

UNIVERSIDAD DE LA FRONTERA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS Y FORESTALES



**INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR MEDIADA POR
LA INTERFERENCIA DEL ARN MITOCONDRIAL NO
CODIFICANTE ANTISENTIDO EN CÉLULAS DE
HEPATOCARCINOMA MURINO**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Agropecuarias y Forestales de la Universidad de La Frontera. Como parte de los requisitos para optar al título de Biotecnólogo.

CONSTANZA DANIELLA PINOCHET BAIER
PROFESOR GUÍA: DR. MANUEL VARAS GODOY.

SANTIAGO-CHILE
2012

“INDUCCIÓN DE MUERTE CELULAR MEDIADA POR LA INTERFERENCIA DEL
ARN MITOCONDRIAL NO CODIFICANTE ANTISENTIDO EN CÉLULAS DE
HEPATOCARCINOMA MURINO”

PROFESOR GUÍA

: _____

Dr. Manuel Varas Godoy
Investigador Postdoctoral
Fundación Ciencia & Vida

PROFESOR CONSEJERO

: _____

Mg. Favián Treulen Seguel
Fac. de Cs Agropecuarias y Forestales
Universidad de La Frontera

CALIFICACIÓN PROMEDIO TESIS

: _____

Dedicado a todas las personas que poseen pedacitos de mí...

.... Gracias por volverme un ser completo.

AGRADECIMIENTOS

Es difícil comenzar a dar las gracias cuando se siente que existen muchas personas a las cuales se debe agradecer, pero quisiera comenzar agradeciendo principalmente al Dr. Manuel Varas Godoy por haberme dado la oportunidad de trabajar en esta tesis, por la dedicación, la paciencia y la confianza entregada durante este periodo de mi vida tan significativo. Este trabajo no habría sido posible sin su ayuda y por lo mismo quiero partir agradeciéndoselo a él.

En segundo lugar quisiera tomarme mi tiempo para agradecer a mi familia, la cual siempre ha estado ahí apoyándome en todas mis decisiones y dándome la fuerza necesaria para seguir luchando todos los días, sin ella no sería ni la mitad de la persona que soy ahora y es gracias a ella que hoy puedo dedicar estas palabras. Dentro de ésta quiero partir mencionando a mi madre Mitzi Baier S., el pilar fundamental de mi vida y fuente de inspiración para mí, el amor incondicional que me entrega me da fuerza hasta en los momentos más difíciles y el transcurso de mi vida no sería suficiente para devolverle todo lo que me ha entregado.

Agradezco también a mis hermanas María José Pinochet B. y Francesca Pinochet B., por su complicidad, por su apoyo, por su protección y sobre todo por su amor, la certeza de saber que siempre estarán presentes, me motiva para seguir avanzando. También quisiera agradecer de forma muy especial a mis abuelos Isilda Salgado R. y Hugo Baier G., por todos los sacrificios realizados no sólo durante estos meses sino que durante toda mi vida. Ustedes son mi refugio y mi mayor deseo es que me acompañen siempre en cada nuevo paso que dé. Sin restar mayor importancia quiero agradecer al resto de mis familiares, mis tíos Marcelo Baier S., Herman Baier S., Liliana González G., Regina Campos, a mis primos, especialmente a Alejandro Salgado C., y al resto de mis seres queridos Erwin Müller R., Jorge Gilles y Jorge Brocca R., gracias a todos por su apoyo y compañía.

Quiero dar además un agradecimiento muy grande a mi mejor amiga Sofía Monsalve V., la que ha estado apoyándome constantemente durante este proceso, muchas gracias por tu amistad e incondicionalidad. Además de agradecer a mi compañero Marcelo Sanhueza V. por aparecer en mi vida en el momento más importante, por inspirarme y motivarme a pelear y por apoyarme en los días en que me encontraba lejos de ti.

De la misma forma, quiero agradecer de manera muy especial a Vanessa Campos por su ayuda en lo que fue el desarrollo de mi tesis, principalmente por la amistad entregada, el apoyo, la paciencia y dedicación, tomaste a una estudiante y la volviste una científica, muchas gracias por todo, eres una de las mejores personas que conocí en Santiago y mi triunfo hoy es gracias a ti.

Finalmente para terminar agradezco el cariño y preocupación de toda la gente, amigos, conocidos, compañeros, colegas y profesores que me apoyaron durante todos estos años de carrera. Les agradezco por sus palabras de aliento y por contribuir en esos instantes de trabajo con mi crecimiento personal.

ÍNDICE

I	INTRODUCCIÓN	1
II	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1	Carcinoma hepatocelular (HCC)	3
2.2	Terapia dirigida para cáncer de hígado	5
2.3	Oligonucleótidos Antisentido	6
2.4	Terapia antisentido contra el cáncer	7
2.5	ASOs en HCC	8
2.6	ARNs no codificantes como blancos terapéuticos para el cáncer	9
2.7	ARN mitocondrial no codificante	10
III	HIPÓTESIS	13
IV	OBJETIVOS	13
4.1	Objetivo general	13
4.2	Objetivos específicos	13
V	MATERIALES Y MÉTODOS	14
5.1	Soluciones	14
5.2	Reactivos y materiales químicos	14
5.3	Células	14
5.4	Determinación del crecimiento celular de la línea de hepatocarcinoma murino	15

5.5	Sondas utilizadas en Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	15
5.6	Marcaje de sondas para la Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	15
5.7	Hibridación <i>in situ</i> (HIS)	16
5.8	Sonda marcada con el fluoróforo Alexa 488 dirigida a los ARNncmt-AS murino	16
5.9	Transfección de células Hepa 1-6 con ASOs marcados con el fluoróforo Alexa 488	17
5.10	ASOs dirigidos a los ARNmtnc -AS murinos	17
5.11	Transfección de células Hepa 1-6 con ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS	17
5.12	Ensayo de TUNEL (terminal transferase-mediated dUTP nick labeling)	18
5.13	Determinación de la proliferación celular	18
5.14	Estadística descriptiva	19
6	RESULTADOS	20
6.1	Determinación de la curva de crecimiento de células Hepa 1-6	20
6.2	Determinación de la expresión diferencial de los ARNmtnc en células Hepa 1-6.	21
6.3	Determinación del porcentaje de transfección de células Hepa 1-6	23
6.4	Efecto de la interferencia del ASO anti ARNmtnc-AS sobre la viabilidad celular de células Hepa 1-6	25
6.5	Efecto de la interferencia del ASO anti ARNmtnc-AS sobre la muerte celular en células Hepa 1-6	27

6.6	Determinación de la muerte celular mediada por el ASO anti ARNmtnc-AS en células Hepa 1-6	29
6.7	Efecto de la interferencia del ARNmtnc-AS sobre la proliferación celular en células Hepa 1-6.	30
VII	DISCUSIONES	31
VIII	CONCLUSIONES	36
IX	LITERATURA CITADA	37

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Curva de la proliferación de las células Hepa 1-6.
- Figura 2. Expresión de los ARNmtnc en células HFK y Hepa 1-6.
- Figura 3. Transfección del ASO-F en células Hepa 1-6
- Figura 4. Eficiencia de la transfección del ASO-F en células Hepa 1-6
- Figura 5. Efecto de la concentración del ASO ARNmtnc-AS sobre la proliferación celular en células Hepa 1-6
- Figura 6. Efecto de la concentración del ASO ARNmtnc-AS en la muerte celular de células Hepa 1-6 mediante azul de tripán
- Figura 7. Citometría de flujo del efecto de la concentración del ASO ARNmtnc-AS en la muerte celular de células Hepa 1-6
- Figura 8. Fragmentación del ADN en células Hepa 1-6
- Figura 9. Inhibición de la proliferación celular

ABREVIATURAS

°C	Grados Celcius
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFP	α -fetoproteína
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARNm	ARN mensajero
ARNmtnc	ARN mitocondrial no codificante
ARNmtnc-AS	ARN mitocondrial no codificante antisentido
ARNmtnc-S	ARN mitocondrial no codificante sentido
ARNnc	ARN no codificante
ARNr	ARN ribosomal
ARNr 16S	Ácido ribonucleico ribosomal 18S
ARNr 18S	Ácido ribonucleico ribosomal 16S
ARNt	ARN transferencia
ASO	Oligonucleótido antisentido
ASO-F	Oligonucleótido antisentido fluorescente
ASO-NR	Oligonucleótido antisentido no relacionado
ASO-AS	Oligonucleótido antisentido anti ARN mitocondrial no codificante antisentido
BCIP	p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato
BSA	Albúmina de suero bovino
CISH	Hibridación <i>in situ</i> cromogénica
cm ²	Centímetros cuadrados
CMV	Citomegalovirus
CO ₂	Dióxido de carbono
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
dATP	Desoxiadenosina 5' trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio Eagle modificado Dulbecco's

DMSO	Dimetil sulfóxido
DNasa	Desoxirribonucleasa
dUTP	Deoxiuridina trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamino tetra acético
EdU	5-etinil-2'-deoxiuridina
FAL	Tampón fosfatasa alcalina
FDA	Administración de medicamentos y alimentos
FPS	Proteína fluorescente
g	Gravedad
G0	G sub cero
h	Hora
H ₂ O	Agua
HCC	Hepatocarcinoma celular
HCl	Acido Clorhídrico
HeLa	Henrietta lacks
HKF	Queratinocitos de prepucio humano
HIS	Hibridación <i>in situ</i>
Ho	Hoechst
Hsp	Proteína de Shock térmico
IR	Invertido repetido
kb	Kilobase
KSFM	Medio de queratinocitos libre de suero
LncRNAs	Ácidos ribonucleicos largos no codificantes
M	Molar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
miRNA	microRNA
mL	Mililitro
mM	milimolar
MOE	Metoxi-etil
MYB	Myeloblastosis
N	Normal

NaCl	Cloruro de sodio
NBT	Cloruro de tetrazolio nitro-azul
nM	nanomolar
nt	Nucleótido
OMS	Organización mundial de la salud
OPN	Osteopontina
ORF	Marco abierto de lectura
P53	Proteína 53
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCNA	Antígeno Nuclear de Proliferación Celular
PDGFR	Receptor para el factor de crecimiento derivado de plaquetas
pH	Potencial de hidrógeno
PHA	Fitohemaglutinina
PI	Ioduro de propidio
PiRNA	Ácido ribonucleico asociados a Piwi
PKA	Proteína kinasa A
Pol	Polimerasa
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
rTdT	Enzima Transferasa desoxinucleotidil terminal
SDS	Dodecilsulfato de Sodio
SEM	Error estándar de la media
SFB	Suero fetal de bovino
shRNA	Horquilla pequeña de ARN
siRNA	ARN pequeño de interferencia
snoRNA	ARN nucleolar pequeño
snRNAs	ARNs nucleares pequeños
SSC	Tampón salino de citrato de sodio
TA	Temperatura ambiente
TACE	Quimioembolización transarterial

TBS	Tampón Tris salino
TdT	Deoxinucleotidil transferasa terminal
U	Unidades
UV	Ultravioleta
VEGFR 2	Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

El hepatocarcinoma celular (HCC) es la quinta neoplasia más común y la tercera con mayores causas de muerte en el mundo. Esta enfermedad implica un reto terapéutico debido a que su tratamiento estándar está basado en la resección quirúrgica, radioterapia, quimioterapia, que afecta tanto tejido tumoral como normal. Por este motivo se han realizado variados esfuerzos para encontrar terapias alternativas menos invasivas que no afecten al tejido sano. Burzio y colaboradores, han identificado una nueva familia de ARNs de origen mitocondrial denominados ARN mitocondrial no codificante Sentido (ARNmtnc-S) y Antisentido (ARNmtnc-AS), los cuales presentan un patrón de expresión característico, observado mediante hibridación *in situ* (HIS), que permite diferenciar entre células normales y tumorales. Células normales en proliferación presentan altos niveles tanto del transcrito Sentido como del Antisentido, mientras que las células tumorales presentan altos niveles del ARNmtnc-S y bajos niveles de ARNmtnc-AS. Por otro lado, ninguno de los transcritos es detectado en células que no se encuentran en división. Estudios realizados en el laboratorio demostraron que la interferencia mediada por oligonucleótidos complementarios a los transcritos antisentido en distintos tipos de células tumorales disminuía su proliferación e inducía apoptosis en éstas, sin afectar a las células normales, dando así la posibilidad de usar la interferencia de estos transcritos como un potencial tratamiento para el cáncer. Basándonos en estos antecedentes se planteó en este proyecto analizar si la interferencia del ARNmtnc-AS mediada por oligonucleótidos antisentido (ASOs) induce efectos sobre la proliferación y muerte celular de células de hepatocarcinoma murino de manera *in vitro*. Para alcanzar este objetivo se transfectaron células Hepa 1-6 con ASOs dirigidos contra el ARNmtnc-AS, y posteriormente se evaluaron los parámetros de proliferación celular y muerte celular. Los resultados demostraron que la transfección de ASOs anti-ARNmtnc-AS disminuye la proliferación e induce apoptosis en células de hepatocarcinoma murino, lo que sugiere el posible uso de la interferencia del ARNmtnc-AS como tratamiento alternativo para el HCC.

