



Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Licenciatura en Química Farmacéutica Biológica

INFORME DE CONCLUSIÓN DE SERVICIO SOCIAL

Proyecto:

Papel de los microRNAs miR-34a-5p y miR-193a-5p en la regulación de los mecanismos asociados a la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

Presenta:

Sosa Sánchez Ana Laura

Matrícula:

2182029869

Correo:

anasosa310@gmail.com

Julio, 2023.

Lugar:

Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas

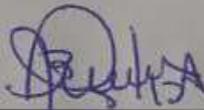
Fecha de inicio:

28/11/2022

Fecha de término:

28/06/2023

Asesor Externo:



Dra. Blanca Ortiz Quintero.
Departamento de Investigación en Bioquímica, INER.

Asesor Interno:



Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez.
Departamento de Sistemas Biológicos, UAM Xochimilco.

INTRODUCCIÓN

La fibrosis pulmonar idiopática (FPI) es una enfermedad pulmonar fibrosante progresiva de etiología desconocida para la cual no existe tratamiento efectivo. Evidencias sugieren que las anomalías pulmonares intersticiales (API) preceden el desarrollo de enfermedades intersticiales que progresan a FPI, sin embargo, los mecanismos involucrados en tal progresión son desconocidos. Recientemente, reportamos la sobreexpresión de siete microRNAs (miRNAs) en circulación de pacientes con API. Estos miRNAs se asociaron de predictivamente a vías que contribuyen a la patogénesis de la fibrosis pulmonar, tales como inflamación, TGF-beta y senescencia. En particular, el miR-34a-5p asocia fuertemente a mecanismos de patogénesis de FPI, y el miR-193a-5p presentó un buen valor diagnóstico para pacientes con API. En el presente estudio, se investigó el impacto funcional de estos dos miRNAs en la regulación de los mecanismos biológicos asociados al proceso fibrosante pulmonar y la potencial progresión a FPI, investigando el efecto de estos miRNAs en fibroblastos y células epiteliales pulmonares, que son las principales protagonistas de esta enfermedad.

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

Evaluar el papel funcional de los miRNAs miR-34a-5p y miR-193a-5p en los mecanismos asociados a la patogénesis de la fibrosis pulmonar.

METODOLOGÍA UTILIZADA

Para investigar el papel funcional de los miRNAs de interés, los miR-34a-5p y miR-193a-5p se sobreexpresaron mediante transfección *in vitro* de fibroblastos y células epiteliales pulmonares normales y fibroblastos provenientes de pacientes con fibrosis y FPI. Se analizaron los efectos mediante técnicas de Western Blot y PCR en tiempo real.

1. Cultivo celular

Se realizaron cultivos de fibroblastos pulmonares normales, utilizando dos líneas celulares: CCL-204 y "Normal Human Lung Fibroblasts" (NHFL). CCL-204 provenientes de la "American Type Culture Collection" (ATCC) y NHFL obtenidas de la marca Lonza Clonetics. Ambas células se sembraron en frascos de cultivo estériles de 75 cm² de área (T75), se despegaron y se realizó el conteo celular para su resiembra.

2. Transfección celular *in vitro*

Se llevó a cabo un primer ensayo utilizando ambas células. Para cada línea celular se sembraron 96,000 células por pozo, en placas de cultivo estériles de 6 pozos con área de 9.6 cm². En el caso de las células CCL204 se utilizó el medio DMEM Advanced (#12491015) y para las células NHFL medio F-12K, ambos de la marca Gibco. Cada medio se enriqueció previamente con 5% de Fetal Bovine Serum (SFB) y Glutamax.

Una vez que se obtuvo el 70% de confluencia de células en ambas placas, se retiró el medio anterior de cada una y se realizó la transfección, mediante la adición de oligonucleótidos llamados MIMICS (miR-34a-5p y miR-193a-5p), reactivos de transfección Dharmafect y Transfection Reagent (DRT) en medio Optimem. Después de 24 horas se retiró el medio a cada pozo y se agregó medio Advanced con 5% SFB, Glutamax y Primocin con antibiótico. Finalmente, se dejaron incubando por 72 horas para la extracción de ARN con Qiazol.

