiguadora de lisis de eritrocitos 1X de BioLegend. Se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos, agregando posteriormente 20 mL de PBS, realizando una segunda centrifugación a 350g por 5 minutos a temperatura ambiente y se resuspendió en 10mL de la solución amortiguadora de lisis de eritrocitos 1X. Se resuspendieron las células en 20mL de PBS y se centrifugaron a 350g por 5 minutos a temperatura ambiente. Se quitó el sobrenadante y se resuspendió en 5 mL de DMEM suplementado. Se realizó un conteo celular con azul de tripano y se preparó una alícuota de 500,000 PBMC en un tubo de 15mL. Tras centrifugar las células PBMC (350g por 5min) y eliminar el sobrenadante se resuspendieron en 2 mL de suspensión con partículas lentivirales.

Se realizó la transducción con el método normal (transferencia directa de 1 mL de suspensión con partículas lentivirales a un pozo de una placa de 24 pozos, y por el método de spinoculación, donde se utiliza el sobrenadante de células centrifugadas a 800g por 30 minutos, se re-homogenizaron las células en la solución de partículas lentivirales y se transfirieron a una placa de 24 pozos. Además se establecieron controles negativos, 250,000 PBMC células en 1 mL de α MEM + 10% FBS.

Para la transducción de células MDA-231, cultivadas previamente, se prepararon alícuotas de 75,000 células cada una, en tubos de 15mL. Se trabajaron de la misma manera que las células PBMC, donde se realizó la transducción por el método normal y el método de spinoculación. Las células se mantuvieron incubando a 37°C en un ambiente enriquecido con CO₂ por 48 horas y se evaluaron mediante microscopia de fluorescencia y por citometría de flujo.

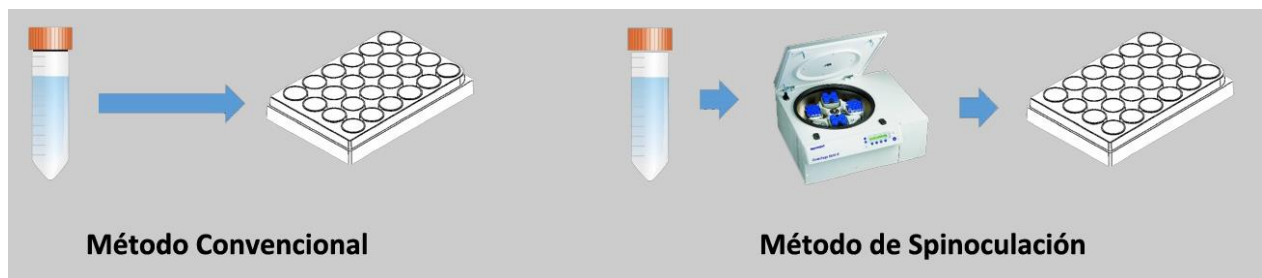


Figura 6. Transducción con partículas lentivirales. Método convencional las partículas lentivirales son depositadas directamente en las células diana en una placa de cultivo. En el método de spinoculación, las partículas lentivirales se centrifugan junto con las células diana y posteriormente se llevan a placa.

2.4.5 Extracción de ARN

Las células transfectadas y transducidas se lisaron directamente en los pozos agregando 250 μ L de la mezcla de solución de lisis con 2-mercaptoetanol y se esperó 2 minutos para que actué la mezcla. El lisado se colocó en una columna de filtración con un tubo de recolección sometido a una centrifugación máxima (12,000-16,000 g) por 2 minutos.

Se desechó la columna de filtración y se agregó al lisado filtrado un volumen de etanol al 70%. De la mezcla resultante se pipetearon 700 μ L en una columna con tubo recolector de 2 mL, el cual se centrifugó a velocidad máxima durante 15 segundos y se desechó el líquido que fluyó a través de la columna. Se realizó un primer lavado agregando 500 μ L de solución de lavado #1 en la columna y se centrifugó a velocidad máxima durante 15 segundos. Se transfirió la columna a un tubo de recolección nuevo de 2 ml. Se desechó el líquido y la columna de recolección original. Se pipetearon 500 μ L de la solución de lavado #2 que contiene etanol en la columna y se centrifugó a velocidad máxima durante 15 segundos. Se desechó el líquido, pero se retiene el tubo de recolección. De nueva cuenta se realiza un lavado con la solución de lavado #2 en la columna y la centrifuga a velocidad máxima durante 2 minutos para secar la columna de unión. El ARN de cada una de las muestras se eludió a partir de la columna usando 50 μ l de solución amortiguadora de elución y se almacenó a -80°C.

La concentración del ARN y la lectura de absorbancia a 260/280 nm fueron cuantificadas mediante espectrofotometría, con el equipo Nanodrop LITE de Thermo Scientific. La integridad y el tamaño de la distribución del ARN total purificado se evaluó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

2.4.6 Retrotranscripción para síntesis de ADNc

Partiendo del ARN obtenido se realizó una retrotranscripción para síntesis de ADN complementario (ADNc), utilizando Superscript II de Invitrogen (SSII). Se realizaron dos mezclas para la reacción, la primera (mezcla-1) consiste de 1.5 μ l de dNTP's 10mM (Promega), 1.5 μ l de hexámeros (150ng/ μ L) y 750 ng de RNA, complementado con H₂O libre de nucleasas para obtener un volumen de 20.8 μ l por reacción.

La mezcla-1 se colocó en un termociclador a 65°C durante 5 minutos para desnaturalizar las estructuras secundarias y se transfirió al hielo al finalizar el tiempo de incubación. Posteriormente se agregó la mezcla-

2 que consta de 6µl de solución amortiguadora de primera cadena (First-strand buffer), 3µl de DTT 0.1M y 0.19 de la enzima reverso transcriptasa Super Script II de Invitrogen. La reacción se incubó a 42°C durante 75 minutos para completar la retrotranscripción, seguido de 15 minutos a 70°C para desnaturalizar la enzima Super Script II. Se agregaron 45µL de H₂O posterior a la reacción. Los ADNc sintetizados se almacenan a -20°C.

2.4.7 Evaluación de expresión génica con RT-qPCR

El ADNc se utilizó para evaluar la expresión génica de miR-1270, miR-548x y RPL32 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). La mezcla para la RT-qPCR contiene 1.7 µl de H₂O libre de nucleasas, 0.4 µl de cebador sentido, 0.4 µl de cebador antisentido y 5µl de QuantiTECT SYBER Green (Qiagen). En una placa de 96 pozos se colocaron 2.5 µl de ADNc y 7.5 µl de la mezcla, la placa se cubrió y centrifugó a 4°C durante 5 minutos a 1000g. Luego la placa se colocó dentro del termociclador (Applied Biosystems) corriendo el programa Attune Cytometric software 7500 v2.0.6 durante 40 ciclos. Los genes evaluados fueron miR-1270, miR-548x (Tabla. 7), los resultados fueron normalizados con el nivel de expresión de RPL32, el cual funge como gen constitutivo.

Tabla 7. Secuencias de los cebadores utilizados en RT-qPCR para genes miR-548x y miR-1270.

Cebadores	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido
q-miR548x	TTGCAGTTTTTGC GTTACTTTC	ATCAACATTCTTGCCAATGC
q-miR1270	ACAGGTGCCCATGACTAAGC	AACACTTTGGGAGGCAGATG

2.5 Efecto de miR-548x y miR1270 en genes asociados a osteoclastogénesis

La evaluación del efecto de los microRNA en la osteoclastogénesis se realizó en genes blanco seleccionados de bases de datos y herramientas predictivas en línea (GenBank, miRDB, miRBase, etc.), los cuales ya tenían alguna participación conocida en la osteoclastogénesis. Se decide medir la expresión de tres genes asociados a la osteoclastogénesis: FOS1 que es un proto-oncogén regulador de la expresión de RANKL, GSK3B del cual se requiere su inactivación sobre RANKL para la diferenciación de osteoclastos y Catepsina K la cual se involucra en la remodelación y reabsorción ósea.

La medición de la expresión génica se realizó por RT-qPCR la cual implicó realizar primero una retrotranscripción de ARNm en ADNc; seguido de la amplificación de secuencias de ADNc específicas por PCR y la cuantificación de los productos de amplificación.

Para la extracción de ARN total se hizo previamente la transfección de células 293T con pLenti-GFP, pLenti-mir548x y pLenti-mir1270 la cual fue evaluada por citometría de flujo para ver la tasa de transfección. El lisado de las células fue recolectado y se realizó la extracción de ARN total de acuerdo al procedimiento descrito. Finalizada la extracción del ARN de cada una de las muestras, se almacenó a -80°C para su uso posterior. La concentración del ARN y la lectura de absorbancia a 260/280 nm fueron cuantificadas mediante espectrofotometría, con el equipo Nanodrop LITE de Thermo Scientific. La integridad y el tamaño de la distribución del ARN total purificado se corroboraron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2%.

Partiendo del ARN obtenido se realizó una retrotranscripción para síntesis de ADN complementario (ADNc), utilizando Superscript II de Invitrogen (SSII) siguiendo el protocolo ya descrito. El ADNc sintetizado se utilizó para evaluar la expresión génica de FOS1, GSK3B, CTSK y HPRT (Tabla 8) mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) según protocolo establecido, siendo los resultados normalizados con el nivel de expresión de HPRT, que fungió como gen constitutivo. Las muestras se analizaron por triplicado.

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados en RT-qPCR para genes FOS1, GSK3B y CTSK.

Cebadores	Secuencia Sentido	Secuencia Antisentido
qh-FOS1	AACCGCCACGATGATGTTCT	AGAAGTCCTGCGCGTTGAC
qh-GSK3B	CGTCAGGAACAGGACATTTACC	GCCAGAGGTGGATTACTTGACA
qh-CTSK	TTCCCGCAGTAATGACACCC	GGAACCACACTGACCCTGAT

2.6 Diferenciación de osteoclastos

2.6.1 Aislamiento de células PBMC (Monocitos)

Para establecer un cultivo de osteoclastos derivados de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) primero se realizó el aislamiento de las mismas mediante un preparado de células de sangre total de un voluntario o de células de concentrado leucocitario proveniente de un banco de sangre. Estas células se purificaron sobre un gradiente de densidad, se utilizó Lymphoprep. Se mezclaron 10 ml de sangre completa o "capa leucocitaria" con 10 ml de PBS (sin Ca²⁺ y Mg²⁺) a 37°C, luego se colocó sobre 10 ml de Lymphoprep formando una capa superficial, la cual se centrifugó sin freno a 800g durante 30 minutos a una temperatura de 15-25°C.

La capa celular leucocitaria (buffy coat) localizada sobre el Lymphoprep se recolectó y se le agregó un volumen igual de PBS para lavar las células. Se centrifugó a 120g por 15 minutos y después se realizó un segundo lavado. El precipitado formado por la centrifugación de células PBMC, se resuspendió en medio RPMI suplementado y se sembró en caja de 10 cm. Se incubó por un periodo de 2 horas a 37°C con CO₂ con la finalidad de obtener monocitos, que son precursores osteoclásticos, los cuales tienen una gran capacidad de adherencia. Transcurrido el tiempo de incubación se descartó el sobrenadante y se cosecharon las células por tripsinización. Las células se contaron en hemocitómetro y se tiñeron con anticuerpo CD14+ lo que nos ayudó a identificar que los PBMC seleccionados son monocitos durante la evaluación por citometría de flujo.