ABSTRACT

The hepatocellular carcinoma (HCC) is the fifth most common neoplasia and is the third most common cause of death in the world. This disease implies a therapeutic challenge due to its standard treatment based on surgical resection, radiotherapy, quimiotherapy, among others that do not only affect tumor tissue but also affect normal tissue. For these reasons much effort has been done in searching alternative therapies that are less invasive which do not affect normal tissue. Burzio and collaborators have identified a new family of non-coding mitochondrial RNAs denominated non-coding mitochondrial RNA Sense (RNAmtn-S) and Antisense (RNAmtn-AS), which display a very singular pattern of expression in *in situ* hibridation allowing to distinguish normal cells from tumor cells. Normal cells in proliferation express high levels of the Sense and Antisense transcripts. Tumor cells, on the other hand, express high levels of RNAmtn-S and very low levels of RNAmtn-AS and none of these transcripts are detected in non-dividing cells. Other results of this research have demonstrated that interference mediated by oligonucleotides that target RNAmtn-AS in different types of tumor cell lines decreased their proliferation rate and induced apoptosis without affecting normal cells, suggesting the possibility of using interference against these transcripts as a potential treatment for cancer. Based in these facts, we decided to analyze if the interference of RNAmtn-AS with the use of antisense oligonucleotides (ASOs) induces effects on proliferation and cell death in murine hepatocarcinoma cells *in vitro*. To achieve this goal we transfected Hepa 1-6 cells with specifics ASOs targeting against the RNAmtn-AS, and then we evaluated the parameters of proliferation cell and death cell. The results showed that ASO transfection against the RNAmtn-AS diminishes the proliferation cell and induces apoptosis in Hepa 1-6 cells, which suggests the possible use of interference against RNAmtn-AS as an alternative treatment for HCC.

I. INTRODUCCIÓN

El carcinoma hepatocelular (HCC) es una neoplasia altamente maligna que afecta al hígado, de pronóstico desfavorable y con una incidencia de un millón de casos por año en todo el mundo (González, 1995). Es uno de los tumores malignos más comunes en Asia, África, sur de Europa, y Estados Unidos, siendo la quinta neoplasia más frecuente y ocupa el tercer lugar entre las causas de mortalidad relacionadas con el cáncer. El HCC implica un reto terapéutico debido a que es un tumor altamente vascularizado, cuyo tratamiento estándar en estadios tempranos está basado en la resección quirúrgica, trasplante de hígado, ablación tumoral; los cuales logran aumentar la sobrevida de los pacientes, mientras que en estadios finales no se puede optar por estos tratamientos y la sobrevida es casi nula (Ye, Takayama *et al.*, 2010). Entre las terapias actuales para solucionar esta problemática se destaca la terapia antisentido que utiliza oligonucleótidos antisentido (ASOs) para bloquear o disminuir específicamente la expresión de un gen o producto génico que causa alguna alteración (Jyotsna, 2011). En los últimos años estudios realizados por Burzio y colaboradores determinaron un nuevo posible blanco terapéutico para ser utilizado como terapia para el cáncer denominado ARNm^{nc} Antisentido. Esta nueva familia de ARNm^{nc} se clasifica en dos tipos, ARNm^{nc} Sentido (ARNm^{nc}-S) y ARNm^{nc} Antisentido (ARNm^{nc}-AS), y son expresados de manera diferencial si se comparan distintos estados celulares (Burzio, Villota *et al.*, 2009). Se demostró que en células normales en proliferación ambos transcritos eran expresados, mientras que en células tumorales sólo se detectaban altos niveles del ARNm^{nc}-S y niveles muy bajos del ARNm^{nc}-AS. En el caso de células que no están en proliferación o G0, no se expresa ninguno de los ARNm^{nc} (Burzio *et al.*, 2009). Estudios realizados utilizando interferencia de los ARNm^{nc} en distintos tipos de células tumorales, demostraron que al interferir el transcrito sentido se produce una disminución de la proliferación celular (Villota *et al.*, 2012), y al interferir los bajos niveles del transcrito antisentido no sólo se produce una disminución de la proliferación celular sino que también induce la muerte de éstas (Vidaurre *et al.*, en preparación). Por el contrario, al realizar los mismos estudios en células normales en proliferación o en reposo, la interferencia de los ARNm^{nc} tanto de sentido como antisentido, bajo las mismas condiciones no gatilla muerte celular (Vidaurre *et al.*, 2012 en

preparación). Estos antecedentes proporcionan datos interesantes para utilizar la interferencia del ARNmtnc-AS como un posible blanco terapéutico para el HCC. Con todo esto se planteó evaluar si la administración de ASOs dirigidos contra ARNmtnc-AS tiene efecto sobre la proliferación celular o gatilla la muerte de células de hepatocarcinoma murino de manera *in vitro*. Para confirmar este objetivo se utilizaron células Hepa 1-6, la cual es una línea murina de cáncer hepático, las que fueron transfectadas con ASOs específicos dirigidos contra el ARNmtnc-AS para posteriormente evaluar parámetros de proliferación y muerte celular. Estos estudios permitirán obtener datos preliminares de la interferencia de los ARNmtnc-AS en células de hepatocarcinoma murino *in vitro* para así poder realizar una posterior evaluación de esta interferencia en estudios *in vivo* en un modelo animal.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. Carcinoma hepatocelular (HCC)

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad en el mundo, alcanzando aproximadamente 7 millones de muertes cada año. En el 2008 se registraron 7,6 millones de muertes por su causa, correspondiendo a un 13% de la mortalidad a nivel mundial. Es la primera causa de muerte en los países desarrollados y la segunda en los países en vías de desarrollo, donde más del 70% de las defunciones ocurren en estos últimos (Organización Mundial de la Salud [OMS], 2012). Según las proyecciones, se estima que en los próximos 10 años 84 millones de personas morirán producto del cáncer, esta incidencia seguirá aumentando y se calcula que para el año 2030 se registrarán 13,1 millones de muertes a nivel mundial (OMS, 2006, 2012). El carcinoma hepatocelular (HCC) es la neoplasia epitelial maligna primaria más frecuente del hígado. Se considera como el quinto cáncer de mayor incidencia mundial y el tercero con mayor causa de muertes (cerca de 1.250.000 personas al año). La incidencia del HCC varía según las diferentes etnias, el lugar geográfico, la edad, el sexo, etc. (Uribe M *et al.*, 2010). En Chile no existe un registro específico de la morbilidad de esta enfermedad por lo que se desconoce su incidencia pero se estima que es menor a 9 casos por cada 100.000 habitantes (Hepp K, Balbontín M *et al.* 2010). El HCC se produce en las células hepáticas adultas y se caracteriza por una dura protuberancia bajo la caja torácica (debido a la hinchazón del hígado), dolores localizados en la parte superior del abdomen y una coloración amarillenta de la piel. Normalmente se acompaña de un aumento de los niveles en la sangre de la alfa-fetoproteína y de la fosfatasa alcalina; así como de una rápida deterioración de la función hepática (Montero B, 2008). El HCC presenta diversos tipos anatomopatológicos y clínicos y su pronóstico puede variar de acuerdo con la extensión del tumor en el momento del diagnóstico, por lo que podemos decir que el estadio en el que se detecta la enfermedad es uno de los factores más importantes a considerar a la hora de decidir las opciones de tratamiento (González M, 1995). Los pacientes que se encuentran en un estadio temprano de la enfermedad pueden tratarse a través de resección quirúrgica, trasplante de hígado o ablación del tumor (Ye,

Takayama *et al.*, 2010). La resección quirúrgica es un tratamiento en el que se extirpa una parte del hígado enfermo cuando el tumor es único e inferior a 5 cm de diámetro. Las desventajas del uso de esta terapia es que debe ser realizada sólo cuando la persona está lo suficientemente saludable y el tumor puede extraerse totalmente dejando suficiente hígado saludable (Samuel, Chow *et al.*, 2009). En el caso del trasplante de hígado se recomienda su realización sólo en los pacientes que presentan tumores pequeños multifocales o mayores a 5 cm que no pueden ser extirpados totalmente. La principal desventaja de este procedimiento es que las oportunidades de trasplante de hígado son limitadas debido a la escasez de órganos viables (Hemming, Cattral *et al.*, 2001). Por último, la ablación es un método no quirúrgico que destruye los tumores pequeños de hígado (de alrededor a 3 cm de diámetro) sin extirparlos. Este método consiste en eliminar las lesiones del hígado aplicando ondas de radiofrecuencia a éstas a través de una aguja o mediante la inyección de diversas sustancias (etanol, ácido acético, etc.). La desventaja de esta técnica es que ofrece menos probabilidades de curar el cáncer y puede afectar a otros órganos o sistemas y provocar efectos secundarios como dolor abdominal, infección en el hígado y sangrado en la cavidad torácica o el abdomen (Takayama y Makuuchi, 2001). Los pacientes que se encuentran en estadios intermedios de la enfermedad son candidatos óptimos para la quimioembolización transarterial (TACE) (Bruix, Sherman *et al.*, 2011). La TACE corresponde a una inyección intra-arterial selectiva utilizando lipiodol que intenta bloquear o reducir el flujo de sangre a las células cancerosas en el hígado. Las células cancerosas suelen alimentarse de las ramas de la arteria hepática, por lo que al bloquearla se eliminan estas células sin afectar a las células sanas del hígado. La desventaja de este tipo de terapia son sus efectos secundarios que pueden incluir, dolor abdominal, fiebre, náusea, infección en el hígado, inflamación de la vesícula biliar, y coágulos sanguíneos en los vasos sanguíneos principales del hígado (Bruix, Sala *et al.*, 2004). Finalmente, los pacientes que se encuentran en estadios terminales presentan un deterioro severo de la capacidad física y mayor disfuncionalidad hepática debido a la extensa diseminación tumoral, cuya expectativa de vida es menor a los 3 meses (Lencioni, Chen *et al.*, 2010). Actualmente, el único tratamiento efectivo para estos pacientes es el trasplante de hígado por lo que existe la necesidad de buscar nuevas opciones para aumentar la sobrevida de estos enfermos (Bruix, Sherman *et al.*, 2011). Resumiendo, se puede decir que la mayor desventaja de

estos tratamientos es que son métodos invasivos que no solo afectan a las células cancerosas sino también a las células normales, por lo que parece justificado plantearse nuevas alternativas terapéuticas para curar los distintos estadios de esta enfermedad y aumentar las expectativas de vida en estos pacientes.

2.2. Terapia dirigida para cáncer de hígado

Hoy en día, a medida que surgen nuevos descubrimientos sobre los eventos celulares involucrados en la aparición del cáncer, también se desarrollan nuevas terapias que permiten combatir esta patología de manera más específica y segura. En el caso del cáncer de hígado se ha observado que las terapias tradicionales no son suficientes para aumentar la sobrevida de los pacientes tratados en estadios más avanzados, por lo que se ha comenzado a desarrollar y utilizar nuevas terapias alternativas dirigidas contra blancos específicos de las vías involucradas en el desarrollo de esta neoplasia (Lencioni, Chen *et al.*, 2010). Las ventajas del uso de medicamentos dirigidos es que tienden a concentrarse en la destrucción de células cancerosas y causan menos daño a los tejidos normales, además de generar menos efectos secundarios y ser menos severos, y más importante aún es que este tipo de medicamentos entran en el torrente sanguíneo y circulan por todo el cuerpo, siendo útiles cuando el cáncer se ha extendido a otros órganos (Lencioni, Chen *et al.*, 2010). Actualmente, entre los medicamentos dirigidos contra el HCC se destacan el sorafenib, el cual es un inhibidor de multiquinasas cuya actividad está dirigida contra Raf-1, B-Raf, VEGFR2, PDGFR, receptores c-Kit, entre otras quinasas (Wilhelm, Adnane *et al.*, 2008). Este medicamento funciona de dos maneras: ayuda a bloquear la formación de nuevos vasos sanguíneos en los tumores (angiogénesis), y ataca algunas de las proteínas en las células cancerosas que normalmente las ayudan a crecer (Wilhelm, Adnane *et al.*, 2008). Se ha demostrado que este fármaco desacelera el crecimiento del cáncer de hígado avanzado y ayuda a algunos pacientes que no son candidatos a los tratamientos tradicionales a vivir por más tiempo (alrededor de 3 meses). Actualmente, se está estudiando su uso más temprano en el curso de la enfermedad, en combinación con otros tipos de tratamiento (Llovet, Ricci *et al.*, 2008).