Posteriormente, se realizó un subcultivo con las mismas células (CCL-204 y NHLF) para realizar un segundo ensayo de MIMICS con miR-34a-5p y miR-193a-5p. Para ello, se sembraron 2 placas de 6 pozos para las células CCL-204 y 2 placas de 6 pozos para las células NHLF, siguiendo el procedimiento anterior.

3. Lisado de células

Después de las 72 horas se les retiró el medio y se lavaron con PBS para colocarlas en tubos y agregar el reactivo de lisis Qiazol. Finalmente, se almacenarán a -80°C.

4. Extracción de ARN

Para esta técnica se utilizó el kit Qiagen miRNeasy.

5. Western Blot

6. PCR

Para esta técnica se utilizó el kit de síntesis de miARN a ADNc Applied Biosystems, Taqman Advanced.

ACTIVIDADES REALIZADAS

- Cultivo celular

Durante el periodo comprendido entre noviembre 2022 a Junio 2023, se realizaron diversas actividades, entre ellas una revisión bibliográfica de distintas fuentes de información, sobre las técnicas asépticas, cultivos primarios, subcultivos y líneas celulares, crio preservación y conteo celular. Se comenzó con un periodo de entrenamiento, en donde se ensayó el manejo del material estéril y se prepararon soluciones y medios de cultivo en condiciones de esterilidad, haciendo uso de la cabina de seguridad.

Los ensayos se realizaron con dos líneas celulares distinta HeLa y A-549, cada una de ellas se trabajó de acuerdo con la ficha técnica descrita en el sitio web de "American Type Culture Collection" (ATCC).

Ambas líneas celulares se descongelaron y fueron puestas en frascos T75 con diferentes medios. En el caso de células HeLa se agregó Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) formulado por la ATCC número de catalogo 30, 2003. Para las células A-549 se empleó el medio F12K formulado por la ATCC número de catálogo 30, 2004. Para que ambos medios de crecimiento estuvieran completos, se agregó

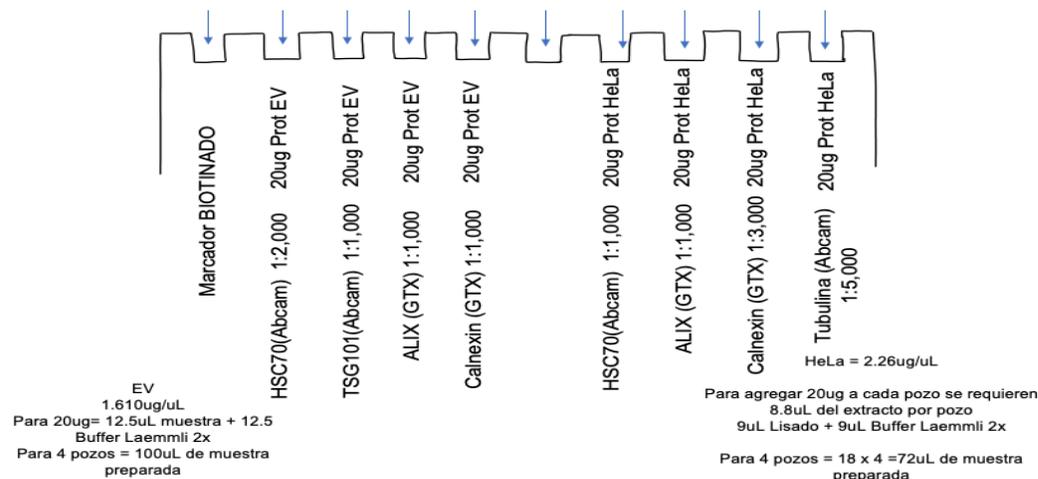
suero bovino fetal hasta una concentración final de 10%. Las células se incubaron a 37°C con 5% de CO₂.

Se observó el crecimiento de ambas células a las 24 horas. Posteriormente se realizó el conteo de las células utilizando el hematocitómetro y de acuerdo con la densidad celular obtenida se subcultivaron en nuevos frascos T75 para su preservación bajo las mismas condiciones.