2.6.2 Diferenciación de precursores osteoclásticos

Se sembró la población seleccionada de células PBMC adherentes CD14+ en placas de 96 pozos en 200µL de medio RPMI 1640 con 10% FBS y 1% Ab/Am. Las concentraciones utilizadas fueron 50,000 - 100,000 - 150,000 y 200,000 células. Se establecieron tres condiciones a evaluar: 1) grupo control negativo, 2) grupo estimulado con factor estimulante de colonias de macrófagos humanos (h-MCSF) a una concentración de 50ng/mL durante 2 a 3 días para inducir la diferenciación a células tipo macrófago, y 3) grupo estimulado con 50 ng/mL de M-CSF y RANKL humano a concentración de 100ng/mL para estimular la diferenciación a osteoclastos. Se realizó cambio de medio cada tercer día. El cultivo se interrumpió al décimo-octavo día (protocolo Susa et al. 2004). Se realizó tinción TRAP y se visualizó por microscopia en campo claro.

2.6.3 Titulación de anticuerpo CD14 positivo.

Se realizó la titulación de anticuerpo “PE anti-human CD14 Antibody” de Biolegend y se determinó la cantidad mínima necesaria para observar una población de monocitos CD14+. Se preparó una solución de bloqueo para la fracción constante (FC) para los monocitos derivados de células PBMC la cual contenía: 90 μ L de solución FMC (BSA), 5 μ L e FBS y 5 μ L de suero murino.

Se prepararon 5 alícuotas de células PBMC y se probaron diferentes concentraciones del anticuerpo CD14+ (250ng, 125ng, 62.5ng, 31.25ng, 0 ng). Las células se resuspendieron en 40 μ L de buffer de bloqueo y se incubaron por 15 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 10 μ L de anticuerpo en sus diferentes concentraciones y se mantuvo a 4°C por 45 minutos. Se analizó por citometría de flujo.

2.6.4 Tinción TRAP de osteoclastos

Para la determinación de la actividad de la enzima fosfatasa ácido tartrato resistente (TRAP) propia de los osteoclastos se utilizó un equipo de tinción TRAP comercial (Sigma #387A-1kt), siguiendo el protocolo establecido. Se ajustó el volumen de las soluciones a la cantidad de muestras a teñir. Se utilizó una solución de fijación que contiene solución de citrato, acetona y formaldehído y una solución de tinción que contiene dH₂O, mezcla Fast Garnet GBC, Naftol-AS-bifosfato, solución de acetato y solución de tartrato. Se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente, como no se observaron cambios de coloración, la placa se transfirió a una incubadora a 37°C extendiendo el periodo de incubación. Se mantuvo un pozo control (sin osteoclastos) para validar los cambios de coloración. Al término, se enjuagó la placa con dH₂O y se dejó secar. Se visualizó la placa por microscopía de campo claro con magnificación de 10-20x y se realizó la cuantificación de osteoclastos. Los osteoclastos son células TRAP+ con más de 3 núcleos.

2.7 Análisis estadístico

Los datos obtenidos en la RT-qPCR fueron analizados con el programa Graph Pad Prism 5. Se utilizó la prueba paramétrica de análisis de varianzas (ANOVA) de una vía, seguido de la prueba de Tukey para comparación múltiple. Los resultados significativos fueron aquellos con una $p < 0.05$.

Capítulo 3. Resultados

3.1 Subclonación de miR-1270 y de miR-548x

Se diseñaron los cebadores para miR-1270 y miR-548x (Tabla 9) utilizando el programa en línea “New England Biolabs Assembly Tool”, empleando el plásmido pLenti-GFP-PURO como andamio y las enzimas de restricción XbaI y Sall.

Tabla 9: Diseño de los cebadores para miR-1270 y miR-548x

Cebador	Secuencia 5' - 3'
miR-1270 (sentido)	ctccatagaagacaccgact CTCCCCAGTAGCTGAGATTAC
miR-1270 (antisentido)	tgtaatccagaggttgattg TGCTAGACTCAGATAAATATATTTTACAAATC
miR-548x (sentido)	ctccatagaagacaccgact TCTAGAAATCATTTTGTATATAATATG
miR-548x (antisentido)	tgtaatccagaggttgattg GTCTAACCACTGAAATTCAATATTG

Estos oligonucleótidos se mandaron sintetizar con una compañía comercial (T4 Oligo). Seguido se realizó la amplificación de los fragmentos a subclonar mediante PCR, empleando un gradiente de temperatura se determinó la temperatura óptima de hibridación para cada uno de los cebadores. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa (Fig.7a), donde se muestran los productos de PCR amplificados para clo-miR-1270 con temperatura de hibridación óptima de 65°C a 40 ciclos y los productos de PCR amplificados para clo-miR-548x con temperatura de hibridación óptima de 57 y 59°C a 35 y 40 ciclos. Las bandas derivadas se mostraron alrededor de los 500 pares de bases.

Se realizó una segunda PCR aumentando las cantidades en 50% para obtener suficiente producto, en esta ocasión se obtuvieron las bandas esperadas en el rango de los 500 pares de bases para miR-1270, pero para miR-548x las bandas fueron de 100 pares de bases (Fig.7b). Debido a este hecho se realiza un nuevo PCR solamente con miR-548x (Fig.7c) donde se obtuvieron las bandas esperadas (515 bp para miR-548x), adicionalmente se observaron bandas alrededor de 250 pares de bases y por debajo de 100 pares de bases, lo que sugiere una posible unión de los cebadores en otros sitios, dimerización o que los cebadores no se utilizaron.

Se realizó una purificación por extracción de gel, para este proceso se realizó una digestión enzimática para pLenti-GFP-PURO el cual tiene un tamaño vacío de 7889 pares de bases (bp) y con GFP tiene 719 pares de bases adicionales. Se utilizaron las enzimas de restricción XbaI y Sall y se observó buen funcionamiento de las enzimas de restricción (Fig.8).

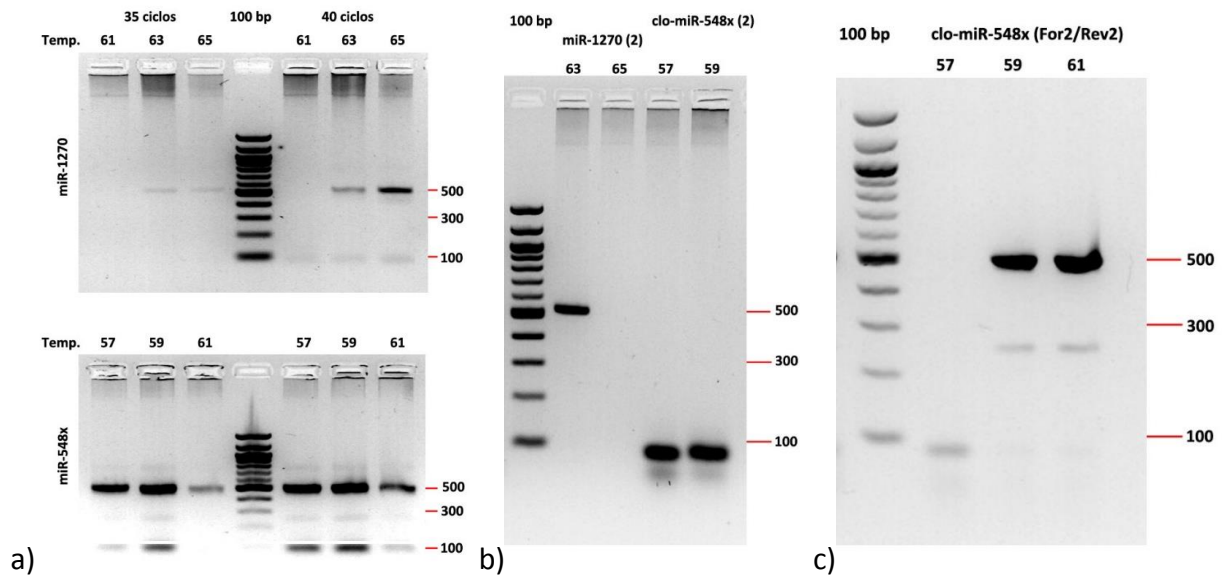


Figura 7. Temperatura de hibridación de miR-1270 y miR-548x. Geles de las reacciones de amplificación por PCR de oligonucleótidos miR-1270 y miR-548x. a) La temperatura de hibridación óptima para miR-1270 fue de 65°C a 40 ciclos, y para miR-548x fue de 57 y 59°C a 35 y 40 ciclos respectivamente. Las bandas se mostraron alrededor de los 500 pares de bases. b) En una reacción de amplificación subsecuente se muestran bandas de alrededor de 500 pares de bases para miR-1270, para miR-548x no se obtuvieron las bandas deseadas. c) Se realizó una tercer PCR para miR-548x, donde se obtuvieron las bandas deseadas.

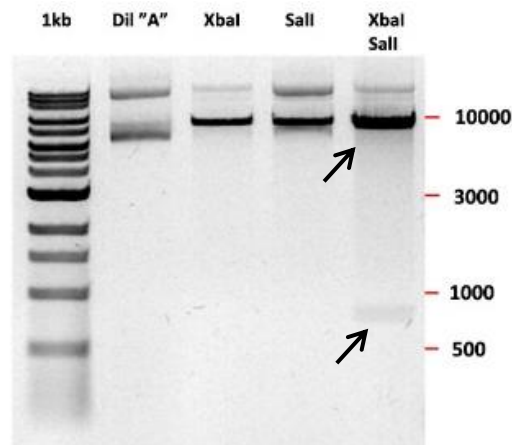


Figura 8. Gel de agarosa al 1% de la digestión enzimática de pLenti-GFP-PURO por XbaI y Sall, donde se muestran las bandas (flechas) correspondiente al plásmido vacío (7889 bp), y la banda de GFP (719 bp).

La extracción en gel está diseñada para la purificación rápida de fragmentos de DNA lineal o plásmidos. Se realizó una extracción mayor donde los fragmentos de DNA de interés fueron extraídos mediante cortes bajo la visualización de luz UV, se solubilizaron y se sometieron a una columna con membrana de sílice para su separación. Se quitaron los contaminantes mediante centrifugación y finalmente el ADN contenido en la membrana se eludió. La extracción se realizó de un pozo grande de producto de PCR de pLenti-GFP-PURO (Fig.9). Se obtuvo una concentración de 48.8 ng/ μ L, con un total de 23.4 μ L dando 1071.72 μ g o 219.8 fmol.

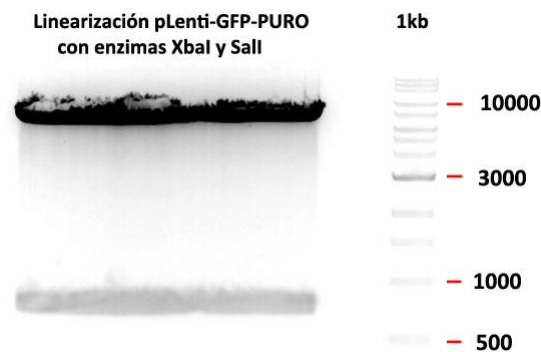


Figura 9. Linearización de pLenti-GFP-PURO. Gel de agarosa al 1% donde se muestra un gran pozo con producto linearizado.