2.3. Oligonucleótidos Antisentido

Dentro de las terapias dirigidas a eventos celulares relacionados con cáncer, en los últimos años se ha utilizado una tecnología la cual está basada en la interferencia de estos blancos mediante oligonucleótidos antisentido (ASOs). Esta fue desarrollada a fines de la década de los 70', y ha sido utilizada selectivamente para inhibir miles de genes tanto en células de mamíferos como ratones, primates, entre otras especies y múltiples genes en humanos (Dean y Bennett, 2003). Los ASOs corresponden a pequeños fragmentos de ADN de cadena sencilla, diseñados para unirse específicamente a un ARN mensajero blanco a través de la complementariedad de bases (hibridación Watson & Crick), con el fin de inhibir su traducción (González S, 2003). En general, son de tamaño pequeño de unos 13-25 nucleótidos, cuya principal desventaja es ser degradados por endonucleasas y exonucleasas intracelulares (Dias y Stein, 2002). Se han desarrollado muchas modificaciones químicas para intentar solucionar este problema; entre los oligonucleótidos modificados más utilizados como terapia antisentido están los fosforotiatos, los cuales presentan gran estabilidad contra las nucleasas endógenas y son de fácil síntesis. La modificación que éstos poseen ocurre en el átomo de oxígeno desapareado del enlace fosfodiéster, el cual es substituido por azufre (Dias y Stein, 2002). Los ASOs modificados están diseñados para modular específicamente la transferencia de la información genética a proteína (Dias y Stein, 2002). Para que este procedimiento ocurra se han definido dos mecanismos antisentido principales. Uno los más estudiados y caracterizados son los mecanismos dependientes de la degradación del ARNm mediados por endonucleasas. Cuando se forma un heterodúplex ADN/ARN se activa la endonucleasa ARNasa H, que corta específicamente la hebra de ARN del complejo. Tras este corte, el ARN queda dañado, mientras que el ASO no sufre alteración alguna, de modo que puede seguir uniéndose al ARN complementario a su secuencia (Vega M, 2006). El mecanismo exacto por el cual la ARNasa H reconoce al complejo aún no está definido. En el segundo mecanismo, no se produce degradación del ARN, pero el emparejamiento con el ASO

puede impedir procesos esenciales para la producción de proteínas a partir del ARN (Vega M, 2006). Esta clase de moléculas antisentido no activan la ARNasa H debido a la naturaleza del dúplex formado con el ARN blanco, y en su lugar pueden inhibir la traducción al obstaculizar la lectura normal del ARNm ya sea por impedimento estérico de la unión al ribosoma o la interrupción del proceso de elongación o interferencia con el empalme del pre-ARNm (Dallas y Vlassov, 2006). Todos estos antecedentes sugieren que los ASOs son útiles como herramienta para el estudio de la función de los genes y además pueden utilizarse como potenciales agentes terapéuticos en determinadas enfermedades (Dias y Stein, 2002).

2.4. Terapia antisentido contra el cáncer

Desde la primera descripción de los genes hace ya 25 años (Stehelin *et al.*, 1976), han habido grandes progresos en el entendimiento de los diferentes roles que éstos juegan durante el proceso de oncogénesis (Dean y Bennett, 2003). Estos genes (oncogenes) son importantes para el desarrollo y mantención de un fenotipo maligno (cáncer), por lo que se ha visto la necesidad de identificar blancos apropiados y determinar las funciones genéticas específicas de éstos para entender cómo pueden contribuir a mantener una patología o enfermedad (Dean y Bennett, 2003). La tecnología antisentido utilizando ASOs representa una potencial solución para esta problemática. Históricamente, se han desarrollado muchos estudios utilizando ASOs como fármacos terapéuticos dirigidos contra genes o productos génicos (proteínas) asociados a determinados tipos de patologías. Uno de los primeros ASOs aprobado para uso terapéutico en humanos por la FDA (del inglés *Food and Drug Administration*) fue Fomivirsen, utilizado en el tratamiento local de la retinitis por citomegalovirus (CMV) (Roehr, 1998). A pesar de que los ASOs deben pasar por múltiples ensayos antes de ser aprobados, hoy en día, existen varios que se encuentran en desarrollo clínico para su uso en cáncer. Dentro de los ASOs pre-clínicos actuales más prometedores está el ISIS 20408 (2'-MOE ASO), el cual va dirigido contra MCL1, miembro de la familia de proteínas BCL2, que se sobreexpresa en diversos tipos tumorales humanos y está fuertemente asociado con la supresión de la apoptosis tumoral y su promoción. El

mecanismo por el cual MCL1 inhibe la expresión de la apoptosis aún es desconocido, pero se ha observado que su tratamiento en células tumorales *in vitro* promueve apoptosis, y de manera *in vivo* su administración retrasa el crecimiento tumoral en varios modelos xenográficos humanos como modelos de cáncer de colon, gástrico y en melanomas y sarcomas (Gleave y Monia, 2005). Otros blancos validados para la terapia antisentido que se encuentran actualmente en estudios pre-clínicos incluyen a Gem240 (Hybridon), HRas (ISIS 2503), metiltransferasa (MG98, MethylGene Inc), BCR/ABL, Hsp70, MYB161, PKA (GEM 231), p53, entre otros, aunque aún quedan muchos más por investigar (Gleave y Monia, 2005).

2.5. ASOs en HCC

Actualmente existen numerosos estudios que utilizan la tecnología de los ASOs como potencial terapia contra el cáncer. Entre estos estudios se destaca el de la osteopontina (OPN), gen principal sobreexpresado en HCC, como posible diana terapéutica para la intervención en la progresión y metástasis del HCC. Se ha demostrado que la OPN es sobreexpresada en una variedad de cánceres humanos como el de colon, de mama, de pulmón, de próstata, de páncreas; cuya expresión está relacionada con la progresión y metástasis tumoral, especialmente a través de la promoción de la proliferación celular, la migración y la invasión de la matriz extracelular *in vitro* (Chen, Xia *et al.*, 2011). El uso de un oligonucleótido fosforiato 2'-O-metoxi-etilribosa antisentido, dirigido contra la osteopontina (OPN ASO), suprime significativamente a nivel molecular la expresión del ARNm de OPN, y a nivel fisiológico la migración y la invasión de células tumorales de HCC *in vitro*. Por el contrario, los efectos de éste en la disminución de la proliferación celular y la apoptosis no se ven significativamente inhibidos (Chen, Xia *et al.*, 2011). Otros estudios se han enfocado en la survivina, un inhibidor de apoptosis, que está implicada tanto en el control de la apoptosis como en la regulación de la división celular, y que es expresada en muchos tipos de cáncer, incluyendo al HCC humano. Cuando esta proteína es sobreexpresada en las células cancerosas no solo muestra efectos antiapoptóticos sino que también acelera su actividad proliferativa. Además, se ha observado en diversas líneas

celulares derivadas de hígado, pulmón, mama, próstata, cuello uterino y carcinoma gástrico, que la interferencia de la survivina a través de un ASO específico inhibe el crecimiento del tumor tanto *in vitro* como *in vivo*, la cual la hace blanco para un posible tratamiento contra el HCC (Yuning S. *et al.*, 2006). Estos estudios dan antecedentes del uso de ASOs específicos para el tratamiento contra el HCC.

2.6.- ARNs no codificantes como blancos terapéuticos para el cáncer

Los ARN no codificantes (ARNnc) por definición, son todas aquellas moléculas de ARN que no codifican para proteínas. Estos ácidos nucleicos están presentes en muchas especies, tan sólo en mamíferos se han identificados más de 800 ARNnc excluyendo a ARNs de transferencias (ARNt), ARNs ribosomales (ARNr) y ARNs pequeños nucleares y nucleolares (snRNAs y snoRNA) (Mattick, 2004). La razón entre transcritos no-codificantes y codificantes aumenta en orden a la complejidad de los organismos, así procariontes tiene menos del 25% de transcritos no-codificantes, eucariontes simples entre 25-50%, eucariontes superiores sobre el 50% y en humano aumenta al 98% (Eddy, 2001). Se ha estimado que la mayoría de las secuencias transcritas en los mamíferos corresponden a ARNnc, los cuales tendrían un rol en la regulación génica. Estas moléculas poseen un amplio espectro de acción, controlando funciones implicadas desde el desarrollo de células germinales en *Drosophila* hasta ARNnc involucrados en enfermedades neurodegenerativas y en la modulación del proceso tumorigénico regulando procesos como metástasis, apoptosis, proliferación y angiogénesis (Mattick, 2006). Según su tamaño, se pueden agrupar dentro de 2 clases principales, los ARNnc pequeños, que incluyen a los miRNAs, los PiRNAs y siRNAs, entre otros, y a los ARNnc largos, que corresponden a los recientemente descritos LncRNAs (Long non-coding RNA) (Gibb, Brown *et al.*, 2011). Los miRNAs constituyen una larga clase filogenéticamente conservada de moléculas de ARN de hebra simple de entre 19 a 25 nucleótidos que están involucrados en el silenciamiento de genes post-transcripcional. Éstos surgen de regiones genómicas intergénicas o intragénicas (tanto exónicas como intrónicas) que se transcriben como largos transcritos primarios. Los transcritos primarios sufren de dos etapas de procesamiento que producen la molécula madura pequeña. Este miRNA maduro se une a regiones específicas del transcrito del ARNm blanco y puede desestabilizarlo o bloquear su traducción, o ambos (Brodersen y

Voinnet, 2009). Los miRNAs no solo regulan varios procesos de desarrollo y fisiológicos, sino también están implicados en el desarrollo del cáncer. Aproximadamente un 50% de los miRNAs humanos definidos están mapeados en regiones frágiles del cromosoma, las cuales son áreas del genoma que están asociadas a varios tipos de cáncer (Calin *et al.*, 2004). Para confirmar la relación entre el cáncer y los miRNA se han realizados diversos estudios. Entre los resultados de éstos, se ha determinado que la inestabilidad genómica que altera la regulación de los genes blancos para miRNA está relacionada con un mayor número de tipos de cáncer (Selcuklu *et al.*, 2009), que el proceso global de inhibición de miRNA puede llevar a un aumento en la tumorigenicidad (Kumar *et al.*, 2007) y también que miRNA puede actuar como supresor de genes tumorales y inducir todas las características de las células malignas (Hanahan y Weinberg, 2000; Negrini *et al.*, 2009). A diferencia de los miRNAs, los LncRNAs, son transcritos procesados completos desde su templado y se caracterizan por poseer entre 200-nt hasta 1000-kb (Kapranov, Cheng *et al.*, 2007). Éstos son transcritos por la RNA pol II, no poseen marcos de lectura abierta (OFR) y son poliadenilados. Uno de los primeros LncRNAs descritos fue Xist, el cual juega un rol crítico en la inactivación del cromosoma X (Lee. J, 1999). El mecanismo de acción de LncRNAs es generalmente desconocido, pero podría ser similar al de otro LncRNA ya estudiado denominado HOTAIR (del inglés *HOX antisense intergenic RNA*), el cual se ha reportado recientemente que está asociado a la metástasis del cáncer y que presentaría un rol potencial como molécula oncogénica y/o supresora de tumores (Gupta *et al.*, 2010; Gibb, Brown *et al.*, 2011). Todos estos antecedentes demuestran el gran potencial que tienen los ARNnc para ser considerados como los grandes reguladores de la información genética y por ende su mayor entendimiento es transcendental para futuras investigaciones relacionadas con el cáncer.