- Western Blot

Esta técnica se utilizó con el fin de probar anticuerpos dirigidos a diferentes moléculas proteicas, tales como: Heat shock cognate 70 kDa (HSC70, marca Abcam), Tumor susceptibility gene 101 (TSG101, marca Abcam), Alix (marca GeneTex) y Calnexin (marca GeneTex), en un nuevo extracto de proteínas *Extracellular vesicles* (EVs). Así como HSC70 (marca Abcam), Alix (marca GeneTex), Calnexin (marca GeneTex) y Tubulina (marca Abcam) en un extracto de células HeLa. Para ello, se utilizó un marcador de peso molecular Biotinyland Protein Ladder Detection Pack de Cell Signaling #7727 y un buffer 2X Laemmli. Se cargaron las cantidades correspondientes en los pocillos del gel, junto con el marcador de peso molecular, como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Cargas de muestras en el gel.



- PCR en tiempo real

También, se llevó a cabo la preparación de los oligonucleótidos miR-34a-5p y miR-193a-5p, haciendo alícuotas de cada uno, para obtener una concentración de 10 nM. Después, se realizó la técnica de PCR utilizando el kit TaqMan Advanced miRNA Assays. Para ello, se hicieron diluciones seriadas de las alícuotas de miR-34a-5p, miR-193a-5p y miR-cel-39, para obtener una concentración de 0.2 mM. Se llevaron a cabo las reacciones de Poly A, Ligadura, Transcriptasa reversa y MIR-AMP, para la preparación de la placa de PCR se usó miR-34 solamente, con el fin de obtener

una curva estándar. La r^2 obtenida en la curva estándar fue de 0.999, asegurando así un ajuste lineal correcto.

- Cultivo celular y ensayos de transfección de microRNAs

Asimismo, se realizaron cultivos de fibroblastos pulmonares normales. Primero, se descongelaron las células CCL-204 y CCL-210 provenientes de la “American Type Culture Collection” (ATCC), y se sembraron en frascos de cultivo de 75 cm² de área (T75.) Posteriormente, ambas células fueron observadas al microscopio. Al notar que las células CCL210 se encontraban muertas, se desecharon. Para el caso de las células CCL204, se despegaron y contaron para su resiembra en una placa de 6 pozos, sembrando 96,000 cél/pozo con medio DMEM Advanced, para que una vez que se obtuviera una cantidad considerable de células se llevará a cabo la extracción de ARN con Qiazol. Además, debido a que hubo una cantidad remanente de células, se hizo un banco celular con el resto de las células.

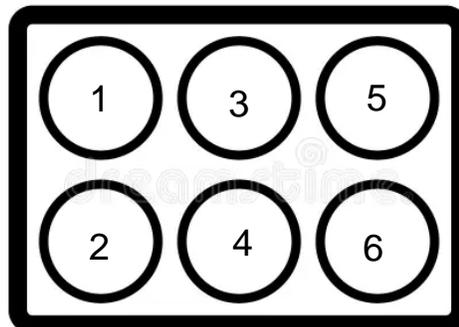
Conjuntamente, se realizó cultivo celular con células “Normal Human Lung Fibroblasts” (NHLF), obtenidas de la marca Lonza Clonetics. Estas fueron sembradas en una placa de 6 pozos, utilizando medio F12k, 5% SFB y Glutamax. Una vez que se obtuvo el 70% de confluencia, se retiró el medio anterior y se realizó la transfección, mediante la adición de oligonucleótidos llamados MIMICS (miR-34a-5p y miR-193a-5p), reactivos de transfección Dharmafect y Transfection Reagent (DRT) en medio Optimem. Después de 24 horas se retiró el medio a cada pozo se agregó el medio Advanced, 5% SFB, Glutamax y Primocin con antibiótico. Finalmente, se dejaron incubando por 72 horas para la extracción de ARN con Qiazol.