De las placas de LB agar sembradas con los productos de la reacción de ensamble y transformación, se obtuvo el crecimiento de unidades formadoras de colonias (ufc), para los microRNA fue de 1 ufc por cada uno, el control positivo presentó más de 200 ufc y pUC19 presentó \sim 434 ufc. La eficiencia de transformación fue de 6.89×10^8 ufc/ μ g.

La presencia de nuestro inserto de ADN en el ensamble del plásmido se determinó mediante PCR de colonias, mostrando en el gel de agarosa las bandas alrededor de 100 pares de bases para miR-1270 que es de 130 pares de bases y de alrededor de 200 pares de bases para miR-548x que es de 231 pares de bases (Fig.10). Una vez confirmado nuestro inserto en el ensamble se realizó la purificación de los plásmidos y se midió la densidad óptica con el espectrofotómetro Nanodrop Lite (Tabla.10).

Finalmente para validar nuestro ADN plasmídico de pLenti-miR1270 y pLenti-miR548x se utilizó el servicio de secuenciación comercial de la compañía GeneWiz. Una vez obtenidas las secuencias se realizó el análisis comparativo utilizando la plataforma en línea BOXSHADE, la cual mostró buena alineación de las secuencias de oligos (Ver anexos).

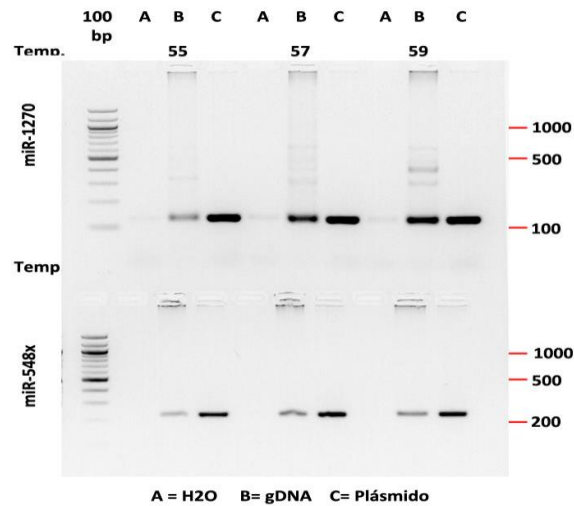


Figura 10. PCR de colonias para miR-1270 y miR-548x. Gel de agarosa al 2% donde se muestran productos de PCR de colonias con temperatura de hibridación de 55, 57 y 59 grados centígrados. Para miR-1270 se observan bandas de 130 bp. Para mir-548x se muestran bandas de 231 bp.

Tabla 10. Espectrofotometría de los productos de ensamble pLenti-mir548x y pLenti-miR1270

pLenti-miR548x	pLenti-miR1270
A260 / A280 = 1.87	A260 / A280 = 1.74
Concentración = 130.1 ng/μl	Concentración = 95.1 ng/μl

3.2 Transfección y transducción

3.2.1 Transfección celular con lipofectamina

Bajo el protocolo del fabricante, se realizó en placa de 24 pozos la transfección de células 293T con Lipofectamina 2000 (Invitrogen), utilizando los plásmidos: pLenti-miR1270, pLenti-miR548x y pLenti-GFP. La microscopia de fluorescencia muestra transfección positiva del plásmido GFP (Fig.11a). El análisis por citometría de flujo mostró una transfección del 48% (Fig.11b).

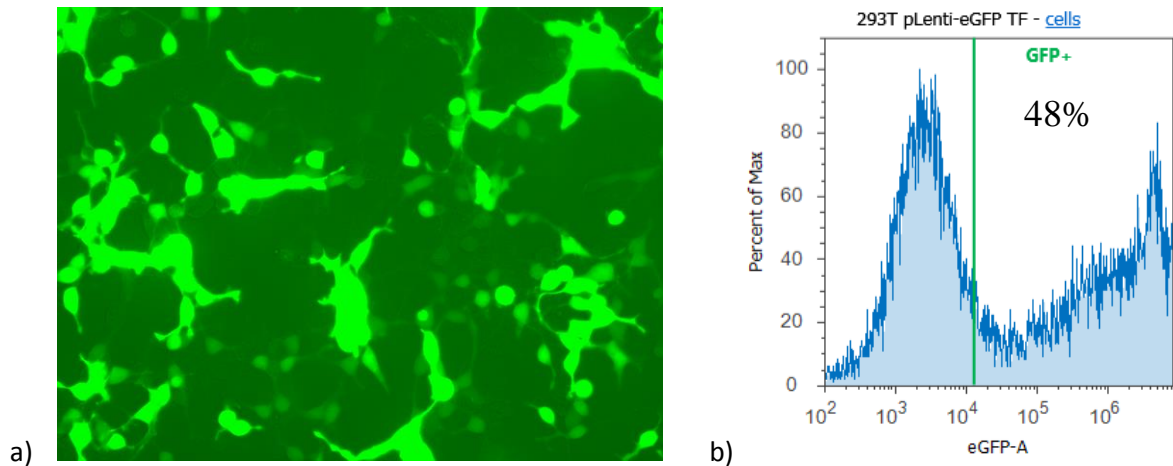


Figura 11. Transfección con Lipofectamina de células 293T con pLenti-GFP. a) Microscopía de fluorescencia de células transfectadas con pLenti-GFP, (b) Citometría de flujo mostro 48% de células transfectadas con pLenti-GFP.

3.2.2 Transfección celular con fosfato de calcio

Se evaluó la transfección mediante el método de fosfato de calcio. En placa de 24 pozos se sembraron células 293T a razón de 100000 células por pozo en medio DMEM suplementado, se utilizó el plásmido pLenti-GFP. Se probaron diferentes concentraciones de plásmido (250ng, 500ng, 1µg, 1.5 µg) y el tiempo de transfección: inmediata, al minuto y a los 20 minutos, estableciendo un control negativo. Al observar con el microscopio de fluorescencia las células transfectadas mostraron fluorescencia. La citometría de flujo muestra transfección positiva para todas las muestras con excepción de los controles. La concentración de 250 ng con transfección inmediata mostró mayor porcentaje de transfección ubicándose en 54.88% (Fig.12).

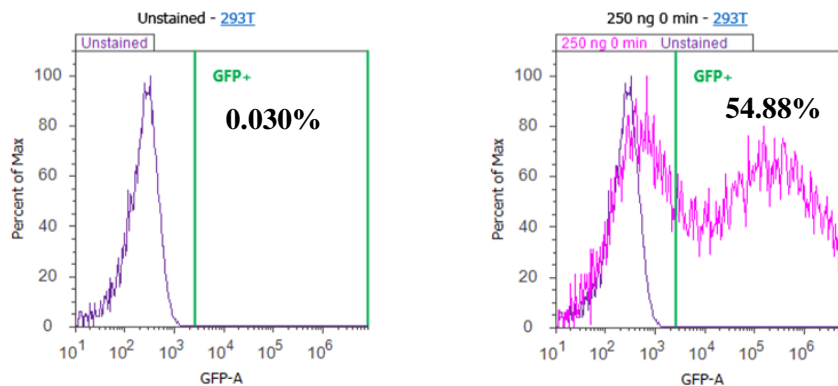


Figura 12. Histogramas de citometría de flujo de células 293T transfectadas mediante método de fosfato de calcio con pLenti-GFP. El primer histograma es del grupo control donde no se observan células GFP+. El segundo histograma muestra una transfección del 54.88% de células GFP+.

3.2.3 Evaluación expresión génica de miR-1270 y miR-548x con el gen RPL32

Derivado del experimento de transfección directa en células 293T con los plásmido pLenti-GFP, pLenti-miR-1270 y pLenti-miR548x se realizó extracción de ARN y se determinó mediante espectrofotometría las concentraciones extraídas siendo estas por encima de los 100 ng/ μ L de ARN (Tabla 11).

Tabla 11. Cuantificación por espectrofotometría de RNA total de células 293T transfectadas.

pLenti-GFP	pLenti-miR1270	pLenti-miR548x
A260/280 = 2.07	A260/280 = 2.07	A260/280 = 2.05
Concentración = 132.9 ng/ μ L	Concentración = 105.2 ng/ μ L	Concentración = 116.0 ng/ μ L

La integridad del ARN se verificó por electroforesis (Fig.13), luego se realizó la retrotranscripción con la enzima Superscript II para síntesis de ADNc, y se realizó una PCR en tiempo real (RT-qPCR) para evaluar la expresión génica de miR1270 y mir548x normalizado con el gen constitutivo RPL32 (Fig.14).

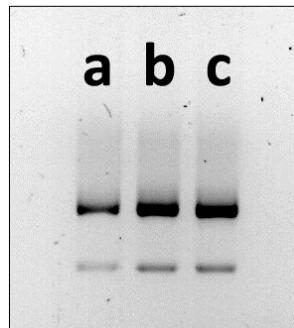


Figura 13. Gel de agarosa al 1% donde se muestra la integridad del RNA extraído, (a) pLenti-GFP, (b) pLenti-1270, (c) pLenti-548x.

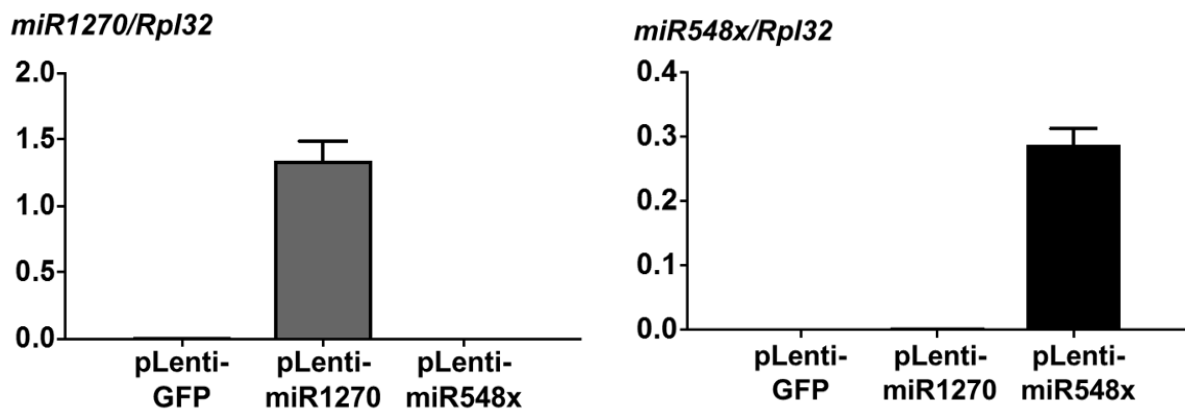


Figura 14. Expresión génica de miR1270 y miR548x en relación al gen constitutivo RPL32, línea celular 293T.

3.2.4 Transducción de células mononucleares de sangre

Células 293T fueron transfectadas con un sistema lentiviral de tercera generación, teniendo como vector de transferencia a pLentiJM1-eGFP para la producción de partículas lentivirales. Ya corroborada la presencia de GFP mediante microscopia de fluorescencia, se cosecharon las partículas lentivirales y se realizó una transducción en células MDA-231 y PBMC. Se efectuaron dos métodos de transducción uno convencional y otro por spinoculación.