2.7.- ARN mitocondrial no codificante

Muchos estudios han aportado el conocimiento tanto de nuevos blancos moleculares como de ARNs no codificantes que pueden ser utilizados como terapias contra el cáncer. Uno de estos fueron los estudios realizados por Burzio y colaboradores, quienes

caracterizando ARNs de espermatozoides a partir de genotecas de ADN de testículos de ratón descubrieron la presencia de un ARN de 1685 nucleótidos (nt) que contenía la secuencia del ARN mitocondrial 16S y un invertido repetido (IR) de 120 nt unidos covalentemente al extremo 5' del ARN (16S mtrRNA), el cual se encontraba enriquecido en el espermatozoide (Villegas, Zarraga *et al.*, 2000). A partir de estos estudios surgieron nuevas evidencias que demostraron la existencia de una nueva familia de ARNs mitocondriales que por sus características se clasifican como ARNs no codificantes, por lo que se les denominó ARNs mitocondriales no codificantes (ARNmtnc) (Eddy, 2001). Dentro de esta familia se pueden clasificar los ARNmtnc en dos tipos, ARNmtnc Sentidos (ARNmtnc-S) y ARNmtnc Antisentidos (ARNmtnc-AS), y los cuales han sido descritos tanto en ratón como en humanos (Villegas, Burzio *et al.*, 2007, Villegas, Zarraga *et al.*, 2000). Estudios realizados mediante hibridación *in situ* evidenciaron una expresión diferencial de esta familia de ARNmtnc al compararla entre células normales y células tumorales (Villegas, Burzio *et al.*, 2009). Los resultados mostraron que en las células normales en proliferación se expresaban tanto el ARNmtnc-S como el ARNmtnc-AS, mientras que en las células tumorales solamente se detectaban altos niveles del ARNmtnc-S y niveles muy bajos de los ARNmtnc-AS. En el caso de las células que no estaban en proliferación o G0 no se expresa ninguno de los transcritos (Villegas, Burzio *et al.*, 2009). Esta expresión diferencial ha sido demostrada en una variedad de células tumorales y normales, y también en biopsias humanas lo que da además indicios de la universalidad de esta familia de ARNs. Experimentos realizados en linfocitos periféricos en reposo, los cuales no presentan la expresión de los ARNmtnc, demostraron que al activarlos con el mitógeno fitohemaglutinina (PHA), correlacionado con la expresión de los marcadores de proliferación celular KI-67 y PCNA, inducían la expresión del ARNmtnc-S (Villegas, Burzio *et al.*, 2007). De forma contraria en otros estudios se observó que al inhibir la proliferación de células de cáncer de próstata DU145 con afidicolina disminuía la expresión del ARNmtnc-S (Villegas, Burzio *et al.*, 2007). Estos resultados permitieron hacer una correlación entre la expresión del ARNmtnc-S con la proliferación celular, señalando al ARNmtnc-S como un nuevo marcador de ésta (Villegas, Burzio *et al.*, 2007). Esto fue verificado interfiriendo células HeLa con ASOs anti-ARNmtnc-S las cuales presentaron disminución de la proliferación celular (Villota *et al.*, 2012). Por otro lado, líneas celulares

tumorales humanas y murinas utilizando interferencia mediada por ASOs anti-ARNmtnc-AS demostraron una inducción masiva de la muerte celular caracterizada por alteraciones en la morfología de la membrana plasmática, condensación de cromatina y fragmentación del DNA (Vidaurre S. 2012 En preparación), pero más interesante aún fue que al interferir las células normales con ASOs anti-ARNmtnc-AS, no se inducía muerte celular en éstas (Vidaurre, S, 2012 En preparación). Estas evidencias sugirieron la posibilidad de utilizar la interferencia específica de estos ARNmtnc-AS como una posible herramienta para la eliminación de células cancerosas sin afectar células normales. Con todos los antecedentes entregados anteriormente se sugiere que la interferencia mediada por ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS podría ser utilizada como una terapia alternativa para el HCC, por lo que se planteó evaluar de manera *in vitro* si esta interferencia gatilla la muerte celular en células de hepatocarcinoma murino.

III. HIPÓTESIS

La interferencia de los ARNmtnc-AS mediada por oligonucleótidos antisentido induce apoptosis en células de hepatocarcinoma murino *in vitro*.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del tratamiento con ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS en células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1-6) de forma *in vitro*.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Comprobar el patrón de expresión de los ARNs mitocondriales no codificantes en células Hepa 1-6.
2. Estandarizar la concentración óptima de transfección de ASOs en las células Hepa 1-6.
3. Determinar el efecto de la transfección de los ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS sobre la muerte celular en células Hepa 1-6 de forma *in vitro*.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Soluciones

Solución de hibridación: formamida 50%, SSC 4X, Denhardt 1X (50X: Ficoll 400 1%, polivinilpirrolidona 1%, BSA 1%), sulfato de dextrano 10%, DNA de espermatozoide de arenque 150 µg/mL, EDTA 2 mM y ARNt de levadura 150 µg/mL; SSC 20X: cloruro de sodio 3 M, citrato de sodio 300 mM, pH 7,0; Solución de bloqueo: BSA 2%, Tritón X-100 0,3% en PBS 1X.

Solución de Permeabilización: Tritón 0,3% en H₂O DEPC; FAL: Tris 100 mM HCl pH 9.5, MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM, Azul de tripán 0,05% en PBS 1X

5.2.- Reactivos y materiales químicos

Se usaron medios y componentes obtenidos desde Gibco (Carlsbad, California, USA) tales como medio DMEM (11995), medio OptiMem-I (51985), medio KSFM (10724-011), PBS 1X (10010), penicilina-estreptomycin (15240), tripsina 0,5% (15400) y suero fetal bovino (16000). De Invitrogen se obtuvo la lipofectamina 2000 (11668-019), el tampón TdT 5X (16314-015), H₂O libre de nucleasas (AM9932) y la sonda 190 AS FPS 488. El material de cultivo celular se obtuvo de Nunc (Rochester, NY, USA), que incluye placas de cultivo de 12 pocillos (150628); botellas de cultivo de 25 cm² (117570) y 75 cm² (156499). Las placas de cultivo de 10 cm² se obtuvieron de Corning (430117). Los tubos Falcon de 15 y 50 mL se obtuvieron de Axygen (33179101, 33180101). El sustrato NCIP/NBT se obtuvo de Promega (S3771); de Roche se obtuvo digoxigenina-11-dUTP (11573152910), dATP (11934511001), yoduro de propidio (P4170). La enzima fosfatasa alcalina (S3841) y rTdT (72033) se obtuvo de Promega.

5.3.- Células

Las líneas celulares utilizadas en este trabajo: Hepa 1-6 (hepatocarcinoma murino, donada por la Dra. Silvana Sanlungo, Pontificia Universidad Católica), cultivada con medio

DMEM suplementado con SFB 10%, penicilina 100 U/mL. El cultivo primario de HFK (queratinocitos de prepucio humano, Invitrogen) es cultivado en medio KSFM. Tanto las líneas celulares como el cultivo primario se cultivan en un incubador con 5% de CO₂ a 37°C.

5.4.- Determinación del crecimiento celular de la línea de hepatocarcinoma murino.

Se sembraron 5×10^4 células/pocillo Hepa 1-6 en placa de 12 pocillos con medio DMEM completo. 24 horas post-siembra, las células fueron recolectadas y centrifugadas por 5 min a 1.200 g. Mediante el método de exclusión por azul de tripán con cámara de Neubauer se cuantificaron las células viables por triplicado cada 24 horas durante un período de 4 días.

5.5.- Sondas utilizadas en Hibridación *in situ* (HIS)

Las sondas fueron sintetizadas por IDT.

- Sonda ARNmtnc-S: 5' TAGGGATAACAGCGCAATCCTATT 3'
- Sonda ARNmtnc-AS: 5' AATAGGATTGCGCTGTTATCCCTA 3'
- Sonda ARNr 18S: 5' AGTGGACTCATTCCAATTACA 3'

5.6 Marcaje de sondas para la Hibridación *in situ* (HIS)

Se preparó un mix que contenía 5 µL de tampón TdT 5X; 2,5 µL dATP 9 mM; 2,5 µL digoxigenina-11-dUTP 1 mM; 2,5 µL sondas (50 pmol/ µL), 11,5 µL de H₂O libre de nucleasas y 1 µL de la enzima rTdT 25 U/µL, utilizando el mismo orden señalado. La mezcla preparada homogenizada se mantuvo en hielo durante 5 minutos y después se incubó a 37°C durante 1 hora. Para comprobar el marcaje se cargaron 0,5 µL de las sondas sobre una membrana de nitrocelulosa que fue sometida a luz UV por 15 minutos. Se incubó primero con solución de bloqueo durante 30 minutos y luego con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina en solución de bloqueo a razón de 1:1000 por 1 hora. Se lavó la membrana con tampón TBS 1X por 3 minutos y luego con tampón

FAL por 5 minutos. Se reveló utilizando sustrato BCIP/NBT durante 10 minutos (hasta 30 minutos como máximo), manteniendo el sustrato en oscuridad. La comprobación se realizó a temperatura ambiente (TA).

5.7.- Hibridación *In Situ* (HIS)

Se sembraron 3000 células Hepa 1-6 y HFK en labtek de 0,8 cm²/pocillo con medio DMEM completo. 24 horas después de la siembra, las células se lavaron durante 5 minutos con PBS 1X/EDTA para posteriormente ser permeabilizadas utilizando HCl 0,2 N durante 10 minutos a TA. Transcurrido el tiempo, se realizaron nuevamente dos lavados con PBS 1X/EDTA durante 5 minutos. Luego las células fueron pre-hibridadas con solución de hibridación en cámara húmeda durante 30 minutos a 37°C. Finalmente, se hizo un recambio de la solución de hibridación por una solución fresca que contenía la sonda correspondiente marcada con digoxigenina en una dilución 1:200 y se dejó incubando durante la noche a 37°C. Al día siguiente, las células fueron lavadas con SSC 0,5X durante 30 minutos a 37°C y después con PBS 1X/EDTA por 5 minutos a TA. Luego, se incubaron con solución de bloqueo durante 30 minutos a TA. Transcurrido el tiempo, las células se incubaron por 2 horas a TA con anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina diluido en solución de bloqueo a razón 1:500. A continuación, se lavaron dos veces con TBS 1X durante 3 minutos para eliminar el exceso de anticuerpo y luego se incubaron con tampón FAL por 5 minutos. La detección de la marca se realizó bajo oscuridad con una mezcla de sustratos BCIP/NBT y levamizol a TA durante 15 minutos y luego se detuvo la reacción con PBS 1X/EDTA (DAKO). Finalmente, se observó la marca bajo microscopio de campo claro haciendo uso de medio de montaje Faramount (DAKO).

5.8.- Sonda marcada con el fluoróforo Alexa 488 dirigida a los ARNcmt-AS murino

- Sonda ARNmtnc-AS FPS 488: 5' AGGTTTAGCCAAACCATT 3'

5.9.- Transfección de células Hepa 1-6 con ASOs marcados con el fluoróforo Alexa 488

Un día antes de la transfección 5×10^4 células Hepa 1-6 fueron sembradas en placas de 12 pocillos con medio DMEM completo. Al día siguiente se cambia el medio por Optimem-I sin suero ni antibióticos. 4 horas después las células son transfectadas con el ASO-Alexa488 a distintas concentraciones (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM) mediante el protocolo estándar de transfección con lipofectamina. 24 h post-transfección se analiza el porcentaje de transfección de las células a las diferentes concentraciones de ASOs mediante la cuantificación de la incorporación de ASO-Alexa488 por citometría de flujo (BD FACS Canto II, Fundación Ciencia & Vida).

5.10.- ASOs dirigidos a los ARNmtnc-AS murinos

Los oligos son fosforotioatos, purificados por HPLC y desalados. Sintetizados por IDT.

- ASO-ARNmtncAS: 5' CACCCTCTAACCTAGAGAAG 3'.
- ASO-NR: 5' AAGGTGGAGTGGGATTGGGG 3'

5.11.- Transfección de células Hepa 1-6 con ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS

Un día antes de la transfección 2×10^4 células/pocillo Hepa 1-6 fueron sembradas en placas de 12 pocillos con medio DMEM completo. El día de la transfección se cambia el medio por Optimem-I sin suero ni antibióticos. 4 horas después las células son transfectadas con ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS a distintas concentraciones (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM) mediante protocolo estándar de transfección con lipofectamina. Se realizaron transfecciones a las 24 y 48 horas post-siembrar. Las células Hepa 1-6 fueron transfectadas con el ASO anti ARNmtnc-AS y se utilizó como control el ASO-NR. 24 horas después de la última transfección, las células se recolectaron para medir viabilidad celular mediante la incorporación de yoduro de propidio por citometría de flujo (BD FACS Canto II, Fundación Ciencia & Vida) y tinción con azul de tripán mediante cámara de Neubauer.

5.12.- Ensayo de TUNEL (terminal transferase-mediated dUTP nick labeling)

Para la identificación de células apoptóticas utilizando el ensayo de TUNEL (Gabrieli Y. *et al.*, 1992) se utiliza un kit comercial (In Situ Cell Death Detection Kit, TMR-Red, Roche). El procedimiento es aplicado de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Las células Hepa 1-6 fueron transfectadas 24 y 48 h post-siembra con ASOs dirigidos a los ARNmtnc-AS como se describe anteriormente. 24 h post segunda transfección las células fueron tripsinizadas y luego centrifugadas a 200 x g durante 10 min. El sedimento fue resuspendido en 20 µL de PBS 1X, montado en portaobjetos cargados y se dejaron secar a TA ON. Al día siguiente se fijaron las muestras en formaldehído al 4% por 1 h a TA, después se lavaron con PBS 1X por 5 min. Posteriormente se incubaron con solución de permeabilización (0.1% Triton X-100 en 0.1% citrato de sodio) por 2 min entre 2°C - 8°C y luego se lavaron con PBS 1X. Se adicionan 20 µL de la mezcla de TUNEL del kit y se incuban las muestras en ambiente húmedo por 1 hora a 37°C en oscuridad. Se lavan las muestras 3 veces con PBS 1X. Finalmente, se incuban con DAPI diluido 1/1000 en PBS 1X por 5 min a TA y se realiza un lavado final con PBS por 5 min a TA. Luego se agrega medio de montaje fluorescente (DAKO) y se observan bajo el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX 51).