Posteriormente, se realizó un subcultivo de células NHLF y CCL-204 para realizar otro ensayo de MIMICS con miR-34a-5p y miR-193a-5p. Para ello, se sembraron 2 placas de 6 pozos para NHLF y 2 placas de 6 pozos para CCL-204. A continuación, se muestra la placa y la solución que contenía cada pozo:

1 y 2: Medio Optimem, Dharmafect y DTR.

3 y 4: Medio Optimem, DTR y miR-34a-5p

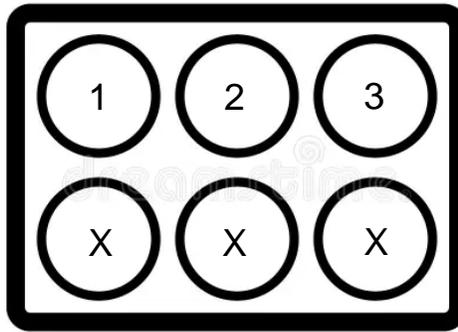
5 y 6: Medio Optimem, DRT y miR-193a-5p



1: Medio Optimem y DRT

2: Medio Optimem, DTR y miR-34a-5p

3: Medio Optimem, DTR y miR-193a-5p



Este orden se siguió tanto para las placas con NHLF como para las CCL-204. Las placas con los 6 pozos se dejaron incubando 72 horas, mientras que las de 3 pozos se usaron 48 horas, ambas para que se hiciera la extracción de ARN en Qiazol. La extracción se llevó a cabo utilizando el mini kit miRNeasy®, marca Qiagen y se midió la cantidad de ARN en un espectrofotómetro (Nanodrop) marca Thermo Fisher Scientific, con una absorbancia de 260 y 280 nm.

Una vez que se obtuvo la concentración de ARN, se procedió a obtener el DNA copia (cDNA) y se preparó la placa para cuantificar microRNAs mediante PCR. Para ello, se utilizaron los miRNAs: miR-193a-5p, miR-34a-5p, y los normalizadores U6snRNA y cel-miR-39. Una vez preparada la placa, se procedió a su lectura en el equipo Applied Biosystems™ StepOne™ Real-Time PCR System y se tomaron los valores de ct (ciclo umbral) para la interpretación de los resultados.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

Western Blot

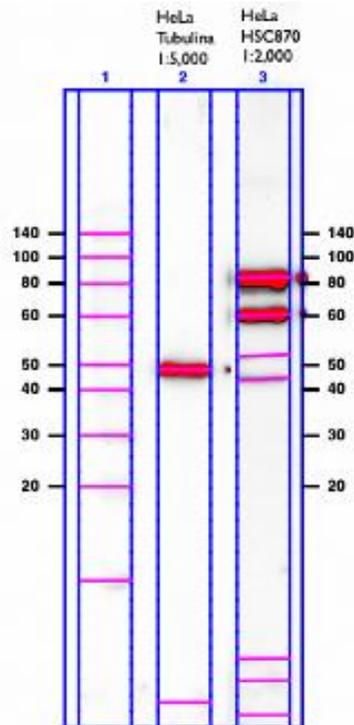
Los resultados obtenidos mostraron algunas irregularidades en los pesos moleculares, debido a que la membrana de transferencia fue volteada durante el proceso. Por lo que, se tuvo que corroborar el error anterior haciendo un Stripping, que consistió en la eliminación del anticuerpo primario de la membrana de Western Blot.

El Stripping se realizó en dos tiras con extractos de células HeLa, con HSC70 (1:2,000) y Tubulina (1:5,000) utilizando la solución Restore Western Blot Stripping Buffer, de la marca Thermo Scientific #21059 y agregando como anticuerpo secundario Goat x Rabbit a 1:3,000. En el revelado (Figura 2), las bandas obtenidas para HSC70 y Tubulina coincidieron con los pesos moleculares de las moléculas a las que se unen los anticuerpos (Tabla 1), por lo tanto, se realizó otro Stripping con el fin de probar otros anticuerpos dirigidos a diferentes moléculas proteicas.

Tabla 1. Pesos moleculares de las moléculas a las que se unen los anticuerpos.