En el método convencional las células diana se resuspenden en partículas lentivirales, luego sembrándose en placa e incubándose posteriormente. En el protocolo de spinoculación las células se resuspenden en partículas lentivirales y pasan por un proceso de centrifugación previo a su incubación. Las muestras se analizaron por citometría de flujo (Fig.15), las células MDA-231 presentaron un porcentaje mayor de transducción (73%) mediante el método de spinoculación comparado con el método convencional. Las células PBMC no mostraron diferencia importante entre un método u otro. Las células MDA-231 se mostraron más transducibles que las células PBMC.

Debido a limitantes presentadas con el plásmido pLJM1-GFP, se opta cambiar el plásmido que funge como vector de transferencia de GFP a pLenti-CMV-GFP-Hygro y realizar otro experimento de transducción por spinoculación el cual se analizó mediante citometría de flujo (Fig.16), y se encontraron las células PBMC más transducibles con el nuevo plásmido.

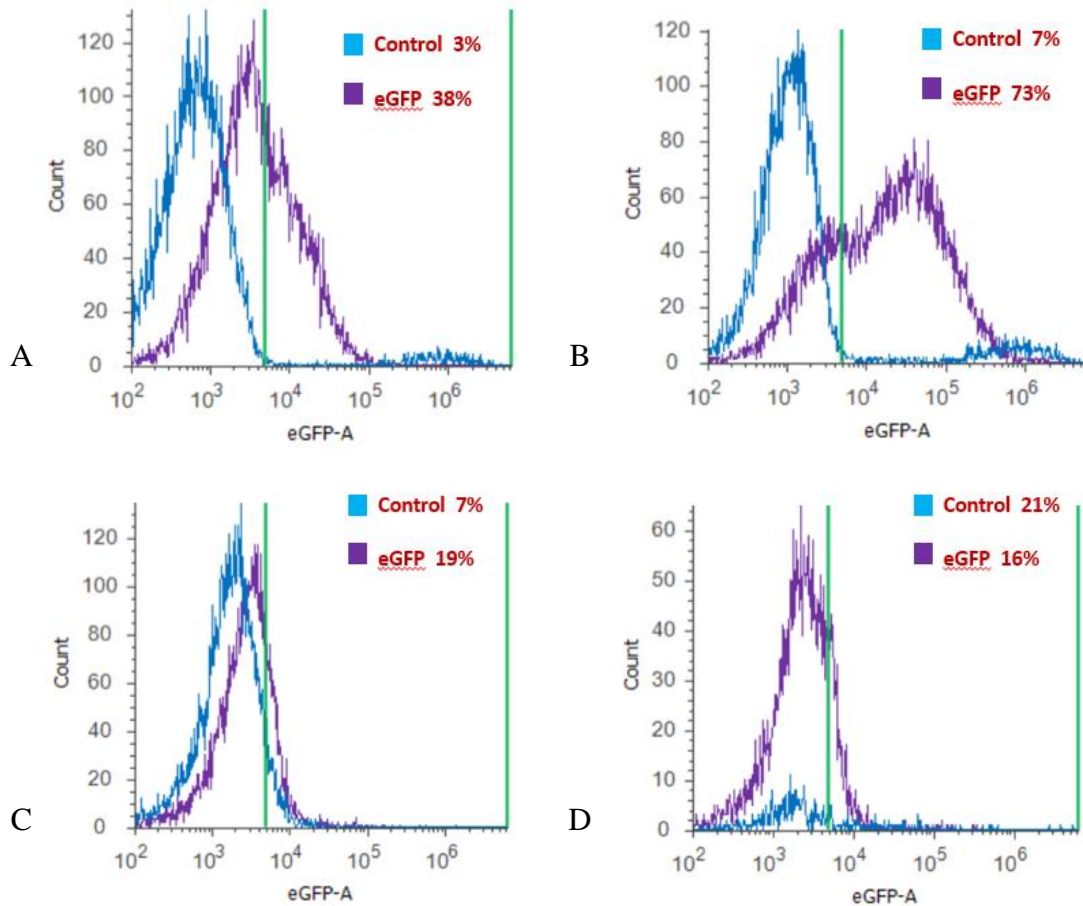


Figura 15. Histogramas de citometría de flujo de transducción de células MDA-231 y PBMC con pLJM1-eGFP. (A) Transducción de células MDA-231 por protocolo convencional. El grupo control presentó 3% de transducción y el grupo GFP+ presentó 38% de transducción. (B) Células MDA-231 protocolo spinoculación, grupo control 7% y grupo GFP+ 73%. (C) Células PBMC protocolo convencional, grupo control presentó 7% y grupo GFP+ 19%. (D) Células PBMC protocolo spinoculación, muestra grupo control con 21% y grupo GFP+ con 16 %.

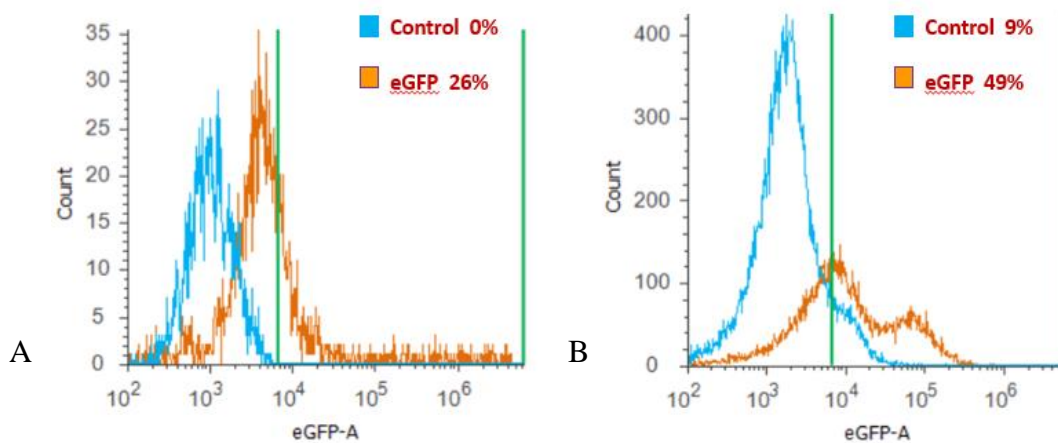


Figura 16. Análisis por citometría de flujo de transducción por spinoculación de células MDA-231 y PBMC con pLenti-CMV-GFP-Hygro. (A) Células MDA-231: grupo control no mostró transducción, grupo GFP+ reportó 26% de transducción. (B) Células PBMC: grupo control mostró 9% de transducción, y en comparación grupo GFP+ muestra 49%.

3.3 Efecto de miR-548x y miR1270 en genes asociados a osteoclastogénesis

De la transfección realizada en células 293T con pLenti-GFP, pLenti-miR548x y pLenti-miR1270, se realizó evaluación por citometría de flujo para GFP+ (Fig. 17), alcanzando una eficiencia de transfección del 44.01%. Se lisaron las células y se realizó la extracción de ARN, la concentración del ARN y la absorbancia a 260/280 nm fueron cuantificadas mediante espectrofotometría (Tabla 12), con el equipo Nanodrop LITE. La integridad y el tamaño de la distribución del ARN purificado se corroboraron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, posteriormente se realizó la síntesis de ADNc a partir de la retrotranscripción del ARN extraído.

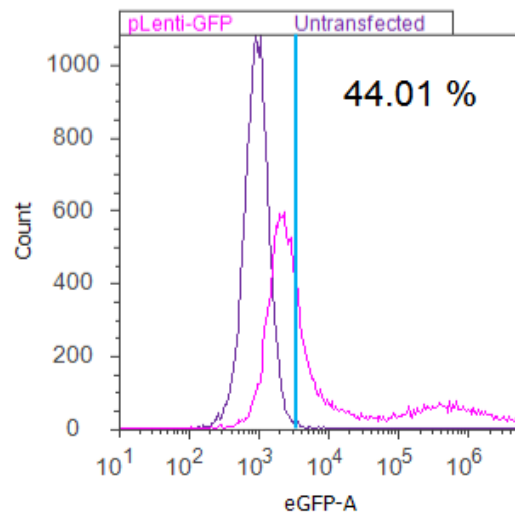


Figura 17. Histograma del análisis por citometría de flujo de la transfección de pLenti-GFP en células 293T, donde se obtiene un 44.01% de transfección de GFP+.

Tabla 12. Cuantificación de RNA total de células 293T transfectadas para ensayo de RT-qPCR

pLenti-GFP	pLenti-miR548x	pLenti-miR1270
A260/280 = 2.11 Concentración = 1169.3 ng/μL	A260/280 = 2.12 Concentración = 1308.8 ng/μL	A260/280 = 2.18 Concentración = 2336.8 ng/μL

Mediante el uso de qPCR en tiempo real, se estimó la expresión relativa de los genes asociados a la osteoclastogénesis a probar FOS1, GSK3B y CTSK con respecto al gen constitutivo HPRT. Los resultados señalan un cambio significativo ($p < 0.05$) en la expresión de FOS1 (Fig.18a) presentando un decremento de alrededor del 70 al 80% en su expresión ante miR548x y miR1270. Para GSK3B se muestra una tendencia a incrementar la expresión génica ante miR548x pero esta no es significativa. GSK3B ante miR1270 no

muestra diferencias significativas (Fig.18b). En cuanto a la expresión de ARNm de CTSK tampoco se muestra alguna diferencia significativa (Fig.18c).

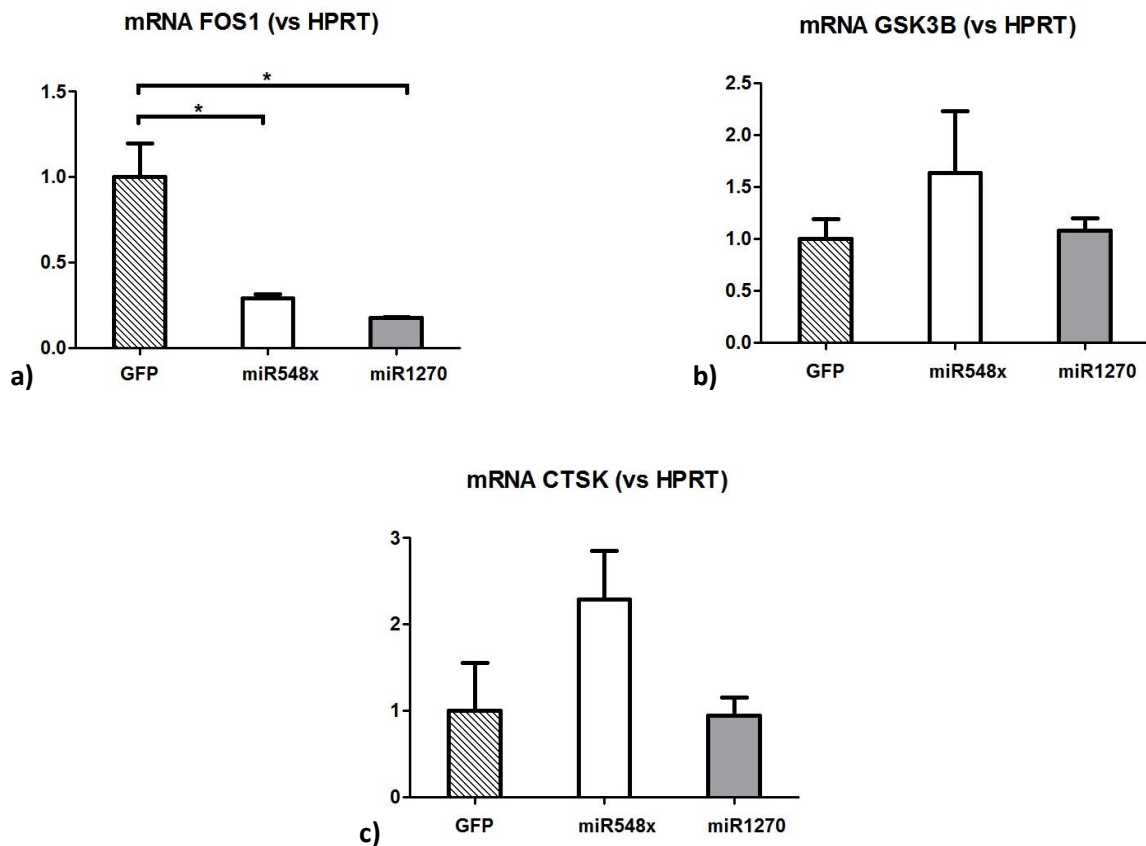


Figura 18. Efectos de miR548x y miR1270 sobre la expresión relativa de genes asociados a osteoclastos. (a) FOS1 muestra un decremento significativo ante los microRNA, (b) GSK3B muestra tendencia a incrementar sin mostrar cambios significativos, y para (c) CTSK no se encontraron cambios significativos. Prueba estadística ANOVA de una vía, y prueba de TUKEY para comparación múltiple (*Datos significativos $p < 0.05$).