5.13.- Determinación de la proliferación celular de la línea de hepatocarcinoma murino.

Se sembraron 20.000 células/pocillo Hepa 1-6 en placas de 12 pocillos con medio DMEM completo. Se realiza doble transfección a las 24 y 48 horas post-siembra. 24h después de la última transfección se determina la proliferación celular usando el kit comercial Click-iT® EdU Alexa Fluor® 488 flow cytometry Assay (Invitrogen) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se elimina el sobrenadante y se adicionan 500 µL de medio OptiMem-I a cada pocillo. Se adicionan 500 µL de EdU a los pocillos con medio OptiMem-I y son cultivadas por 3 horas. Se fijan con formaldehído al 3,7% en PBS 1X por 15 min a TA protegido de la luz. Luego, son lavadas dos veces con BSA 3% por 5 min.

Para la permeabilización se agrega Tritón X-100 0,5% en PBS 1X por 20 min a TA. Se prepara la solución de reacción “1X Click-it reaction buffer” (CuSO_4 , azida alexa-flúor, buffer de reacción, agua libre de nucleasas) y se agrega a cada tratamiento, después de haber removido el buffer de permeabilización y lavado dos veces con BSA 3%, se incuban por 30 minutos a TA en oscuridad. Después se remueve la solución de reacción y se lava una vez con BSA 3%. Se añade Hoechst diluido 1/200 en PBS 1X e incuba por 30 min a TA en oscuridad. Luego las células tratadas se observan bajo el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX 51) y se analiza la cuantificación mediante conteo celular utilizando el programa ImageJ.

5.14.- Estadística descriptiva

Los datos son presentados como la media $\pm$ el error estándar (SEM) de al menos tres o más experimentos independientes.

VI. RESULTADOS

6.1.- Determinación de la curva de crecimiento de células Hepa 1-6

Para determinar el crecimiento de las células Hepa 1-6 para su posterior uso, se planteó evaluar el ritmo de proliferación celular de éstas. La Figura 1 muestra el gráfico del crecimiento obtenido en el que se observó que las células Hepa 1-6 poseen un crecimiento exponencial y que el ritmo de proliferación es 2.5 veces cada 24 horas aproximadamente, bajo las condiciones de cultivo mencionadas (Materiales y Métodos).

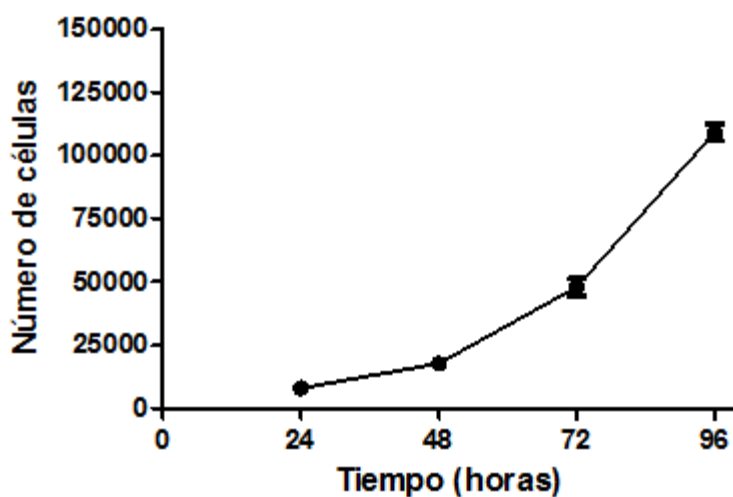


Figura 1. Curva de la proliferación de las células Hepa 1-6.

6.2. Determinación de la expresión diferencial de los ARNmtnc en células Hepa 1-6.

Uno de los principios básicos para el uso de la interferencia de los ARNmtnc-AS es el patrón de expresión descrito anteriormente que presentan los ARNmtnc en células tumorales observado *in situ*. En este caso para confirmar que la línea celular Hepa 1-6 presentaba el perfil de expresión de los transcritos del tipo tumoral se utilizó la técnica de hibridación *in situ* cromogénica (CISH). La CISH se realizó utilizando como control la línea celular de queratinocitos de prepucio humano (HFK), la cual presenta un patrón de expresión de célula normal en proliferación. La sonda utilizada como control positivo de la técnica corresponde a la ARNr 18S que detecta el ARN ribosomal 18S, el cual es ubicuo en todas las células. Al observar los patrones de expresión de los ARNmtnc se observó marca del transcrito sentido en ambos tipos de células. Por el contrario, al evaluar la expresión de los ARNmtnc-AS sólo se observó que las células HFK normales presentan marca para este transcrito, mientras que las células Hepa 1-6 presentaron un bajo marcaje para éste, siendo así su patrón comparable al de otras líneas tumorales (Figura 2).

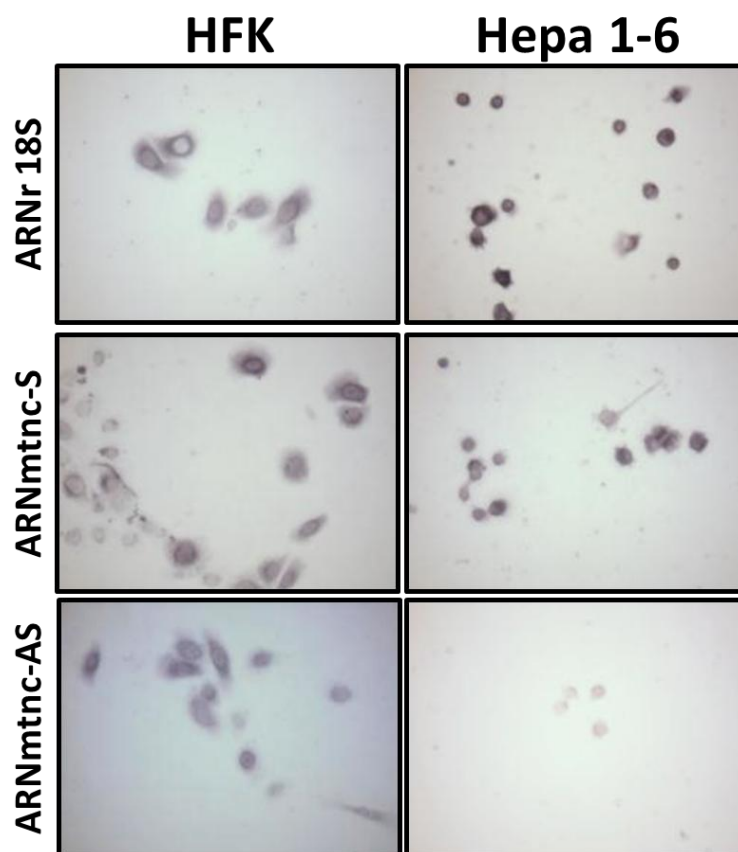


Figura 2. Expresión de los ARNmtncs en células HFK y Hepa 1-6. La expresión de los ARNmtnc Antisentido y Sentido fue detectada mediante hibridación *in situ* cromogénica (CISH) en queratinocitos humanos normales (HFK) y células de hepatocarcinoma murino (Hepa 1-6). Imágenes obtenidas mediante microscopio óptico de campo claro (40X).

6.3.- Determinación del porcentaje de transfección de células Hepa 1-6

Para el trabajo experimental de esta tesis fue de interés evaluar el porcentaje de transfección de células de hepatocarcinoma murino Hepa 1-6 mediada por oligonucleótidos antisentido (ASOs). Para esto células Hepa 1-6 fueron transfectadas con distintas concentraciones de la sonda fluorescente (ARNmtnc-AS FPS-Alexa488) utilizando lipofectamina como agente de transfección según las condiciones del fabricante. La transfección de las células Hepa 1-6 se confirmó mediante microscopía de fluorescencia (Figura 3) en la cual se observa transfección solo en el cultivo transfectado con la sonda fluorescente. El porcentaje de transfección fue cuantificado mediante citometría de flujo 24 horas post-transfección. Se observó que el porcentaje de transfección en células Hepa 1-6 era de aproximadamente 70% con las concentraciones 150 y 200 nM y que no existían diferencias significativas entre ambas concentraciones (Figura 4).

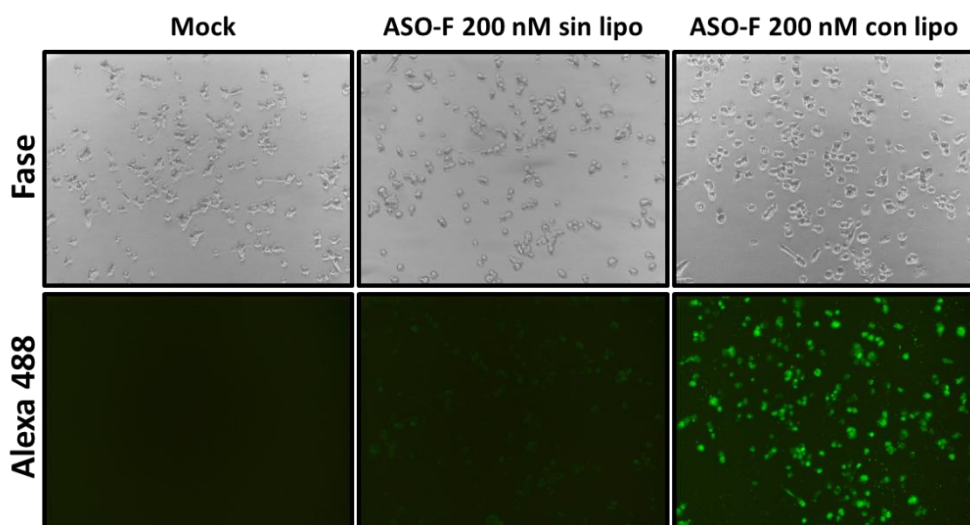


Figura 3. Transfección del ASO-F en células Hepa 1-6. Imágenes obtenidas mediante microscopía fluorescente de células Hepa 1-6 transfectadas a distintas concentraciones (50nM-200nM) con el ASO fluorescente (ARNmtnc-AS FPS-Alexa488) por 24h (20X). Como controles se utilizaron células sin tratar (Mock) y tratadas en ausencia de lipofectamina. La imagen representa los resultados de los tratamientos obtenidos con la concentración 200 nM.

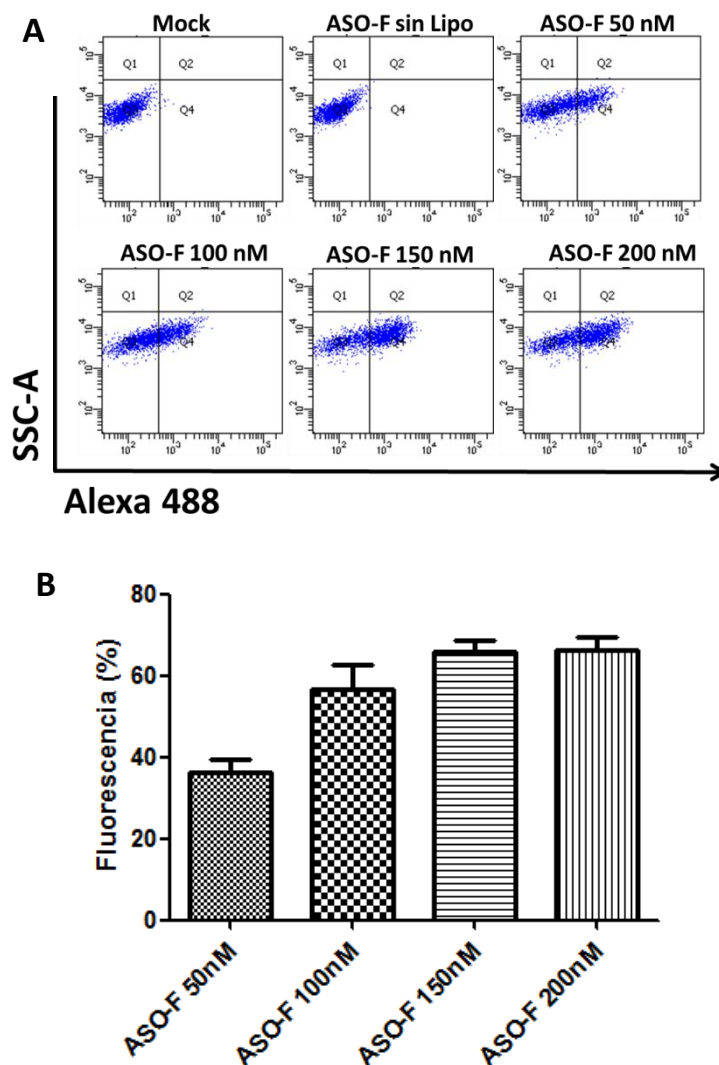


Figura 4. Eficiencia de la transfección del ASO-F en células Hepa 1-6. Células Hepa 1-6 fueron transfectadas con el ASO-F ARNm_{tnc}-AS Alexa488 a distintas concentraciones (50nM-200nM) por 24h. Como controles se utilizaron células sin tratar (Mock) y tratadas en ausencia de lipofectamina. (A) Citometría de flujo de las células Hepa 1-6 transfectadas. (B) Resultados del % transfección a las distintas concentraciones del ASO fluorescente. Resultado muestra promedio de cuatro experimentos independientes (n=4, $x \pm \text{SEM}$).