Anticuerpo	Marca	Peso molecular (kDa)
HSC70	Abcam	70
TSG101	Abcam	~48
Alix	Genetex	~96
Calnexin	Genetex	90
Tubulina	Abcam	50
CD9	Abcam	25

Figura 2. Western Blot con extractos de células HeLa.



En el siguiente Stripping se utilizaron cuatro tiras con extractos de células HeLa y dos tiras con extractos de EVs. Para las tiras con células HeLa se ocuparon dos con el anticuerpo CD9 (Marca Abcam, en 1:1,000 y 1:2,000), dos con Tubulina (1:1,500) y como anticuerpo secundario Goat x Rabbit (1:3,000) para CD9 y Goat anti-Rabbit IgG (1:3,000 y 1:5,000) para Tubulina. En el caso de las tiras con EVs, se utilizó el anticuerpo CD9 (1:1,000 y 1:2,000) y como anticuerpo secundario Goat x Rabbit (1:3,000).

La revelación de bandas en EVs (Figura 3) fueron visibles, pero como estas tiras fueron utilizadas previamente con otros anticuerpos las bandas corresponden a un peso molecular menor al de CD9 (Tabla 1). En el caso de las bandas con extractos de células HeLa y CD9 (Figura 4) se puede observar que no se marcaron completamente, solo se aprecia una leve banda en la dilución 1:1,000.

Figura 3. Western Blot de EVs con CD9

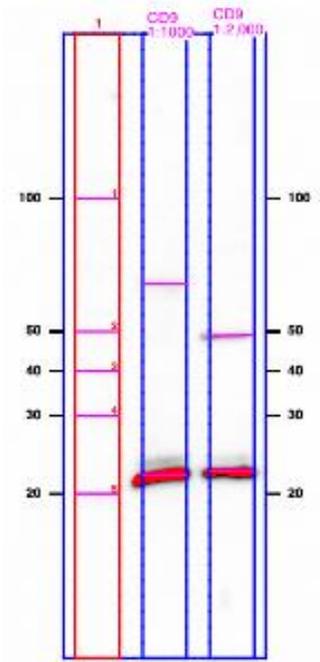
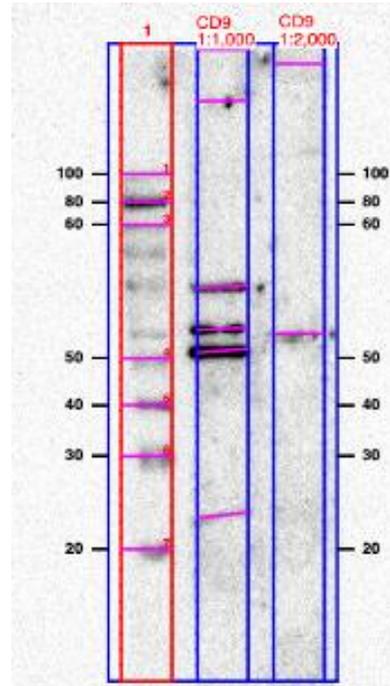
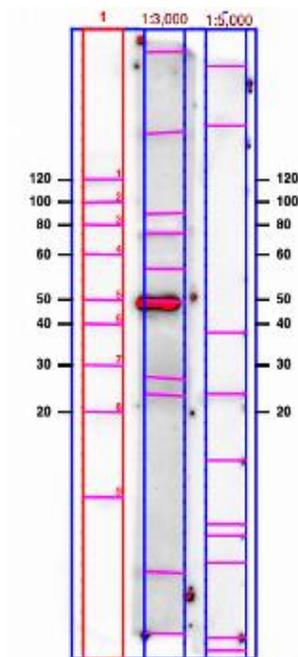


Figura 4. Western Blot de HeLa con CD9



Finalmente, las bandas obtenidas con las células HeLa y Tubulina (Figura 5) mostraron una buena marcación con el anticuerpo secundario en una dilución 1:3,000 pero en la dilución 1:5,000 no se marcó nada.