3.4 Diferenciación de Osteoclastos

3.4.1 Ensayos en células PBMC y células THP-1

Una vez aisladas las células mononucleares de sangre periférica, se realizaron ensayos de diferenciación de osteoclastos. Se probaron concentraciones de 15000, 30000, 60000 y 120000 células PBMC estimuladas con M-CSF (50 ng/mL) y RANKL (100 ng/mL) incubadas a un periodo de 12 días, presentando bajo rendimiento celular por lo que no fue posible obtener osteoclastos.

Los precursores osteoclasticos denominados “monocitos” se encuentran en la sangre periférica circulante, representando del 10-20% de la población total de células mononucleares. Debido a su baja concentración en las células PBMC, se optó por realizar el aislamiento de células PBMC de un paquete de “Concentrado Leucocitario” obtenido en un banco de sangre. Se obtuvo la diferenciación a células tipo macrófago sin observar osteoclastos en la tinción TRAP.

Para mejorar la posibilidad de obtener osteoclastos se probó con células monocíticas de línea comercial THP-1 (ATCC), sembrando 83000 células por pozo en placa de 96 pozos en 200 μ L de medio RPMI. Se estimularon con PMA (100 ng/mL), M-CSF (50 ng/mL) y RankL (100 ng/mL) durante 12 días y se estableció un grupo control (Fig.19). Al final de este ensayo se lograron cambios morfológicos de las células THP-1 a células tipo macrófagos con capacidad de adherencia, sin obtener osteoclastos.

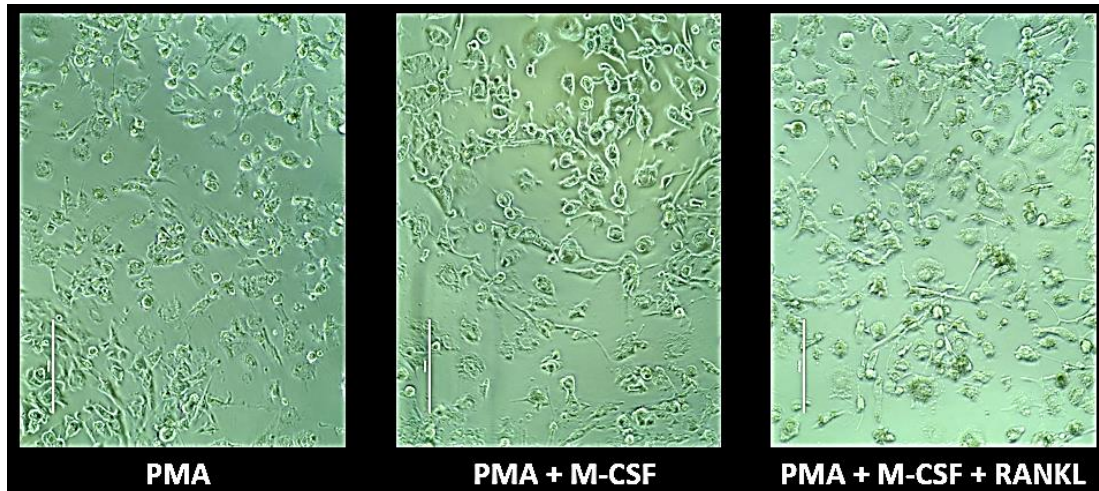


Figura 19. Células THP-1 al 12° día de estimulación con PMA, M-CSF y RANKL, donde se aprecia cambios morfológicos a células tipo macrófagos. Microscopia de campo claro 20x.

3.4.2 Células PBMC CD14 positivo

Los monocitos se caracterizan por su expresión fenotípica de CD14 y, por lo tanto, se denominan comúnmente monocitos CD14 +. Para enriquecer la población de precursores osteoclasticos se realizó una selección de las células aisladas mediante la tinción con anticuerpo CD14+ en células PBMC adherentes y no adherentes. Mediante citometría de flujo se determinó la cantidad de anticuerpo CD14+ necesario para la tinción, siendo esta de 31.25 ng para la tinción de 250000 células (Fig.20).

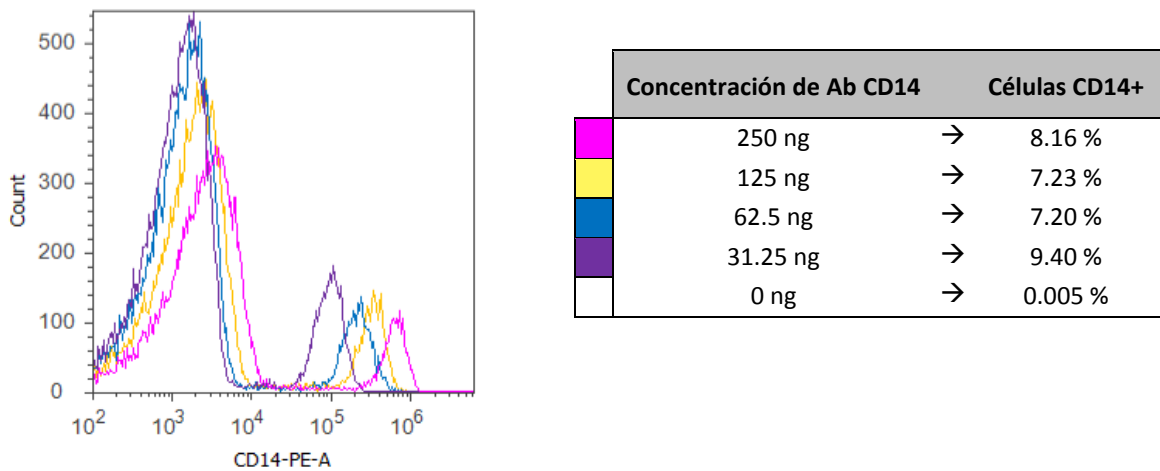


Figura 20. Titulación de anticuerpo CD14+ en células PBMC. Histograma de citometría de flujo muestra como una concentración de 31.25 ng de anticuerpo Ab CD14 tiñe el 9.40% de 250000 células PBMC.

Una vez determinada la concentración del anticuerpo requerida para la tinción, se realizó el aislamiento de células PBMC provenientes de sangre total y de concentrado leucocitario, las cuales se sometieron a un periodo de incubación de 1 y 2 horas para lograr la adherencia celular a placa (Fig.21).

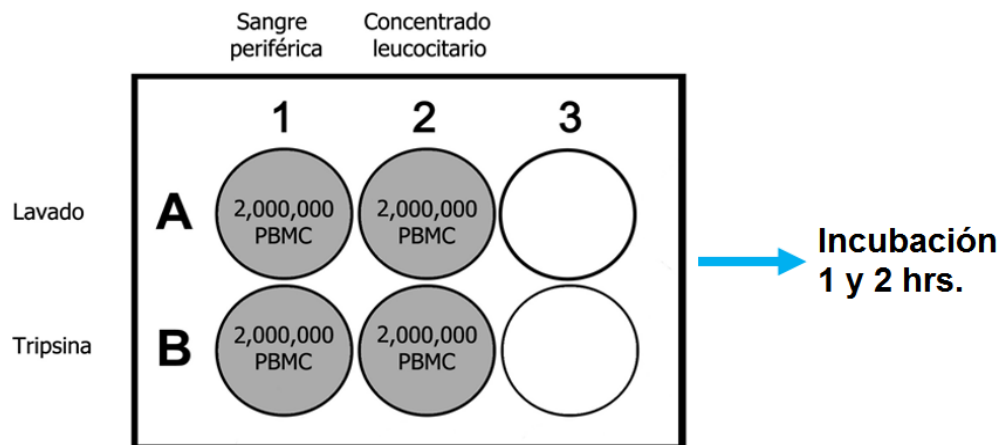


Figura 21. Ensayo de aislamiento de células PBMC adherentes para tinción con Ab CD14+.

Se descartó el sobrenadante y se cosecharon las células adherentes mediante lavado y por tripsinización. Ya teñidas las células se determinó por citometría de flujo que aproximadamente el 50% de células adherente sometidas a un periodo de incubación de 2 horas resultaron ser CD14 positivo (Tabla 13).

Tabla 13. Células PBMC con tinción CD14+ sometidas a incubación de 1 y 2 horas para adherencia a placa.

		1 hora % CD14 +	2 horas % CD14 +
Sangre Total	Lavado	4.44	22.7
	Tripsina	21.38	50.12
Concentrado Leucocitario	Lavado	22.01	47.55
	Tripsina	32.67	48.34

3.4.3 Diferenciación de osteoclastos a partir de células PBMC CD14+

Se realiza aislamiento de células PBMC CD14+ de concentrado leucocitario y se obtiene el 50.06% de células CD14+ analizado por citometría de flujo. Se realiza ensayo de diferenciación de osteoclastos sembrando concentraciones de 50000, 100000, 150000, 200000 células, estableciendo controles negativos. Las células PBMC se estimularon con M-CSF (50ng/mL) y RANKL (100 ng/mL) durante 18 días. Se observaron cambios morfológicos a células tipo macrófago (Fig.22). Al décimo octavo día se realizó la tinción TRAP y se observaron, por microscopia en campo claro, células con más de tres núcleos en su interior compatibles con el fenotipo de osteoclastos (Fig.23). Se visualizaron 72 osteoclastos en el pozo de 150 mil células y 154 osteoclastos en el pozo de 200 mil células.