6.4.- Efecto de la interferencia del ASO anti ARNmtnc-AS sobre la viabilidad celular de células Hepa 1-6

Una vez determinado el porcentaje de transfección de las células Hepa 1-6 utilizando la sonda fluorescente se planteó determinar el rango de concentración del ASO dirigido contra el ARNmtnc-AS que gatille efectos sobre la viabilidad de las células Hepa 1-6. Para alcanzar este objetivo se utilizó tanto un protocolo de transfección simple como el utilizado en el punto anterior y una doble transfección descrita en materiales y métodos. El motivo de esta doble transfección es por experiencia previa en la cual distintas líneas celulares presentan diferentes resistencias al tratamiento con ASOs anti ARNmtnc. Al observar el número de células de los distintos grupos 24 y 48 h post-transfección, mediante microscopía de campo claro se evidenció solamente una disminución de las células en los grupos tratados con una doble transfección de ASO dirigido contra el ARNmtnc-AS en comparación con los grupos tratados con los ASOs controles como con los ASOs de simple transfección (Figura 5). De aquí en adelante los análisis se realizaron utilizando una doble transfección de ASO 24 y 48 h post-siembra.

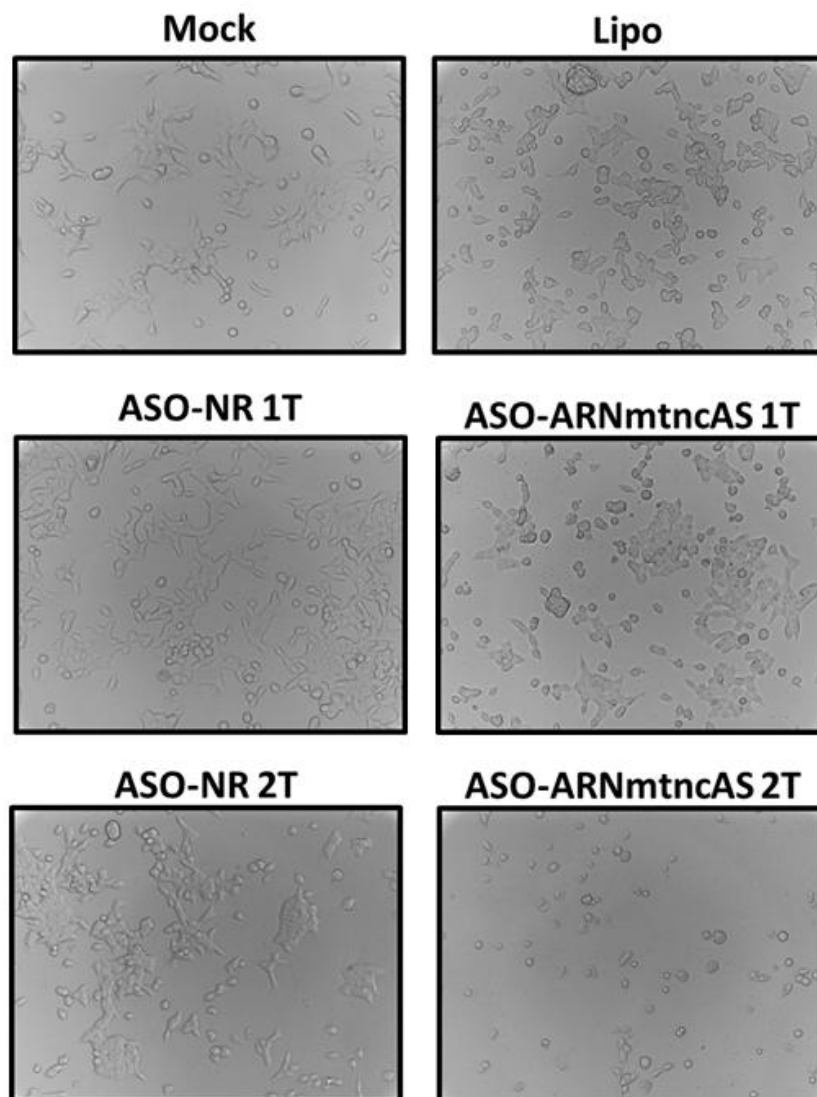


Figura 5. Efecto de la concentración del ASO-ARNmtncAS sobre la viabilidad celular en células Hepa 1-6. La imagen representa la diferencia entre los resultados obtenidos con las sondas ASO-NR y ASO-ARNmtncAS a los distintos tiempos post-transfección. 1T corresponde a la transfección simple 24h post-siembra. 2T corresponde transfección doble 48h post-siembra. El control negativo corresponde al ASO-NR, y los controles de células sin tratar (Mock) y tratadas en ausencia de lipofectamina (Lipo). Imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de campo claro (20X).

6.5.- Efecto de la interferencia del ASO anti ARNmtnc-AS sobre la muerte celular en células hepa 1-6

Para evaluar el efecto de la interferencia mediada por ASO de los ARNmtnc-AS, las células Hepa 1-6 fueron transfectadas con ASOs controles y específicos contra los transcritos antisentido a distintas concentraciones (50-300 nM) y se evaluó la muerte celular mediante incorporación de azul de Tripán. El análisis muestra que las células transfectadas con ASO anti ARNmtnc-AS a una concentración de 150 nM, presentó el máximo efecto correspondiente a un 35% aproximadamente de muerte celular en comparación con las demás concentraciones y los controles (Figura 6).

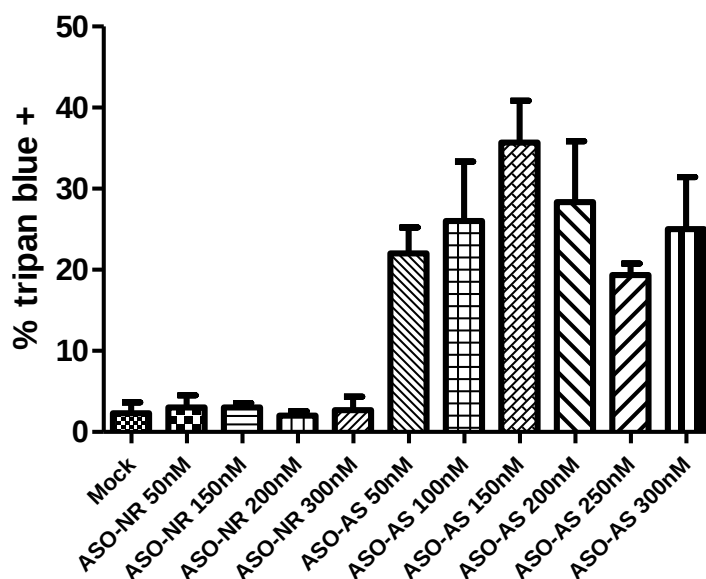


Figura 6: Efecto de la concentración del ASO-ARNmtncAS en la muerte celular de células Hepa 1-6 mediante azul de tripán. Células Hepa 1-6 fueron transfectadas a distintas concentraciones del ASO anti ARNmtnc-AS (50-300 nM) a las 24 y 48 h post siembra. El control negativo corresponde control sin tratar (Mock) y al ASO-NR. La muerte celular fue determinada utilizando el método de exclusión con azul de Tripán a las 24 h post segunda transfección. Resultado muestra promedio de cuatro experimentos independientes ($n=4$, $\bar{x} \pm \text{SEM}$).

Para confirmar los datos anteriores se analizó la muerte celular a través de la incorporación de ioduro de propidio mediante citometría de flujo ya que esta técnica es más sensible que el conteo por azul de tripán. Al analizar los resultados se comprobó la misma tendencia observada con el conteo por azul de tripán siendo el tratamiento con ASO anti ARNm_{tnc}-AS a una concentración de 150 nM el que presenta mayor muerte celular en comparación a los otros grupos (Figura 7). El porcentaje de muerte observado mediante incorporación de ioduro de propidio fue aproximadamente un 10% mayor que la muerte observada al cuantificar mediante conteo por azul de tripán.

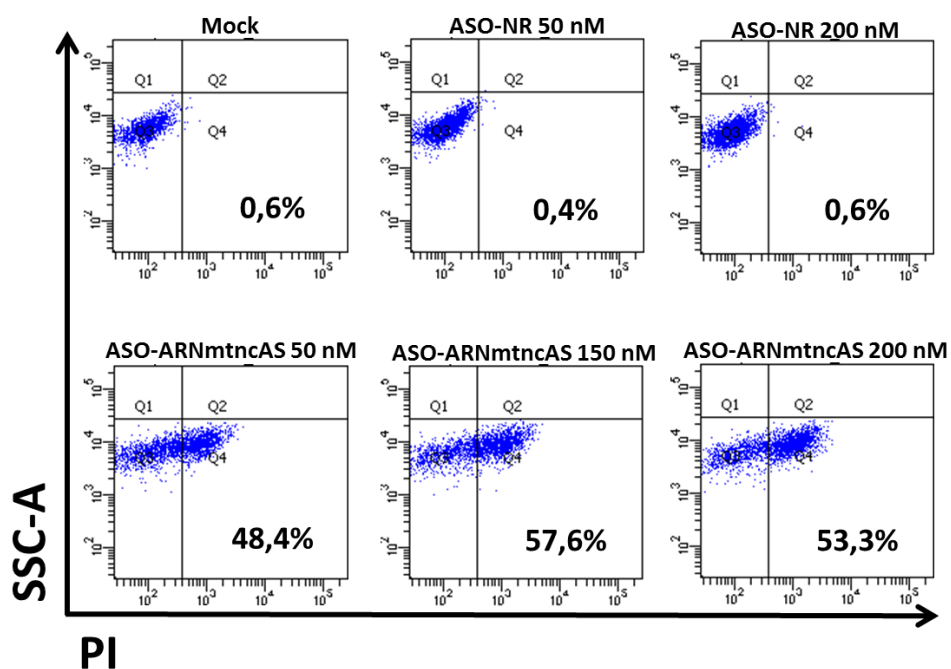


Figura 7: Citometría de flujo del efecto de la concentración del ASO ARNm_{tnc}-AS en la muerte celular de células Hepa 1-6. Células Hepa 1-6 fueron transfectadas a distintas concentraciones del ASO anti ARNm_{tnc}-AS (50nM-300nM) a las 24 y 48 h post siembra. El control negativo corresponde al ASO-NR, y el control sin tratar (Mock). La muerte celular fue determinada mediante la incorporación de ioduro de propidio 24 h post segunda transfección. La imagen muestra los resultados más representativos de las distintas concentraciones del ASO-NR y el ASO-ARNmtncAS. Resultado muestra promedio de cuatro experimentos independientes (n=4, x±SEM).

6.6.- Determinación de la muerte celular mediada por el ASO anti ARNmtnc-AS en células Hepa 1-6

Como se mencionó en el texto, Burzio y colaboradores describieron que al realizar interferencia de los ARNmtnc mediante ASOs en células tumorales se induce la muerte de éstas. Esto fue observado en una primera aproximación mediante el método de exclusión de azul de tripán e incorporación de ioduro de propidio, con los cuales se evidenció un aumento de la muerte celular en las células tratadas con ASO anti ARNmtnc-AS (Figuras 6 y 7). La muerte celular producto de la interferencia del ASO fue confirmada mediante el ensayo de TUNEL, el cual es un marcador estándar de apoptosis. Al analizar la fragmentación de ADN 24 horas post segunda transfección, se observaron células TUNEL-positivas en los grupos tratados con ASO anti ARNmtnc-AS en comparación a los grupos controles (Figura 8).