Figura 5. Western Blot de HeLa con Tubulina



PCR en tiempo real

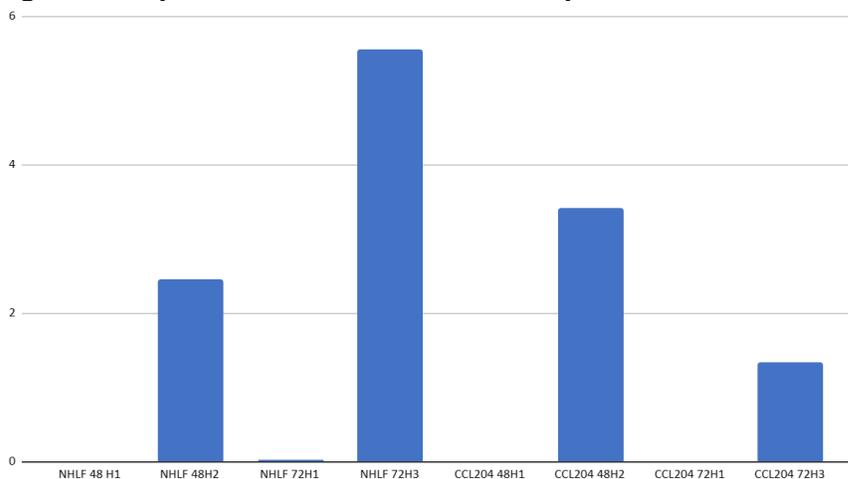
En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el PCR para miR-34a-5p, en donde se observa que la expresión basal promedio en las células NHLF (ctrl) es de 33, mientras que, para las células CCL-204 (ctrl) es de 32. Para la expresión con el MIMIC a las 72 h y 48 h, fue de 24 con células NHLF y ~25 para células CCL-204. De modo que, la expresión incrementó respecto a la expresión basal.

Tabla 2. Resultados PCR de miR-34a-5p

SAMPLE	Ct	Promedio
NHLF 48 H1 (ctrl)	32,97396088	33,42399979
NHLF 48 H1 (ctrl)	33,8740387	
NHLF 48H2	25,2550621	25,04855347
NHLF 48H2	24,84204483	
NHLF 72H1	32,07627106	32,11196899
NHLF 72H1	32,14766693	
NHLF 72H3	24,20651627	24,19145679
NHLF 72H3	24,17639732	
CCL204 48H1 (ctrl)	32,69752121	32,62154579
CCL204 48H1 (ctrl)	32,54557037	
CCL204 48H2	24,2102108	24,48972893
CCL204 48H2	24,76924706	
CCL204 72H1	32,77184677	33,23239708
CCL204 72H1	33,69294739	
CCL204 72H3	25,92520142	25,99762154
CCL204 72H3	26,07004166	

La figura 6, muestra gráficamente la expresión relativa de miR-34a-5p, en donde se puede observar con mayor detalle el incremento de la expresión basal con respecto al MIMIC.

Figura 6. Expresión relativa de miR-34a-5p



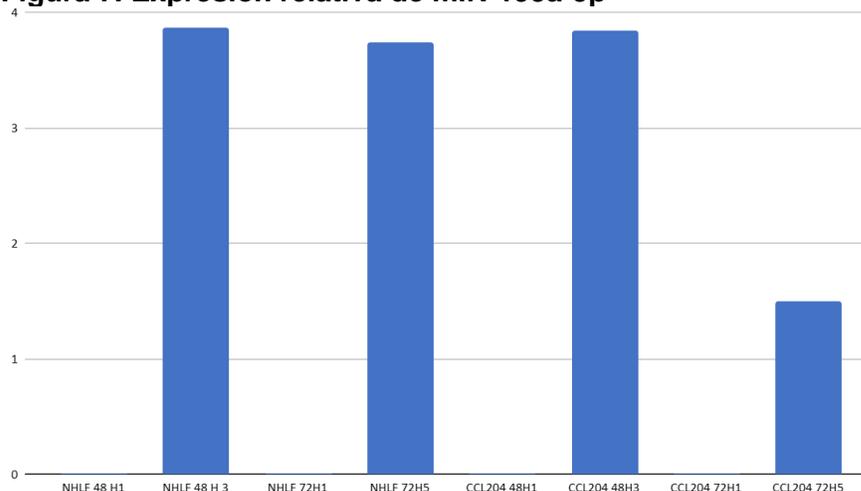
En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos en el PCR para miR-193a-5p, se observa que la expresión basal promedio en las células NHLF (ctrl) es de 34, mientras que, para las células CCL-204 (ctrl) es de 33. Para la expresión con el MIMIC a las 72 h y 48 h, fue de 24 para ambas células. Al igual que miR-34a-5p, la expresión incrementó respecto a la expresión basal.