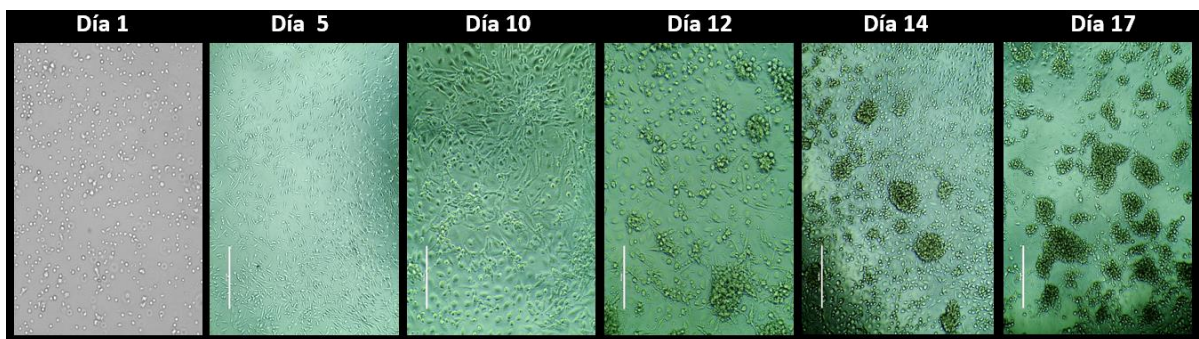


Figura 22. Células PBMC estimuladas con M-CSF y RANKL. Se observó el cambio morfológico y la formación de racimos celulares en un lapso de 18. Microscopia de campo claro 20x.

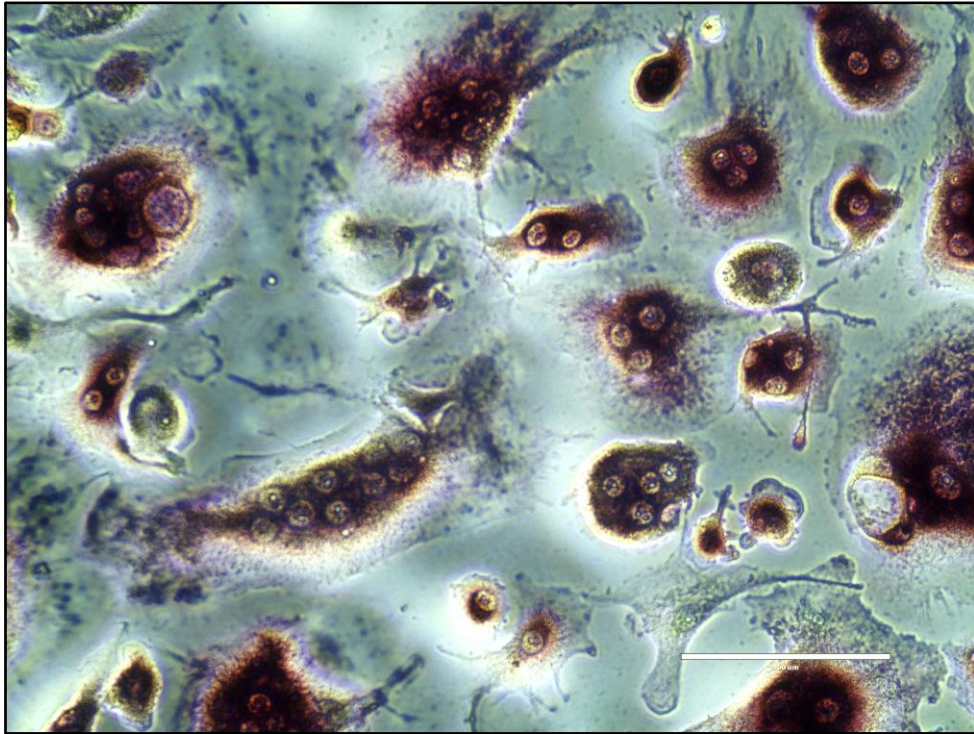


Figura 23. Tinción TRAP de osteoclastos donde se observan células con más de 3 núcleos en su interior. Microscopia en campo claro, 40x.

Se realizó un segundo ensayo de diferenciación de osteoclastos a partir del aislamiento de células PBMC de concentrado leucocitario, donde se sembraron concentraciones de 200 mil y 250 mil células por pozo en placa de 96 pozos estimulados con M-CSF y RANKL. Se extendió el periodo de incubación y se realizó la tinción TRAP al día 33. Por microscopia de campo claro se logró identificar la presencia de osteoclastos, aunque estos fueron pocos en número comparado con el ensayo previo, visualizando solamente 5 osteoclastos en los pozos de 200 mil células y 35 osteoclastos en los pozos de 250 mil células.

Capítulo 4. Discusión

4.1 Subclonación de miR1270 y miR548x en un vector lentiviral

El procedimiento inicial fue directo, la estrategia de subclonación requirió el diseño y síntesis de las secuencias de oligonucleótidos cebadores, la cual se realizó mediante el empleo de la herramienta de ensamble de New England Biolabs usando las secuencias de nuestros microRNAs, y como plásmido inicial a pLJM1-eGFP y como enzimas de restricción a Nhe1/EcoR1, los cuales ya se encontraban a nuestra disposición, representando ahorro en tiempo y dinero.

Este primer conjunto de oligos funcionaron correctamente al realizar la amplificación por PCR de los fragmentos a subclonar, corroborando la inclusión de nuestras secuencias de interés mediante electroforesis en gel de agarosa, observando las bandas esperadas alrededor de los 500 pares de bases. Posteriormente al realizar la reacción de ensamble de Gibson no se obtuvo éxito al realizar la transformación en células competentes ya que no hubo crecimiento de colonias en la placa y la eficiencia de transformación fue muy baja 2×10^8 ufc/ μ g.

Considerando los problemas presentados se realizó una amplificación por PCR de las secuencias de nuestros oligos qmiR-1270 y qmiR-548x utilizando como plantilla de ADN: H₂O, ADN genómico y los productos de PCR (fragmentos a subclonar). Los productos de amplificación se validaron al presentarse las bandas esperadas para miR-1270 de 130 pares de bases y para miR548x de 231 pares de bases. Suponiendo que se puede descartar cualquier cosa posterior a la transformación, mi mejor conjetura es que no hay suficiente producto deseado, hay suficiente para una señal positiva de la PCR, pero no lo suficiente para la transformación. Otros aspectos a considerar por este fallo es la formación de estructuras secundarias por el traslape; y también habría que ver el estado de las células competentes y determinar si es que son funcionales.

Aunado a esto nuestro abastecimiento de enzima de restricción EcoI para linearizar más plásmido era casi nulo, por lo que se decidió aprovechar otro plásmido funcional que ya teníamos “pLenti-GFP” para el cual se diseñaron nuevos oligos, los cuales se validaron mediante PCR y electroforesis. Con los nuevos oligos y el nuevo plásmido ya linearizado se pudo llevar a cabo la reacción de ensamble y la transformación con éxito como se mencionó en los resultados. Se pudo determinar por PCR de colonias la presencia de nuestro inserto y se pudo confirmar por secuenciación Sanger, hecho que se pudo considerar como un

acontecimiento muy afortunado ya que solo se pudo obtener una unidad formadora de colonia para cada uno de nuestros ensambles.

4.2 Transfección y transducción

La transfección es el proceso de inserción de material genético, como el ADN en células de mamíferos. La inserción de ADN permite la expresión o producción de proteínas utilizando la maquinaria propia de las células. Esta poderosa herramienta ha permitido a los investigadores estudiar mejor la función y expresión de los genes, la función de las proteínas y las mutaciones genéticas.

Ningún reactivo único o método de transfección funciona para todos los tipos de células. Afortunadamente, se han desarrollado muchos métodos y reactivos para facilitar la transfección de una amplia variedad de células. Nosotros abordamos dos sistemas de administración química en nuestro proyecto: los métodos basados en lípidos que transfieren material genético a la célula mediante liposomas, que son vesículas que se pueden fusionar con la membrana celular debido a su composición por fosfolípidos; y la transfección mediada por fosfato de calcio que involucra mezclar el ADN con cloruro de calcio y después agregarlo de manera controlada a una solución fosfato a temperatura ambiente generando precipitados que una vez dispersos en las células diana serán internalizados por endocitosis o fagocitosis.

Los ensayos se enfocaron en transfectar plásmidos directamente o de plásmidos que forman un sistema lentiviral para la producción de partículas lentivirales. Para las células 293T todos los ensayos mostraron presencia de GFP+ al ser visualizados por microscopia de fluorescencia. Al ser evaluados por citometría de flujo la tasa de transfección por lipofectamina fue desde 39.07% la más baja a 76.89% la más alta. Para los ensayos sometidos al método que utilizó fosfato de calcio osciló de 32.39% a 54.88% de transfección.

Adicionalmente se realizaron diversos ensayos de transfección en células PBMC, THP-1, Hela, PC3 y DU145 por el método de fosfato de calcio, donde se observó poca fluorescencia en células Hela y nula en las demás. Por citometría de flujo se pudieron valorar células transfectadas PBMC y THP-1 las cuales mostraron una tasa de transfección por debajo del 2.04% y 14.10%, respectivamente, mostrándose ser difíciles de transfectar.

A mi criterio es evidente las ventajas que proporciona la transfección mediante el uso de lípidos ya que facilita la entrega del contenido genético a la célula con gran eficiencia y es de fácil implementación, aunque debemos considerar la relación costo-efectividad que favorece a la transfección por fosfato de calcio ya que esta es menos costosa, por lo contrario este método requiere de mayor cuidado y preparación en el momento de hacer los precipitados, también está sujeta a que pequeños cambios en el pH puede comprometer su eficiencia, aunque en la literatura se han reportado tasas por encima del 90%.

Los ensayos de transducción se llevaron a cabo utilizando un sistema lentiviral de tercera generación donde se utilizan cuatro plásmidos que son transfectados a células 293T donde las partículas virales serán ensambladas y los lentivirus se liberan al medio extracelular del cual es recuperado y posteriormente pueden ser transducidas a células diana. Nosotros valoramos dos protocolos para realizar la transducción, un método convencional y uno por spinoculación el cual requiere de una centrifugación previa a ser depositados en las células diana a transducir.

En los ensayos realizados se vio una clara ventaja al transducir células PBMC con pLenti-GFP comparado con pLJM1-eGFP, mostrando 49% de tasa de transducción para el primero contra solamente el 16% del último, ambos mediante el método de spinoculación. Este resultado parece ser dependiente del tipo de plásmido utilizado, pero de nueva cuenta vemos que las células PBMC no son fáciles de transducir. En contraste para las células MDA231 se dio una mayor eficiencia de transducción (73%) para pLJM1-eGFP ante pLenti-GFP, ambos por spinoculación. Otras líneas celulares como DU145, HeLa, PC3 se mostraron receptivas a la transducción con partículas lentivirales por el método de spinoculación mostrando ser GFP+ a la visualización por microscopia de fluorescencia, estos ensayos no se pudieron finalizar por desperfectos técnicos en el equipo, más sería interesante haber tenido la oportunidad de realizar estos ensayos de manera completa y haber estimado la eficiencia de transducción de GFP por citometría de flujo.

4.3 Efecto de miR-548x y miR1270 en genes asociados a osteoclastogénesis

Los microRNA, pueden tener importantes impactos sobre la osteoclastogénesis y la patogénesis de las diversas enfermedades que afectan a la remodelación ósea. Los estudios han identificado varios microRNAs que juegan un papel en la diferenciación y función de osteoblastos y osteoclastos; sin embargo, como los microRNAs han sido estudiados por solo un corto período de tiempo hasta el momento, se necesitan más investigaciones sobre la identificación y caracterización de los microRNAs adicionales. En

este proyecto se procuró caracterizar la funcionalidad de miR548x y miR1270 ya que se encontraron sobre expresados en pacientes con osteoporosis por lo que se consideró que pudieron tener un efecto regulatorio en la osteoclastogénesis.