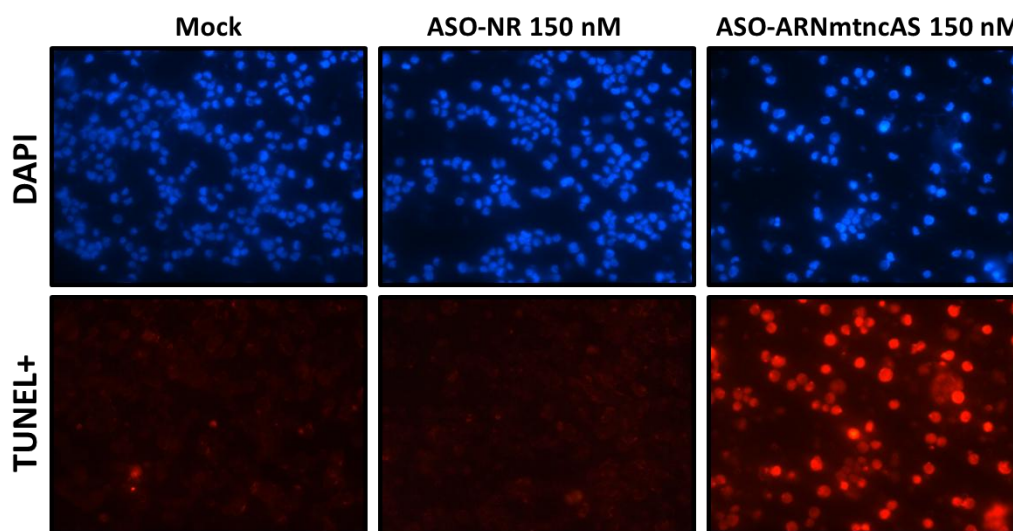


Figura 8: Fragmentación del ADN en células Hepa 1-6. Células Hepa 1-6 fueron transfectadas con el ASO-ARNmtncAS a las 24 y 48 h. Como control se utilizó la sonda ASO-NR. 24 h post segunda transfección, fueron analizadas por TUNEL y contrateñidas con DAPI mediante microscopia de fluorescencia. La tinción con DAPI revela una masiva fragmentación nuclear en los tratamientos con ASO-ARNmtncAS que no se observa en las células tratadas con el ASO-NR. Como control positivo de fragmentación de ADN se utilizó el tratamiento con DNasa I (20X).

6.7.- Efecto de la interferencia del ARNmtnc-AS sobre la proliferación celular en células hepa 1-6

Además del efecto sobre la muerte celular gatillado por la interferencia de los ARNmtnc-AS Burzio y colaboradores también describieron un efecto sobre la proliferación celular. Para esto se procedió con el protocolo de doble transfección descrito anteriormente y se analizó como parámetro de proliferación celular la incorporación de un análogo de bromodeoxiuridina (BrdU) denominado EdU, donde las células que proliferan menos incorporan menos de este análogo. Al evaluar los diferentes grupos se pudo observar una disminución en la incorporación de EdU en las células tratadas con ASO anti ARNmtnc-AS en todas las concentraciones utilizadas en comparación a los grupos control tratados con ASO no relacionado o control Mock sin tratar (Figura 9).

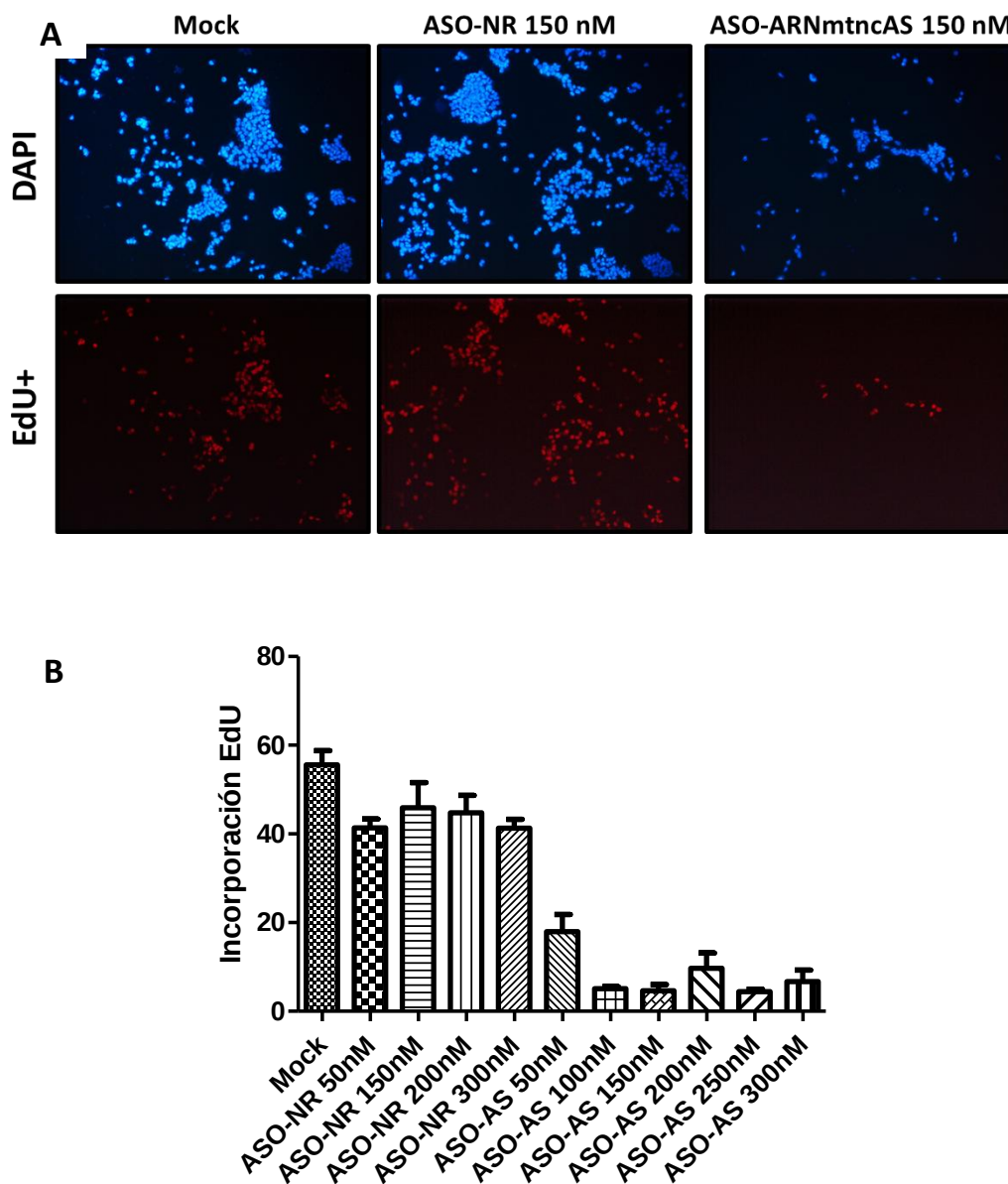


Figura 9. Inhibición de la proliferación celular. Las células fueron transfectadas con distintas concentraciones del ASO anti ARNmtnc-AS (50-300 nM) a las 24 y 48 h post transfección. Como control se utilizó la sonda ASO-NR. Posteriormente fueron analizadas por EdU y contrateñidas con DAPI mediante microscopia de fluorescencia. (A) Imágenes de epifluorescencia de los tratamientos a las 24h post segunda transfección (20X). En rojo se observa las células que incorporaron EdU, y en azul se observa el total de las células teñidas con DAPI. (B) La gráfica muestra la cuantificación de la incorporación de EdU para cada uno de los tratamientos.

VII. DISCUSIONES

En este estudio se reporta que la interferencia del ARNmtnc-AS mediada por ASOs en células de hepatocarcinoma murino disminuye su proliferación e induce muerte celular de manera *in vitro*. A continuación, se discutirán los hallazgos encontrados durante el estudio, contrastándolos con la información disponible en la literatura cuando corresponda y se determinarán las principales fortalezas y debilidades de la aproximación metodológica utilizada. El primer objetivo de esta tesis fue el analizar si la línea celular que se planteó utilizar realmente presentaba el patrón de expresión de los ARNmtnc del tipo tumoral mediante hibridización *in situ*. Si bien la técnica de la HIS no permite cuantificar los niveles de expresión de los transcritos que se están observando, si permite discriminar entre la presencia o no de éstos. La manera más adecuada para poder cuantificar los niveles de transcrito sería utilizando técnicas las que permitan medir la cantidad de copias del transcrito analizado. Dentro de éstas las más utilizadas son el northern blot y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (Real time-PCR) (Villegas, Burzio *et al.*, 2007). Para efecto de esta tesis se planteó el uso de CISH porque era suficiente para alcanzar el objetivo propuesto, tal como lo descrito por Burzio y colaboradores (Burzio, Villota *et al.*, 2009). Los resultados mostraron el patrón de expresión típico de una célula tumoral en las células Hepa 1-6 con presencia de los ARNmtnc-S y casi nula marca del ARNmtnc-AS. Estos resultados no implican que no hay expresión de los ARNmtnc-AS, sólo refleja que la sensibilidad de la técnica no es suficiente para detectar la baja expresión de éstos. Esto queda demostrado por estudios realizados en el laboratorio (Burzio, Villota *et al.*, 2009), en donde utilizando PCR en tiempo real, observaron expresión de los transcritos antisentido. Un punto importante dentro de este estudio era evaluar si las células Hepa 1-6 eran capaces de ser transfectadas, y por lo tanto un factor a considerar fue el tipo de vector a utilizar, ya que las características del ADN obligan a utilizar un medio de entrega de éste a la célula. En la actualidad existen distintos tipos de vectores para la entrega de un transgen a la célula, y dentro de éstos los liposomas catiónicos son los más utilizados en sistemas *in vitro* (Rocha *et al.*, 2002). Entre sus ventajas destaca que es un método simple y reproducible, el cual facilita el transporte del ADN al núcleo al protegerlo de las nucleasas intracelulares cuando se introduce en las células (Rocha *et al.*, 2002). En general, los liposomas aumentan

la absorción del ASO sobre 1000 veces y se estima que la endocitosis es la principal vía por la que ingresan a la célula (Lisio y Wu-Pong, 2003). Teóricamente, los liposomas catiónicos interactúan eficientemente con las moléculas cargadas negativamente, principalmente a través de interacciones electrostáticas (Lonez, Vandenbranden *et al.*, 2008). Estas interacciones entre los complejos de lípidos catiónicos cargados positivamente con el ASO cargado negativamente, facilitan la interacción del complejo con la superficie de la membrana plasmática (Felgner, Holm *et al.*, 1989), lo que mejora significativamente su captación por las células, conduciendo a un mejoramiento en la entrega de los oligonucleótidos (Lonez, Vandenbranden *et al.* 2008). Se ha demostrado en protocolos rutinarios que la eficiencia de transfección varía enormemente dependiendo de la concentración del ASO utilizado, del modelo celular, la composición lipídica, entre otros (Felgner, Holm *et al.* 1989). Con estos antecedentes, decidimos evaluar la eficiencia de la transfección de nuestras células utilizando un protocolo estándar de un liposoma catiónico comercial (lipofectamina) a distintas concentraciones de un ASO fluorescente. Nosotros observamos que a medida que aumentamos la concentración del ASO, aumentábamos el porcentaje de transfección de las células hasta llegar a un máximo de aproximadamente 65% desde una concentración 150 nM o mayor. Estos datos nos permitieron acotar el rango de concentración a utilizar en nuestros ensayos entre 150 y 200 nM de concentración del ASO.