Tabla 3. Resultados PCR de miR-193a-5p

SAMPLE	Ct	Promedio
NHLF 48 H1	34,23469543	35,09992027
NHLF 48 H1	35,96514511	
NHLF 48 H 3	24,27918434	24,3425169
NHLF 48 H 3	24,40584946	
NHLF 72H1	33,76500702	33,69775772
NHLF 72H1	33,63050842	
NHLF 72H5	25,14198685	25,16965389
NHLF 72H5	25,19732094	
CCL204 48H1	33,68751907	33,63566971
CCL204 48H1	33,58382034	
CCL204 48H3	24,01822662	24,13089275
CCL204 48H3	24,24355888	
CCL204 72H1	33,69981003	33,72731018
CCL204 72H1	33,75481033	
CCL204 72H5	25,71311569	25,55841064
CCL204 72H5	25,4037056	

En la figura 7, se muestra gráficamente la expresión relativa de miR-193a-5p, en donde se puede observar con mayor detalle el incremento de la expresión basal con respecto al MIMIC.

Figura 7. Expresión relativa de miR-193a-5p



Por último, se concluyó que hubo más incremento en la expresión a las 48 h, por lo que se decidió que sería conveniente hacer los ensayos posteriores a ese tiempo. Además se probó que cel-miR-39 y U6snRNA tuvieron una concentración baja en comparación a la esperada y en consecuencia cel-miR-39 no se usó como normalizador.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Raghu G, Collard HR, Egan JJ, Martinez FJ, Behr J, Brown KK, et al. An official ATS/ERS/JRS/ALAT statement: idiopathic pulmonary fibrosis: evidence-based guidelines for diagnosis and management. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(6):788-824.

Lederer DJ, Martinez FJ. Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *N Engl J Med.* 2018;378(19):1811-23.

Hutchinson J, Fogarty A, Hubbard R, McKeever T. Global incidence and mortality of idiopathic pulmonary fibrosis: a systematic review. *Eur Respir J.* 2015;46(3):795-806.

Selman M, Pardo A. Revealing the pathogenic and aging-related mechanisms of the enigmatic idiopathic pulmonary fibrosis. an integral model. *Am J Respir Crit Care Med.* 2014;189(10):1161-72.

Hata A, Schiebler ML, Lynch DA, Hatabu H. Interstitial Lung Abnormalities: State of the Art. *Radiology.* 2021;301(1):19-34.

Putman RK, Hatabu H, Araki T, Gudmundsson G, Gao W, Nishino M, et al. Association Between Interstitial Lung Abnormalities and All-Cause Mortality. *JAMA.* 2016;315(7):672-81.

Hunninghake GM. Interstitial lung abnormalities: erecting fences in the path towards advanced pulmonary fibrosis. *Thorax.* 2019;74(5):506-11.

Hobbs BD, Putman RK, Araki T, Nishino M, Gudmundsson G, Gudnason V, et al. Overlap of Genetic Risk between Interstitial Lung Abnormalities and Idiopathic Pulmonary Fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2019;200(11):1402-13.

Wells AU, Kokosi MA. Subclinical Interstitial Lung Abnormalities: Toward the Early Detection of Idiopathic Pulmonary Fibrosis? *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;194(12):1445-6.

Ortiz-Quintero B, Buendia-Roldan I, Ramirez-Salazar EG, Balderas-Martinez YI, Ramirez-Rodriguez SL, Martinez-Espinosa K, et al. Circulating microRNA Signature Associated to Interstitial Lung Abnormalities in Respiratory Asymptomatic Subjects. *Cells.* 2020;9(6).