Para poder evaluar dicha conjetura los genes blanco de mir-548x y miR1270 fueron identificados y se buscó cuáles presentaban inherencia regulatoria en el proceso de la formación de osteoclastos. Se decidió evaluar la expresión génica de FOS1, GSK3B y CTSK con respecto a HPRT en diversas líneas celulares ante el efecto de miR548x y miR1270 mediante el análisis de qPCR en tiempo real.

Mediante un panel celular (RT-qPCR) se valoró cuales líneas celulares mostraban buena amplificación para la expresión de FOS1 (HeLa, 293T, PC3), GSK3B (PC3, 2937) y CTSK (DU145 y PC3). Se realizó la transducción con partículas lentivirales según corresponde, mas debido a causas ajenas a nosotros, nuestros cultivos celulares no proliferaron, por lo que no se pudo realizar la extracción de ARN. Finalmente se realizó una transfección a células 293T, seguido de la extracción del ARNm y reversotranscripción para obtener ADNc. Se efectuó una RT-qPCR para valorar el efecto de miR548x y miR1270 en los genes asociados a osteoclastogénesis. Los datos obtenidos no mostraron los resultados esperados. Curiosamente para la expresión del ARNm de FOS1 se presentó un decremento significativo ($p < 0.05$). Mientras que la expresión de GSK3B y CTSK no reflejaron cambios importantes. Ante estos resultados se deberán evaluar la expresión de otros genes asociado a la remodelación ósea que por ahora no se pudieron contemplar.

4.4 Diferenciación de osteoclastos

La diferenciación de monocitos a osteoclastos multinucleados es un proceso complejo afectado por varios genes y factores de transcripción diferentes. Como se ha mencionado varias afecciones patológicas surgen de la falta de equilibrio entre la función de los osteoblastos, formando hueso y osteoclastos que resorben el hueso. En este estudio nos enfocamos en la diferenciación de osteoclastos a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

Para obtener células PBMC se realizaron varios ensayos derivados de protocolos reportados en la literatura. Mediante el uso de un gradiente de densidad, de la sangre de donadores, se aisló la capa leucocitaria donde obtuvimos las células PBMC para realizar en diversas ocasiones ensayos de diferenciación. Estas células PBMC se cultivaron en medio RPMI 1640 siendo estimuladas con M-CSF 50ng/mL para lograr la diferenciación a células tipo macrófagos, lo que requirió de 2 a 4 días y

adicionalmente se estimularon con RANKL a razón de 100ng/mL durante 13 días para lograr la diferenciación a osteoclastos.

Una de las dificultades presentadas fue que aunque el número de células adquiridas durante el aislamiento parecía bueno, no lo era ya que las células monocíticas, que son las que tienen el potencial de diferenciación, tan solo conforman del 10 al 20% de las células PBMC. Debido a esto se buscó la forma de enriquecer la población de células monocíticas, por lo cual se optó por realizar el aislamiento de paquetes de concentrado leucocitario obtenido de un banco de sangre de la localidad con la intención de poder obtener una mayor cantidad de células monocíticas. Sin embargo los ensayos de diferenciación realizados continuaban sin presentar osteoclastos al momento de realizar la tinción TRAP, por lo que quedaba en duda cuál sería el error en el proceso del experimento.

Zhuo Hao Li et al., (2017) refieren el haber diferenciado células THP-1 (línea monocítica de ATCC) a osteoclastos, por lo que intentamos reproducir su experimento, logrando solamente la diferenciación a células tipo macrófago. Al buscar experiencias de otros investigadores con el uso de células THP-1 para los mismos fines en plataformas como *Researchgate* se hizo evidente que esta es una diferenciación complicada y al parecer no hay otras personas que lo hayan logrado hasta ahora.

Se sugiere utilizar un kit de selección comercial para monocitos CD14+, el cual no estaba a nuestro alcance por cuestiones económicas, en su lugar se empleó una tinción de anticuerpo CD14+ y la selección por adhesión a placa posterior a la cosecha inicial de células PBMC. Se analizaron las células por citometría de flujo y se encontró que las células tras un periodo de incubación/adhesión de 2 horas mostraron ser CD14+ en alrededor del 50%. Se realizó un nuevo ensayo de diferenciación de osteoclastos partiendo de células PBMC CD14+ seleccionadas por el método previo, la diferenciación celular se logró al décimo octavo día observando osteoclastos en la tinción TRAP. Los resultados fueron reproducibles en un segundo ensayo con células PBMC CD14+.

Cabe destacar la importancia de realizar una buena selección de monocitos CD14+ para lograr la diferenciación de estas células. Por los resultados obtenidos estimamos que la mitad de los PBMC llevados a cultivo son células monocíticas CD14+ con capacidad de diferenciación, por lo que de utilizar un kit de selección pudiéramos incrementar la pureza del cultivo.

Capítulo 5. Conclusiones

La complejidad multifactorial de los efectos regulatorios que ejercen los microRNA en los procesos homeostáticos de la remodelación ósea nos conduce a seguir indagando en cuanto a su funcionalidad con la esperanza de que los microRNAs investigados pueden desempeñar un papel crucial en la osteoclastogénesis y, por lo tanto, en la enfermedad de resorción ósea, proporcionando una base para investigaciones adicionales sobre dianas de ARNm, patogénesis de la enfermedad y posiblemente dianas terapéuticas futuras

Aunque en este momento los datos obtenidos no conducen a mostrar efectos notables en la acción de miR548x y miR1270 en la osteoclastogénesis, esto no significa que no existan, y la investigación futura puede determinar los objetivos relacionados con osteoclastos de estos microRNAs. Los microRNAs se dirigen a los ARNm múltiples, y un ARNm dado puede ser un objetivo para los múltiples microRNAs. Esto se debe a la complementariedad parcial con la que los microRNAs se unen a sus dianas, y como se trata de una secuencia de nucleótidos corta, impone un desafío a la identificación de los genes diana.

Encontramos dificultades para poder realizar el ensamble de nuestras secuencias de interés con pLJM1-eGFP como plásmido linearizado, lo que requirió el diseñar nuevos cebadores y cambiar el plásmido a linearizar por pLenti-PURO logrando de esta manera el ensamble y la posterior transformación que nos condujo a obtener los plásmidos que incluye las secuencias de nuestros microRNAs como inserto.

Se realizó la subclonación en un vector lentiviral y transducirlo a diversas líneas celulares como 293T, HeLa, DU145 y PC3. Se deben considerar alternativas para facilitar la transfección y/o transducción empleando diferentes sistemas como es el uso de retrovirus o emplear secuencias más cortas de nucleótidos como es el caso del ARN corto de interferencia.

Para obtener buena tasa de transducción es necesario la búsqueda de células que sean altamente transducibles. En nuestra investigación notamos que las células PBMC son difíciles de transducir, por lo que habrá que probar en estancias futuras diferentes técnicas de transducción, como podría ser el uso de la transducción con centrifugación lenta.

En relación a la obtención de precursores osteoclastos se requiere un óptimo aislamiento de células PBMC, por lo que considero indispensable la implementación de métodos alternativos, tales como el

enriquecimiento de Monocitos CD14+ mediante kits de selección positiva, para facilitar el desarrollo de proyectos futuros.

Deben considerarse formas alternas para analizar el efecto de miR5458x y miR1270 en modelos in vitro que empleen células osteoclásticas de hueso fresco humano en lugar de utilizar líneas de células óseas ya que proporciona un escenario más cercano al fisiopatológico y por lo tanto, puede ser más adecuado traducir esta investigación al campo clínico; y finalmente se podrían emplear modelos in vivo evaluando el efecto de los microRNAs mediante el uso de un antagomir en modelos murinos y/o humanos que sobrepresan los microRNAs de interés.

Literatura citada

- Abdallah, B. M., Jafari, A., Zaher, W., Qiu, W., Kassem, M. (2015). Skeletal (stromal) stem cells: an update on intracellular signaling pathways controlling osteoblast differentiation. *Bone*, 70, 28-36. doi:10.1016/j.bone.2014.07.028
- Almeida, M. I., Reis, R. M., Calin, G. A. (2011). MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 717(1), 1-8. doi:10.1016/j.mrfmmm.2011.03.009
- Brennan, M. A., Gleeson, J. P., Browne, M., O'Brien, F. J., Thurner, P. J., McNamara, L. M. (2011). Site specific increase in heterogeneity of trabecular bone tissue mineral during estrogen deficiency. *European cells and materials*, 21, 396-406.
- Bruderer, M., Richards, R. G., Alini, M., & Stoddart, M. J. (2014). Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis. *European cells and materials*, 28(269), e286.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035
- Cauley, J. A., Robbins, J., Chen, Z., Cummings, S. R., Jackson, R. D., LaCroix, A. Z., LeBoff, M., Lewis, C. E., McGowan, J., Neuner, J., Pettinger, M., Stefanick, M., Wactawski, J., Watts, N., (2003). Effects of estrogen plus progestin on risk of fracture and bone mineral density: the Women's Health Initiative randomized trial. *Journal of the American Medical Association*, 290(13), 1729-1738. doi:10.1001/jama.290.13.1729
- Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.
- Colaiani, G., Brunetti, G., Faienza, M. F., Colucci, S., Grano, M. (2014). Osteoporosis and obesity: Role of Wnt pathway in human and murine models. *World journal of orthopedics*, 5(3), 242. doi:10.5312/wjo.v5.i3.242
- Currey, J. D. (2012). The structure and mechanics of bone. *Journal of Materials Science*, 47(1), 41-54.
- Dillon, J. P., Waring-Green, V. J., Taylor, A. M., Wilson, P. J., Birch, M., Gartland, A., Gallagher, J. A. (2012). Primary human osteoblast cultures. In *Bone research protocols* (pp. 3-18). Humana Press, Totowa, NJ.
- Neele, S. J., Evertz, R., Genazzani, A. R., Luisi, M., Netelenbos, C. (2002). Raloxifene treatment increases plasma levels of β -endorphin in postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study. *Fertility and sterility*, 77(6), 1110-1117. doi:10.1016/S0015-0282(02)03108-4