Desde hace más de tres décadas, los ASOs han sido utilizados para la modulación de la expresión génica y para el desarrollo de nuevas terapias clínicas (Zamecnik y Stephenson, 1978). En un comienzo los primeros ASOs sintetizados fueron los ASOs fosfodiéster, pero su uso en experimentos antisentido se vió limitado debido a que éstos eran rápidamente degradados por la acción de las endonucleasas y exonucleasas intracelulares. Uno de de las opciones para solucionar esta problemática fue mediante el desarrollo de modificaciones químicas exitosas (Dias y Stein, 2002). Los ASOs fosforotiatos corresponden a los oligonucleótidos modificados más estudiados, éstos son altamente solubles, presentan estabilidad contra las nucleasas, son relativamente fáciles de sintetizar, poseen una excelente actividad antisentido y son capaces de potenciar la actividad de la ARNasa H (Stein y Cheng, 1993). Estos antecedentes guiaron para utilizar ASOs fosforotiatos en los

ensayos *in vitro* realizados durante este trabajo, para evaluar la viabilidad de las células Hepa 1-6 enfrentadas a la interferencia de los ARNmtnc-AS mediada por éstos. En un principio al realizar las transfecciones de los ASOs dirigidos contra los ARNmtnc-AS, éstas no presentaban una disminución de la viabilidad celular observada por microscopia de campo claro y medida por la cantidad de células viables denotadas por azul de tripán, lo cual se contradecía con los resultados esperados. Ensayos anteriores realizados en el laboratorio con distintas líneas celulares tumorales demostraron que algunos tipos de líneas celulares necesitaban más de una transfección para visualizar este efecto, esto se explica por la diferencia en la cantidad de ARNmtnc-AS en cada tipo celular (Oliveira L., 2012. En preparación) como lo que ocurre con otros genes debido a la diversidad genética de cada tipo celular tanto en células normales como tumorales (Zhang L. *et al.* 1997). Al realizar una doble transfección de las células Hepa 1-6 a las 24 y 48 horas post siembra se observó mediante microscopia de campo claro una disminución en el crecimiento de las células tratadas con ASO anti ARNmtnc-AS en comparación a los controles y a las transfecciones simples, por lo que los siguientes ensayos se realizaron con un protocolo de doble transfección. Ahora bien, al analizar la muerte de las células sometidas a distintas concentraciones de ASO dirigidos a los ARNmtnc-AS como ASO NR mediante azul de tripán se pudo observar un máximo de muerte celular de un 35% aproximadamente a una concentración de 150 nM lo que coincide con la concentración con la cual se obtuvo el máximo de transfección. Este mismo efecto fue observado al medir mediante citometría de flujo la incorporación de yoduro de propidio en las células tratadas con el ASO anti ARNmtnc-AS, siendo esta técnica más sensible y señalando una máxima eficiencia de transfección de un 57,6% a esta misma concentración. Para comprobar si la muerte inducida por la interferencia de los ARNmtnc-AS mediada por ASO gatillaba eventos de apoptosis se utilizó el parámetro de fragmentación de ADN evaluado mediante la técnica de TUNEL. Los resultados evidenciaron que la interferencia de los ARNmtnc-AS mediada por ASOs gatillaban la fragmentación del ADN en las células Hepa 1-6, lo cual fue consistente con los resultados presentados anteriormente por Burzio y colaboradores (Vidaurre, 2012, en preparación) en donde observaron la activación de la vía intrínseca de la apoptosis al interferir los ARNmtnc-AS con ASOs en distintas líneas de células tumorales, lo que

podría sugerir un rol anti-apoptótico del ARNmtnc-AS regulando la expresión de genes involucrados en apoptosis.

Finalmente, después de evaluar que la interferencia de los ARNmtnc-AS tenía efecto sobre la apoptosis, se evaluó si también lo tenía sobre la proliferación celular. Los resultados mostraron una disminución de la proliferación de las células tratadas con el ASO anti ARNmtnc-AS en comparación con los controles. Este efecto podría explicarse debido a la posible generación de siRNAs endógenos provenientes de la degradación de los ARNmtnc-AS. La generación de siRNA endógenos ha sido descrita anteriormente en *Drosophila melanogaster* (Okamura *et al.*, 2008) y una situación como ésta podría estar ocurriendo en este caso. Los posibles siRNAs provenientes de la degradación de los ARNmtnc-AS podrían ser complementarios a los ARNmtnc-S, y por lo tanto tendrían la posibilidad de interferirlos inhibiendo la posible función de éstos en la proliferación celular (Villegas, Burzio *et al.*, 2007). Estos resultados serían consistentes con los antecedentes presentados por Villota y colaboradores, en los cuales al realizar interferencia del ARNmtnc-S con ASOs en células SiHa y HeLa observaron una disminución en la proliferación celular (Villota *et al.*, 2012).

La información generada, si bien es muy preliminar, sugiere que la entrega de interferentes tales como ASOs dirigidos contra el ARNmtnc-AS representaría una estrategia promisorio hacia el desarrollo de una potencial terapia contra el HCC. Como perspectivas futuras para la continuación de este trabajo se deberían realizar estudios en modelos animales para comparar si los efectos observados de forma *in vitro* se producirían de manera *in vivo*.

IX. CONCLUSIONES

A modo de conclusión, los principales resultados que se dieron durante esta investigación pueden resumirse de la siguiente manera:

1. La proliferación celular determinada a través de la curva de crecimiento señaló que la línea Hepa 1-6 presenta un crecimiento exponencial, multiplicándose a razón de 2.5 veces cada 24 horas cuando éstas son mantenidas en cultivo.
2. La mayor eficiencia de transfección se produjo al usar una concentración 150 nM del ASO fluorescente, correspondiente a un 65%. Concentraciones más altas no mostraron diferencias significativas respecto a esta concentración.
3. Las células de hepatocarcinoma murino Hepa 1-6 transfectadas con ASO anti ARNmtnc-AS a concentración 150 nM dan cuenta del efecto del oligo sobre la muerte celular.
4. Las células de hepatocarcinoma murino Hepa 1-6 transfectadas con ASO anti ARNmtnc-AS a concentración 150 nM dan cuenta del efecto del oligo sobre la proliferación celular.
5. La técnica de incorporación de yoduro de propidio fue más sensible para determinar la muerte celular en comparación con el método de tinción con azul de tripán, donde hubo una diferencia de al menos 10% con esta última.
6. Estos estudios constituyen uno de los primeros reportes donde se observa el efecto de la interferencia del ARNmtnc-AS, sobre células tumorales de hepatocarcinoma murino de forma *in vitro*.
7. Como perspectivas futuras se espera confirmar estos resultados en un modelo murino *in vivo*, para seguir investigando el rol de estos ARNmtnc en la biología del cáncer hepático y así contribuir en el desarrollo de una posible terapia contra el HCC.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Brodersen P., Voinnet O. 2009. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(2) 141-148.
2. Bruix, J., M. Sala, *et al.* 2004. Chemoembolization for hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 127(5 Suppl 1): S179-188.
3. Bruix, J., M. Sherman, *et al.* 2011. Management of hepatocellular carcinoma: an update. *Hepatology* 53(3): 1020-1022.
4. Burzio, V., Villota C., *et al.* 2009. Expression of a family of noncoding mitochondrial RNAs distinguishes normal from cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 106(23): 9430-9434.
5. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM. 2004. Human microRNA genes frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 101(9):2999-3004.
6. Chen, R. X., Y. H. Xia, *et al.* 2011. Down-regulation of osteopontin inhibits metastasis of hepatocellular carcinoma cells via a mechanism involving MMP-2 and uPA. *Oncol Rep* 25(3): 803-808.
7. Dallas, A. y Vlassov A. 2006. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit* 12(4): RA67-74.
8. Dean, N. M. y Bennett C. F. 2003. Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 22(56): 9087-9096.
9. Dias, N. y Stein A. 2002. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 1(5): 347-355.
10. Eddy, S. R. 2001. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat Rev Genet* 2(12): 919-929.
11. Felgner, P. L., M. Holm, *et al.* 1989. Cationic liposome mediated transfection. *Proc West Pharmacol Soc* 32: 115-121.
12. Gabrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. 1992. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*; 119(3):493-501.
13. Gibb, E. A., C. J. Brown, *et al.* 2011. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer* 10: 38.
14. Gleave M. E., Monia B. P. 2005. Antisense therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 5(6): 468-479.
15. González J. 1995. Tumores primarios de hígado: Estudio morfológico, Clínico e Inmunohistoquímico. Universidad Complutense de Madrid- España Facultad de Medicina.
16. González S. 2003. Oligonucleotide drugs: The new weapons of the molecular biology against infectious agents.
17. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, Van De Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. 2010. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 464(7291):1071-1076.
18. Hanahan D, Weinberg RA. 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57-70.

19. Hepp K, J., P. Balbontín M, *et al.* 2010. Ictericia obstructiva secundaria a migración de fragmentos de hepatocarcinoma a la vía biliar. *Revista chilena de cirugía* 62: 399-403.
20. Hemming, A. W., Catral M. S., *et al.* 2001. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 233(5): 652-659.
21. Jyotsna A. Saonere. 2011. Antisense therapy, a magic bullet for the treatment of various diseases: Present and future prospects. *Journal of Medical Genetics and Genomics* Vol. 3(5), pp. 77 - 83.
22. Kapranov, P., Cheng J., *et al.* 2007. RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316(5830): 1484-1488.
23. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. 2007. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39(5):673-677.
24. Lee, J. 1999. Targeted mutagenesis of Tsix leads to nonrandom X inactivation. *Cell*. 1(99 (1)): p. 47-57
25. Lonz, C., M. Vandenbranden, *et al.* 2008. Cationic liposomal lipids: from gene carriers to cell signaling. *Prog Lipid Res* 47(5): 340-347.
26. Llovet, J. M., S. Ricci, *et al.* 2008. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 359(4): 378-390.
27. Mattick, J.S. 2004. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet.* 5(4): p. 316-23.
28. Mattick, J.S. y Makunin I.V. 2006. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet.* 15 Spec No 1: p. R17-29
29. Montero Boronat J. 2008. Papel del colesterol mitocondrial en la resistencia del carcinoma hepatocelular a la quimioterapia. Universidad de Barcelona. Departamento de Biología Celular y Anatomía Patológica.
30. Negrini M, Nicoloso MS, Caling GA. 2009. MicroRNAs and cancer – new paradigms in molecular oncology. *Curr Opin Cell Biol* 21(3):470-479.
31. Okamura K., Lai E. 2008. Endogenous small interfering RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, volume 9: p673
32. Organización Mundial de la Salud [OMS]. 2006. Día Mundial Contra el Cáncer: acción mundial para evitar 8 millones de muertes por cáncer de aquí a 2015. Comunicado de prensa.
33. Organización Mundial de la Salud [OMS]. Febrero de 2012. Cáncer. Nota descriptiva N°297.
34. Organización Mundial de la Salud. Julio de 2011. Cánceres de origen ambiental y ocupacional. Nota descriptiva N°350.
35. Rocha A., Ruiz S., Coll J.M. 2002. Estudios sobre translocación de complejos DNA-liposomas a través de membranas celulares para mejorar la transfección en células eucariontes (Revisión). *Invest. Agr.: Prod. Sanid. Anim.* Vol. 17 (1-2).
36. Roehr, B. 1998. Fomivirsen approved for CMV retinitis. *J Int Assoc Physicians AIDS Care* 4(10): 14-16.
37. Selcuklu SD, Yakicier MC, Erson AE (2009). An investigation of microRNAs mapping to breast cancer related genomic gain and loss regions. *Cancer Genet Cytogenet* 189(1):15-23
38. Soledad Vidaurre *et al.* 2012. en preparacion. Targeting the mitochondrial antisense ncRNAs as a therapeutic strategy for human cancer.
39. Takayama, T. y Makuuchi M. 2001. Ablation of hepatocellular carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 31(7): 297-298.

40. Samuel, M., P. K. Chow, *et al.* 2009. Neoadjuvant and adjuvant therapy for surgical resection of hepatocellular carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*(1): CD001199.
41. Stehelin D, Varmus HE, Bishop JM, Vogt PK. 1976. DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260(5547):170–173.
42. Stein, C. A. y Cheng Y. C. 1993. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents--is the bullet really magical?. *Science* 261(5124): 1004-1012.
43. Uribe M, García M, Chávez N, Román J. 2010. Carcinoma hepatocelular. *Revista de Gastroenterología de México*. Supl.2(75):168-176
44. Vega M, 2006. Biotecnología aplicada a la identificación y validación de dianas terapéuticas. 1ª ed., 1ª imp. Pp 17-20. ISBN(10): 84-609-8741-8.
45. Vidaurre S. 2012. Mecanismo celular de inducción de muerte celular al interferir con los RNAs mitocondriales no-codificantes. Tesis Doctoral en Biociencias Moleculares Universidad Andres Bello. Santiago, Chile. 117p.
46. Villegas, J., A. M. Zarraga, *et al.* 2000. A novel chimeric mitochondrial RNA localized in the nucleus of mouse sperm. *DNA Cell Biol* 19(9): 579-588.
47. Villegas, J., V. Burzio, *et al.* 2007. Expression of a novel non-coding mitochondrial RNA in human proliferating cells. *Nucleic Acids Res* 35(21): 7336-7347.
48. Villota C, *et al.* 2012. [Expression of mitochondrial non-coding RNAs \(ncRNAs\) is modulated by high risk human papillomavirus \(HPV\) oncogenes.](#) *J Biol Chem*. 287(25):21303-15.
49. Wilhelm, S. M., L. Adnane, *et al.* 2008. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther* 7(10): 3129-3140.
50. Ye, S. L., T. Takayama, *et al.* 2010. Current approaches to the treatment of early hepatocellular carcinoma. *Oncologist* 15 Suppl 4: 34-41.
51. Yuning Sun, Ruxian Lin, Jinming Dai, Dazhi Jin, and Sheng-Qi Wang. 2006. Oligonucleotides. *Winter*. 16(4): 365-374.
52. Zamecnik, P. C. y Stephenson M. L. 1978. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(1): 280-284.
53. Zhang L. *et al.* 1997. Gene Expression Profiles in Normal and Cancer Cells. *Science* vol. 276. No. 5316 pp. 1268-1272.