- Felsenberg, D., Boonen, S. (2005). The bone quality framework: determinants of bone strength and their interrelationships, and implications for osteoporosis management. *Clinical therapeutics*, 27(1), 1-11. doi:10.1016/j.clinthera.2004.12.020
- Gentili, C., Cancedda, R. (2009). Cartilage and bone extracellular matrix. *Current pharmaceutical design*, 15(12), 1334-1348. doi:10.2174/138161209787846739
- Griffith, J. F., Genant, H. K. (2008). Bone mass and architecture determination: state of the art. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 22(5), 737-764. doi:10.1016/j.beem.2008.07.003
- Goldring, S. R., Goldring, M. B. (2007). Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. *Nature medicine*, 13(2), 133.
- Hall, J., Guyton, A. (2011). *Textbook of Medical Physiology* (12th Ed.). Philadelphia: Elsevier, pp. 957–960.
- Holroyd, C., Cooper, C., & Dennison, E. (2008). Epidemiology of osteoporosis. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*, 22(5), 671-685. doi: 10.1016/j.beem.2008.06.001
- Kanis, J. A., Melton III, L. J., Christiansen, C., Johnston, C. C., Khaltsev, N. (1994). The diagnosis of osteoporosis. *Journal of bone and mineral research*, 9(8), 1137-1141. doi: 10.1002/jbmr.5650090802
- Kini, U., & Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In *Radionuclide and hybrid bone imaging* (pp. 29-57). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Krzyszinski, J.Y., Wei, W., Huynh, H., Jin, Z., Wang, X., Chang, T.C., Xie, X.J., He, L., Mangala, L.S., Lopez-Berestein, G. and Sood, A.K. (2014). miR-34a blocks osteoporosis and bone metastasis by inhibiting osteoclastogenesis and Tgif2. *Nature*, 512(7515), p.431.
- Li, D., Liu, J., Guo, B., Liang, C., Dang, L., Lu, C., He, X., Cheung, H.Y.S., Xu, L., Lu, C. and He, B. (2016). Osteoclast-derived exosomal miR-214-3p inhibits osteoblastic bone formation. *Nature communications*, 7, p.10872.
- Li, Z.H., Si, Y., Xu, G., Chen, X.M., Xiong, H., Lai, L., Zheng, Y.Q. and Zhang, Z.G. (2017). High-dose PMA with RANKL and MCSF induces THP-1 cell differentiation into human functional osteoclasts in vitro. *Molecular medicine reports*, 16(6), 8380-8384. doi:10.3892/mmr.2017.7625
- Lerner, U. H. (2006). Bone remodeling in post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research*, 85(7), 584-595. doi: 10.1177/154405910608500703
- Mann, M., Barad, O., Agami, R., Geiger, B., & Hornstein, E. (2010). miRNA-based mechanism for the commitment of multipotent progenitors to a single cellular fate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(36), 15804-15809. doi:10.1073/pnas.0915022107

- McNamara, L. M. (2011). Bone as a Material. Ducheyne P (ed) *Comprehensive Biomaterials*, vol 2. Elsevier, pp 169-186
- Mullen, C. A., Haugh, M. G., Schaffler, M. B., Majeska, R. J., McNamara, L. M. (2013). Osteocyte differentiation is regulated by extracellular matrix stiffness and intercellular separation. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*, 28, 183-194. doi:10.1016/j.jmbbm.2013.06.013
- Raggatt, L. J., Partridge, N. C. (2010). Cellular and molecular mechanisms of bone remodelling. *Journal of Biological Chemistry*. 285 (33): 25103-25108. doi:10.1074/jbc.R109.041087
- Riggs, B. L., Khosla, S., Melton III, L. J. (2002). Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocrine reviews*, 23(3), 279-302. doi:10.1210/edrv.23.3.0465
- Rizzoli, R., Yasothan, U., Kirkpatrick, P. (2010). Denosumab. *Nature Reviews Drug Discovery*, 9(8), 591-593.
- Saag, K.G., Zanchetta, J.R., Devogelaer, J.P., Adler, R.A., Eastell, R., See, K., Krege, J.H., Krohn, K. and Warner, M.R. (2009). Effects of teriparatide versus alendronate for treating glucocorticoid-induced osteoporosis: Thirty-six-month results of a randomized, double-blind, controlled trial. *Arthritis & Rheumatism: Official Journal of the American College of Rheumatology*, 60(11), 3346-3355. doi:10.1002/art.24879
- Shin, K.J., Wall, E.A., Zavzavadjian, J.R., Santat, L.A., Liu, J., Hwang, J.I., Rebres, R., Roach, T., Seaman, W., Simon, M.I. and Fraser, I.D. (2006). A single lentiviral vector platform for microRNA-based conditional RNA interference and coordinated transgene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(37), 13759-13764. doi:10.1073/pnas.0606179103
- Standring, S., Gray, H. (2014). *Gray's anatomy: The anatomical basis of clinical practice* (41th Ed.). Edinburgh: Churchill Livingstone/Elsevier.
- Sugatani, T., Hruska, K. A. (2007). MicroRNA-223 is a key factor in osteoclast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, 101(4), 996-999. doi:10.1002/jcb.21335
- Susa, M., Luong-Nguyen, N. H., Cappellen, D., Zamurovic, N., Gamse, R. (2004). Human primary osteoclasts: in vitro generation and applications as pharmacological and clinical assay. *Journal of translational medicine*, 2(1), 6. doi:10.1186/1479-5876-2-6
- Tortora, G., Derrickson, B. (2014). *Principles of Anatomy and Physiology* (14th Ed.). Wiley, pp. 169-191.
- Zanchetta, J.R., Bogado, C.E., Ferretti, J.L., Wang, O., Wilson, M.G., Sato, M., Gaich, G.A., Dalsky, G.P. and Myers, S.L. (2009). Effects of teriparatide [recombinant human parathyroid hormone (1–34)] on cortical bone in postmenopausal women with osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(3), 539-543. doi:10.1359/jbmr.2003.18.3.539

Zanchetta, J., et al., (2012) The latin America regional audit. Epidemiology, costs and burden of osteoporosis in 2012. International Osteoporosis Foundation. p.45-52

Anexos

Anexo 1a. Secuenciación pLenti-miR1270

```

seq-miR1270      1  -----AGTGA-CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT
pLenti-miR1270 3841 ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT

seq-miR1270      41  TTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTCCCCAGTAGCTGAGATTACAGGTGCCATGACT
pLenti-miR1270 3901 TTGACCTCCATAGAAGACACCGACTCTCCCCAGTAGCTGAGATTACAGGTGCCATGACT

seq-miR1270     101  AAGCCTGGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATCTGGCCAGGCT
pLenti-miR1270 3961 AAGCCTGGCTAATTTTTTGTATTTTTAGTAGAGATGGGGTTTCACCATCTGGCCAGGCT

seq-miR1270     161  GGTCTTGAACCTCCTGACCTCAAGTGATTACCCACATCTGCCTCCCAAAGTGTGGGTTT
pLenti-miR1270 4021 GGTCTTGAACCTCCTGACCTCAAGTGATTACCCACATCTGCCTCCCAAAGTGTGGGTTT

seq-miR1270     221  ACAGACACAAGCCACCACACCAGGCCAATAATTTACTTTTAAAGGCACAGAGTTATACTG
pLenti-miR1270 4081 ACAGACACAAGCCACCACACCAGGCCAATAATTTACTTTTAAAGGCACAGAGTTATACTG

seq-miR1270     281  GAGATATGGAAGAGCTGTGTTGGGTATAAGTAACAGGCTTTTCTTTATCTTCTATGTGGC
pLenti-miR1270 4141 GAGATATGGAAGAGCTGTGTTGGGTATAAGTAACAGGCTTTTCTTTATCTTCTATGTGGC

seq-miR1270     341  TCTTTGCATTGTGCTCACCTGGGACCCTTCACACACTTAATTCACTTATACATTTTTTAC
pLenti-miR1270 4201 TCTTTGCATTGTGCTCACCTGGGACCCTTCACACACTTAATTCACTTATACATTTTTTAC

seq-miR1270     401  AAATTGTATTTTGGTCAGTATGTTTTTGTACATTTATATGTCCAGGAAGAAATTACAGC
pLenti-miR1270 4261 AAATTGTATTTTGGTCAGTATGTTTTTGTACATTTATATGTCCAGGAAGAAATTACAGC

seq-miR1270     461  TTGTGGTATTTTGCCATGTCATCTTCCTTAGGTAGTCTGTGAAATTTTATAGGTTAGATT
pLenti-miR1270 4321 TTGTGGTATTTTGCCATGTCATCTTCCTTAGGTAGTCTGTGAAATTTTATAGGTTAGATT

seq-miR1270     521  TGTAATAATATATTTATCTGAGTC-AGCACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA
pLenti-miR1270 4381 TGTAATAATATATTTATCTGAGTCTAGCACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAA
seq-miR1270     580  GATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA
pLenti-miR1270 4441 GATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAA

seq-miR1270     640  TGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCCTATGGCTTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAAT
pLenti-miR1270 4501 TGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCCTATGGCTTTTCAATTTCTCCTCCTTGTATAAAT

seq-miR1270     700  CCTGGTTGCTGTCTCTTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT
pLenti-miR1270 4561 CCTGGTTGCTGTCTCTTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGT

seq-miR1270     760  GCACTGTGTTTG-----
pLenti-miR1270 4621 GCACTGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCC

```

Anexo 1b. Secuenciación pLenti-miR548x

seq-miR548x	1	-----TTTAGTGA-CCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT
pLenti-miR548x	3841	ATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTT
seq-miR548x	44	TTGACCTCCATAGAAGACACCGACTTCCTAGAAATCATTTTGTATATAATATGTCCTTTG
pLenti-miR548x	3901	TTGACCTCCATAGAAGACACCGACTTCCTAGAAATCATTTTGTATATAATATGTCCTTTG
seq-miR548x	104	GATTTCCATATAAAATTTAGAATTAGCTTAACAATTTCTACAAAGAACTCTGCTACAATT
pLenti-miR548x	3961	GATTTCCATATAAAATTTAGAATTAGCTTAACAATTTCTACAAAGAACTTTGCTACAATT
seq-miR548x	164	GTTTTTTAAATATGCATTGAACATATAGATCAATTTGGGGAGAGATACTATCATAACAAC
pLenti-miR548x	4021	GTTTTTTAAATATGCATTGAACATATAGATCAATTTGGGGAGAGATACTATCATAACAAC
seq-miR548x	224	ATTAAGCCTTCCAATCTGTAATCACATTATACATTGCAATATATTAGGTTAGTGCAAAAAG
pLenti-miR548x	4081	ATTAAGCCTTCCAATCTGTAATCACATTATACATTGCAATATATTAGGTTAGTGCAAAAAG
seq-miR548x	284	TAATTGCAGTTTTTGC GTTACTTTCAATCGTAAAAACTGCAATTACTTTCACACCAATCT
pLenti-miR548x	4141	TAATTGCAGTTTTTGC GTTACTTTCAATCGTAAAAACTGCAATTACTTTCACACCAATCT
seq-miR548x	344	TAATATTTTCGATCTTGTTTTATTTTTCTCAGCAAAGTTTTGAAGATTTTCAGTAAACAGT
pLenti-miR548x	4201	TAATATTTTCGATCTTGTTTTATTTTTCTCAGCAAAGTTTTGAAGATTTTCAGTAAACAGT
seq-miR548x	404	ATGGCATAACATTATGCTAAGTTTATTCCTGTGTTTCATGTTTTTAACGTTACTACTAATGG
pLenti-miR548x	4261	ATGGCATAACATTATGCTAAGTTTATTCCTGTGTTTCATGTTTTTAACGTTACTACTAATGG
seq-miR548x	464	CATGTGTTGTATTAATTTTTATCTTTCTCATATTGCATTGGCAAGAATGTTGATGCAATA
pLenti-miR548x	4321	CATGTGTTGTATTAATTTTTATCTTTCTCATATTGCATTGGCAAGAATGTTGATGCAATA
seq-miR548x	524	TTGAATTTTCAGTGGTTAGACCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACT
pLenti-miR548x	4381	TTGAATTTTCAGTGGTTAGACCAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACT
seq-miR548x	584	GGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG
pLenti-miR548x	4441	GGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG
seq-miR548x	644	TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTGTATAAAATCCTGGTTG
pLenti-miR548x	4501	TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTGTATAAAATCCTGGTTG
seq-miR548x	704	CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTG
pLenti-miR548x	4561	CTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTG
seq-miR548x	764	TTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
pLenti-miR548x	4621	TTTGCTGACGCAACCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGG
seq-miR548x	824	ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCA-----
pLenti-miR548x	4681	ACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACATCGCCGCCTGCCTTGCCCCG