

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



Trabajo Fin de Grado
Grado en Biología

Efecto de las estatinas en la regulación de miRNA en hepatoma

Autor:

Unai Galicia García

Director:

César Martín Plágaro

Resumen

En el presente estudio se han analizado los niveles de expresión de diferentes microRNA (miR-122, miR-33a y miR-27b) en células tanto hepáticas (HepG2) como pancreáticas (PANC-1) en respuesta al tratamiento con estatinas de tipo 1 (sinvastatina y pravastatina) y tipo 2 (atorvastatina y rosuvastatina) durante 24 y 48 horas. De esta forma, se pretende establecer una relación entre la sobreexpresión de los miRNA provocada por el tratamiento con estatinas y los posibles efectos secundarios asociados a dicho tratamiento como puede ser diabetes mellitus tipo 2.

Abstract

In this study, the expression levels of some different miRNAs (miR-122, miR-33a and miR-27b) both in hepatic (HepG2) and pancreatic cells (PANC-1) under treatment of type 1 statins (simvastatin and pravastatin) and type 2 (atorvastatin and rosuvastatin) for 24 and 48 hours have been analyzed. Thereby, the objective is to establish a relation between the over expression of those miRNAs caused by the statine treatment and some of the side effects associated to that treatment as diabetes mellitus type 2.

Índice

| | |
|--|-------|
| 1. Introducción..... | 4-6 |
| 2. Hipótesis y objetivos..... | 7 |
| 3. Material y métodos..... | 8-11 |
| 3.1 Análisis bioinformático | |
| 3.2 Cultivos celulares | |
| 3.3 Tratamiento con estatinas | |
| 3.4 Extracción de miRNA | |
| 3.5 RT-PCR | |
| 3.6 qRT-PCR | |
| 3.7 Inducción a la secreción de VLDL en células HepG2 | |
| 3.8 Purificación de VLDL | |
| 3.9 Detección de VLDL por electroforesis en gel de poliacrilamida | |
| 3.10 Análisis estadístico | |
| 4. Resultados..... | 12-20 |
| 4.1 Análisis bioinformático de miR-33a, miR122 y miR27b | |
| 4.2 Análisis de la expresión de miR33a en células HepG2 y en sus medios de cultivo con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas | |
| 4.3 Análisis de la expresión de miR-122 en células HepG2 y en sus medios de cultivo con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas | |
| 4.4 Análisis de la expresión de miR-27b en células HepG2 y en sus medios de cultivo con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas | |
| 4.5 Expresión de miR-27b en células PANC-1 | |
| 4.6 Purificación de VLDL a partir de medios de cultivo de células HepG2 | |
| 4.7 Expresión de miR-27b en VLDL purificadas | |
| 5. Discusión..... | 21-24 |
| 6. Bibliografía..... | 25-26 |

1. Introducción

Los microRNAs (miRNA) son pequeñas moléculas de RNA no codificantes y de una sola hebra con capacidad de regular la expresión génica de forma post-transcripcional. En animales, los miRNA controlan la expresión de sus genes diana actuando principalmente como inhibidores específicos de secuencia del RNA mensajero (mRNA). Los miRNA son transcritos en el núcleo mediante la RNA polimerasa II a partir de genes individuales de miRNA, intrones de genes codificantes de proteínas o a partir de transcritos policistronicos que generalmente codifican multiples miRNAs relacionados (Goedke & Fernández-Hernando, 2011).

Tras la transcripción, son secuencialmente procesados tanto en el núcleo como en el citoplasma por un complejo de endonucleasas RNasa-III, Drosha y Dicer. En concreto, Drosha procesa el transcrito pri-miRNA a un precursor con estructura en horquilla de aproximadamente unos 70-100 nucleótidos (pre-miRNA), el cual es posteriormente transportado al citoplasma mediante la Exportina 5. Aquí, la enzima Dicer se une a la estructura con forma de horquilla y elimina el bucle terminal, generando así dos moléculas de una sola hebra (miRNA). Una de ellas es liberada y degradada, mientras que la otra se unirá al complejo silenciador inducido por RNA (RISC) (Pierce, 2009). El miRNA guía el complejo hasta el RNA diana, mediando así en su represión. La proteína Argonauta, un componente del complejo RISC, facilita en gran medida el proceso de emparejamiento entre el complejo y su mRNA diana, ya que muestra la región 5' del miRNA de forma que adopta la posición óptima para emparejarse con las bases complementarias de otra molécula de RNA. Los miRNA controlan de esta manera la expresión génica al unirse a los 3' UTR de sus objetivos mediante el emparejamiento de bases entre el objetivo y el extremo 5' del miRNA, conocido como secuencia "semilla" (Ambros, 2004). Ésta interacción provoca, por lo general, represión en la traducción del mRNA diana, tanto por la desestabilización del transcrito como por inhibición de la traducción, o ambas (Goedke & Fernández-Hernando, 2011). La generación, procesamiento y actuación de los miRNAs se muestra en la figura 1.

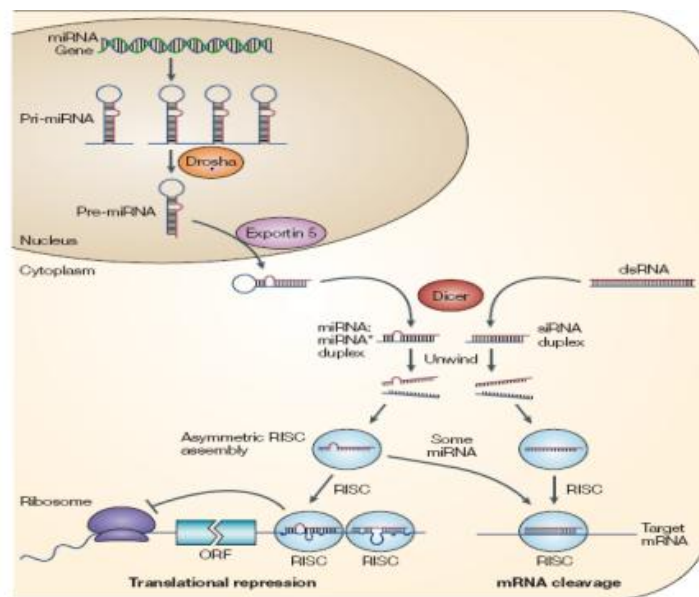


Figura 1. Proceso de Transcripción, maduración y mecanismo de acción de los miRNAs (He L & Hannon GJ, 2004)

Si el emparejamiento de bases es extenso, la proteína Argonauta cortará el mRNA, eliminando de forma efectiva su cola de poli-A y exponiéndolo a exonucleasas. Después del corte del mRNA, el RISC (con su miRNA asociado) es liberado y puede unirse a otras moléculas de mRNA. De esta forma, un solo miRNA puede actuar de forma catalizadora y destruir muchos mRNA complementarios. Si por el contrario el apareamiento de bases entre el miRNA y el mRNA es menos extenso, la proteína argonauta no corta el RNA sino que reprime la traducción del mRNA y el mRNA se estabiliza. Este efecto se asocia con el acortamiento de la cola de poli-A y el desplazamiento del mRNA hacia estructuras del citosol denominados cuerpos de procesamiento (cuerpos P). En este caso, los mRNA se separan de los ribosomas y finalmente se les elimina la caperuza y son degradados. Los cuerpos P son estructuras dinámicas formadas por grandes ensamblajes de mRNA y de enzimas que degradan RNA, y parece que son los sitios de la célula donde se da la destrucción de la mayoría de los mRNA, incluso de los no controlados por miRNA (Alberts *et al*, 2010).

Varias características convierten a los miRNA en reguladores especialmente útiles para la expresión génica. En primer lugar, un solo miRNA puede regular un conjunto completo de diferentes mRNA si dichos mRNA contienen en sus UTR una secuencia común a todos ellos. Esta situación es común en los humanos, en los que los miRNA controlan cientos de mRNA diferentes. En segundo lugar, la regulación de los miRNA puede ser combinatoria. Cuando el apareamiento de bases entre un miRNA y un mRNA no consigue activar el corte, la unión adicional de otro miRNA al mismo mRNA produce una reducción mayor de su traducción. En tercer lugar, un miRNA ocupa un espacio relativamente pequeño en el genoma en comparación con una proteína. De hecho, su pequeño tamaño es una de las razones por las que los miRNA no han sido descubiertos hasta hace poco tiempo. (Alberts *et al*, 2010)

Varios miRNA han sido descritos como importantes reguladores post-transcripcionales del metabolismo lipídico, entre los cuales encontramos el miR-122, miR-370, miR-378/378*, miR-143, miR-27, miR-335 y miR-33. El miR-122 fue inicialmente identificado como el microRNA con mayor nivel de expresión en el hígado, y desde entonces ha sido asociado con la regulación del metabolismo del mismo (Lagos-Quintana *et al*, 2002). El silenciamiento de miR-122 provoca la infra-regulación de los genes implicados tanto en la biosíntesis del colesterol como en el metabolismo de ácidos grasos, provocando así una reducción de los niveles totales de colesterol y convirtiendo el miR-122 en un candidato viable para inhibidores terapéuticos con el objetivo de disminuir el colesterol en humanos.

Más recientemente, varios grupos independientes han demostrado que el miR-33 regula el flujo de colesterol y la biogénesis de lipoproteínas de alta densidad (HDL) mediante la infra-regulación en la expresión de los genes ABCA1 y ABCG1. La sobreexpresión de miR-33 reprime la expresión de ABCA1, el cual es un transportador encargado del movimiento del colesterol en el exterior de la célula, disminuyendo de este modo el flujo de colesterol a ApoA-I. En cambio, el antagonista de miR-33 endógeno sobre-regula la expresión, tanto *in vitro* como *in vivo* de ABCA1 y promueve el flujo de colesterol a ApoA-I, confirmando de esta manera los efectos fisiológicos de miR-33.

En el caso de miR-27, se ha descubierto que éste no solo está involucrado en el metabolismo lipídico, sino también en otros procesos relacionados con la aterosclerosis como la respuesta inflamatoria, la diferenciación de los adipocitos o la angiogénesis (Chen *et al*, 2012). Este microRNA presenta dos isoformas diferentes: miR-27a y miR-27b. La primera de ellas se encuentra en una región

integénica, mientras que la segunda está situada en un intrón del gen C9ORF3, el cual codifica una proteína llamada aminopeptidasa O. Estos miRNA llevan a cabo la regulación de multitud de genes como TSP-1, SPRY2 y SEMA6A, por lo que miR-27 tiene un efecto proangiogénico (Zhou et al, 2010). Asimismo, miR-27 inhibe la expresión de genes relacionados con la diferenciación de adipocitos como PPAR γ , C/EBP α y RXR α , los cuales participan en varias vías de señalización relacionadas con la diferenciación y proliferación de adipocitos (Ji et al, 2009). Además, miR-27 regula también otros genes relacionados con el metabolismo lipídico, como por ejemplo la lipoproteína lipasa (LPL), FASN, ABCA1, SREBP1c y PPAR α , factor de transcripción que regula la transcripción de genes relacionados con el transporte de colesterol (Goedeke et al, 2015). También se ha visto que miR27 se encuentra sobreexpresado en condiciones de hiperglucemia en el tejido adiposo. Teniendo en cuenta que la aterosclerosis es una de las principales causas de muerte entre pacientes enfermos de diabetes mellitus tipo 2, cabe la posibilidad de que miR-27 tenga un papel importante en el proceso de aceleración de aterosclerosis, debido a su efecto proangiogénico, inhibiendo la diferenciación de adipocitos y aumentando la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Herrera et al, 2010).

2. Hipótesis y objetivos

Teniendo en cuenta que las estatinas interactúan directamente con el epigenoma y con miRNA que regulan tanto el metabolismo lipídico como procesos relacionados con la aterosclerosis, cabe la posibilidad de que el tratamiento con estatinas tenga influencia en los niveles de expresión de diversos miRNAs, tal y como se propone para el miR-33 (Allen et al, 2012). Esta interacción entre estatinas y la regulación de la expresión de miRNAs podría estar directamente relacionada con los efectos pleiotrópicos de las estatinas, tanto beneficiosos como nocivos, debido a que las lipoproteínas son capaces de transportar miRNAs a tejidos periféricos. Por ello, una alteración en los niveles de expresión de miRNAs podría tener consecuencias sobre todo el organismo.

Para confirmar la hipótesis planteada se desarrollarán los siguientes objetivos:

- 1.- Determinar el efecto del tratamiento con estatinas sobre los niveles de expresión de miR-122, miR-33a y miR-27b tanto en células HepG2 como en el medio extracelular. Se analizará el tratamiento con estatinas de tipo 1 (simvastatina y pravastatina) así como de tipo 2 (atorvastatina y rosuvastatina) durante un período de tiempo de 24 y 48 horas.
- 2.- Analizar el efecto del tratamiento con dichas estatinas sobre los niveles de expresión intracelulares de miR-27b en células pancreáticas (PANC-1).
- 3.- Determinar la presencia de miR-122, miR-33a y miR-27b en VLDLs purificadas del medio de cultivo de células HepG2 tratadas con estatinas.

3. Material y métodos

3.1 Análisis bioinformático

Los miRNAs que han sido objeto de estudio son miR-122-5p, miR-33a-5p y miR27b-3p. Para confirmar que estos tres miRNA están involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis, ha sido utilizada la base miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), la cual presenta las interacciones entre los miRNA y sus dianas. No obstante, las únicas interacciones que presentan los miRNA son aquellas que ya han sido comprobadas por estudios experimentales y no por predicciones *in silico* (Hsu et al, 2011).

3.2 Cultivos celulares

Se llevaron a cabo cultivos tanto de líneas celulares de cáncer hepático (HepG2) como de carcinoma pancreático (PAN-1). Dichos cultivos se realizaron en placas de cultivo de 6 pocillos con medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado con L-glutamina 2mM, penicilina 100 u/ml, estreptomicina 100 µg/ml y suero fetal bovino (*Fetal Bovine Serum*) al 5%. Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C bajo atmosfera de CO₂.

3.3 Tratamiento con estatinas

Las células HepG2 y PAN-1 se incubaron durante 24 o 48 horas con diferentes estatinas: simvastatina, pravastatina, atorvastatina y rosuvastatina. Estas se añadieron a las células a una concentración final de 5 µM utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como vehículo. Una vez añadidas las estatinas, las células se mantuvieron durante 24 o 48 horas a 37°C en placas de 6 pocillos y con una densidad de 300.000 células por pocillo. Se añadieron los siguientes volúmenes de estatina a 2 ml de medio DMEM: 0,22 µl/ml de simvastatina, 0,089 µl/ml de pravastatina, 0,3 µl/ml de atorvastatina y 0,25 µl/ml de rosuvastatina. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células fueron separadas de los medios de cultivo para posteriormente realizar la extracción de miRNA.

3.4 Extracción de miRNA

Para llevar a cabo la extracción de miRNA se utilizó el kit *miRNeasy Serum/Plasma kit* (Qiagen, cat. nº 217184) así como su protocolo. A la hora de realizar la extracción de miRNA de los medios de cultivo o de VLDLs, se añadieron previamente 3µl de control interno (*miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control*, 1,6·10⁸ copias/µl). Se añaden 5 volúmenes del agente desnaturante *QIAzol Lysis Reagent* (TRIzol) a las muestras, para posteriormente añadir cloroformo en el mismo volumen de la muestra inicial. Después, las muestras se centrifugan a 13400 rpm durante 15 minutos a 4°C. La centrifugación separa la muestra en tres fases: la fase orgánica (inferior) que contiene principalmente proteínas y lípidos, una fase intermedia de DNA y una fase acuosa (superior) que contiene RNA. Finalizada la centrifugación, se extrae la fase acuosa y se resuspende en 1,5 volúmenes de etanol 100%. Las muestras obtenidas son añadidas a columnas RNeasy Min Elute para proceder a realizar diferentes lavados usando los tampones RWT y RPE, así como etanol 80% siguiendo las instrucciones del fabricante. Para finalizar, se realiza una centrifugación a 13000 rpm durante 5 minutos con las tapas abiertas. De esta forma se permite realizar un secado total de las columnas. Una vez las columnas se han secado completamente, se añaden 14 µl de agua libre de RNAsas para eluir el miRNA y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 minuto.

3.5 RT-PCR

Se realiza una PCR con transcriptasa inversa sobre las muestras de miRNA que han sido extraídas para obtener el cDNA correspondiente, siguiendo el protocolo del kit *Universal cDNA Synthesis kit II* (Exiqon Inc, 203301). La reacción se lleva a cabo en placas para PCR de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories Inc., 480000624). En cada pocillo se añaden 5 µl de agua libre de RNAsas, 2 µl de buffer de reacción, 2 µl de muestra y 1 µl de enzima. La placa se cubre con una película adhesiva y se realiza una breve centrifugación (15 segundos) a 1500 rpm. A continuación se lleva a cabo la RT-PCR en un termociclador *C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System* (Bio-Rad Laboratories Inc.). La RT-PCR se realizó en un único paso. Para ello, las muestras se calientan a 42°C para que la transcriptasa inversa convierta todo el RNA de las muestras en cDNA. Posteriormente, la temperatura sube a 95°C durante 5 minutos desnaturalizando la transcriptasa. Por último, la temperatura desciende a 4°C, deteniendo así la reacción y conservando el cDNA estable.

3.6 qRT-PCR

Una vez se ha obtenido el cDNA, las muestras son analizadas mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) para cuantificar los niveles de expresión de los distintos miRNAs en las muestras tratadas con diferentes estatinas respecto a las células control que no han sido tratadas. Para ello, se utiliza un control interno cuya expresión no varía por efecto del tratamiento con estatinas y además, es similar en todas las muestras. El control interno utilizado para la cuantificación de los niveles de expresión de miRNAs en células HepG2 es el miR-145. A la hora de llevar a cabo la cuantificación de los medios, se usa el control interno añadido previamente a la extracción (*miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control*, $1,6 \cdot 10^8$ copias/µl). La qRT-PCR se lleva a cabo en placas para PCR de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories Inc.). La reacción en cada pocillo se lleva a cabo en un volumen final de 10 µl, de los cuales 5 pertenecen al Mastermix (*PerfeCTa SYBR Green SuperMix*, Quanta Biosciences Inc, 95054-500), 1 µl al primer (ya sea para el miRNA que nos interesa cuantificar como del control interno) y 4 µl de la muestra diluida. Las muestras de medios han sido diluidas 5 veces, mientras que las muestras pertenecientes a células han sido diluidas 10 veces, an ambos casos utilizando agua libre de RNAsas.

La qRT-PCR se lleva a cabo en un termociclador *C1000 Thermal Cycler CFX96 Real-Time System* (Bio-Rad Laboratories Inc.). La reacción comienza a 95°C durante 10 minutos, dándose así la activación de la polimerasa y se prolonga 15 segundos más para que se de la desnaturalización de las hebras de cDNA. Después, la temperatura desciende hasta los 60°C durante 1 minuto, dando lugar a la unión entre los primers y las hebras de cDNA. Además, la Taq polimerasa está activada, por lo que tiene lugar la amplificación. A continuación, el termociclador determina la fluorescencia emitida por el fluorocromo SYBR Green, excitándolo a una longitud de onda de 488 nm y recogiendo la señal a 522 nm. Tras la medición, la temperatura vuelve a ascender hasta los 95°C repitiendo así el proceso. Se han realizado en total 40 ciclos para garantizar que todas las moléculas de cDNA han sido amplificadas.

3.7 Inducción de la secreción de VLDL en células HepG2

Debido a que la secreción de VLDL por las células es muy baja, es necesaria su estimulación con ácido oleico para poder obtener cantidades suficientes de VLDL. Para ello, se añade a las células en cultivo oleato acompañado con BSA. Se disuelven 0,44 g de BSA (*Bovine Serum Albumin*) libre de ácidos grasos (Sigma-Aldrich Co., 6003-25G) en 3,84 ml de medio DMEM sin suero. Sobre esta disolución se

añaden 6 mg de oleato de sodio en polvo (Sigma-Aldrich Co., 26125), el cual previamente se ha disuelto en etanol y posteriormente secado con nitrógeno. Una vez la mezcla ha sido disuelta, se introduce durante una hora a 37°C en un baño sonicador. Una vez finalizado el proceso de sonicación, la disolución se añade a las células y se tratan durante 48 horas. Por cada placa de 6 pocillos se preparan 5,5 ml de medio DMEM sin suero suplementados con 0,5 ml de medio con oleato sódico. A cada pocillo se añade 1 ml del medio resultante.

3.8 Purificación de VLDL

Los medios de cultivo de las células que han sido estimuladas con ácido oleico para inducir la secreción de VLDL y tratadas o no con estatinas se recogen transcurridas 24 horas de incubación. Posteriormente, los medios se concentran utilizando tubos con filtros de 100 kDa (*Amicon Ultra-15 membrane PLHK Ultracel-PL 100 kDa*, Merck-Millipore Co., UFC910024) mediante centrifugación a 3500 rpm hasta llegar a un volumen final de 1 ml. La purificación de las VLDL se realiza mediante centrifugación en gradiente de densidad. Para ello, se añade KBr (Scharlab SL., PO01661000) hasta obtener una densidad de 1,4 g/ml y sobre esta disolución se añade suavemente 1 ml de NaCl 0,2 M, generando así dos fases diferentes. Posteriormente y durante la centrifugación isopícnica, el KBr genera un gradiente de densidad de 0 g/ml a 1,4 g/ml. De esta forma, los componentes de los medios se situarán en la zona que tenga su misma densidad, haciendo posible la separación de las lipoproteínas. Los medios de cultivo se centrifugan a 100.000 rpm durante dos horas y media, utilizando el rotor TLA 110 en la ultracentrífuga *Beckman-Coulter Optima Max-XP* (Beckman-Coulter Inc.).

Cuando finaliza la centrifugación, se extraerán las VLDL de la fase superior del gradiente, ya que poseen una densidad de 1,06 g/ml (Meex et al, 2011). Por ello, el añadir KBr a una densidad de 1,4 g/ml garantiza la colocación de las VLDL en la zona superior del gradiente generado tras la centrifugación.

3.9 Detección de VLDL por electroforesis en gel de poliacrilamida

Para verificar que la purificación de las VLDL se ha hecho correctamente, se realizan electroforesis en geles de 5% de poliacrilamida y 0,75 mm de grosor. Se preparan los geles según Laemmli (Laemmli, 1970) y se determina la concentración de proteína que hay en cada muestra utilizando el método de Bradford (Bradford, 1976). Esto permite cargar en los geles la misma concentración de proteína de cada muestra. Antes de realizar la carga de las muestras en el gel, se mezclan 20 µl de cada muestra con 5 µl del tampón de carga (Tris-HCl 0,125 M a pH 6 con 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0,2 mg/ml azul de bromofenol, 41 mg/ml dodecilsulfato sódico o SDS y 0,64 g/ml urea), y se calientan durante 5 minutos a 100°C. Una vez superado este tiempo, se cargan las muestras en el gel, se añade tampón de electroforesis (Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM SDS 0,1%) y se aplica una corriente eléctrica de 180V. Ya que la apolipoproteína (ApoB-100) que hay en las VLDL es muy grande (500kDa), se dejan escapar algunas de las bandas del marcador (*Precision Plus Protein Dual Color Standards*, Bio-Rad Laboratories Inc., 1610374). De esta forma, la banda correspondiente a ApoB-100 queda centrada en el gel, en lugar de situarse en la zona superior del mismo.

Finalizada la electroforesis, se llevan a cabo dos tinciones diferentes del gel. Por un lado, se utiliza colorante azul de Coomassie, y por otro lado se llevará a cabo una tinción con nitrato de plata. En el primero de los casos, el gel se incuba durante media hora con una disolución que contiene 1 g de colorante (*Coomassie Brilliant Blue R250*, Serva, 17525-02), 55% de agua destilada, 35 % metanol y 10%

de ácido acético. Después, se destiñe el gel incubándolo en un tampón que contiene 50% de agua destilada, 40% de metanol y 10% de ácido acético. Se realizarán múltiples lavados hasta que únicamente queden teñidas las proteínas.

En cuanto a la tinción con nitrato de plata, en primer lugar se fija el gel utilizando un tampón fijador (50% metanol, 12% ácido acético y 500 μ l de formaldehído en agua Milli-Q); éste se incuba una hora en rotación, y en un recipiente de cristal. El volumen utilizado debe de ser el suficiente para cubrir el gel. A continuación, se realizan tres lavados durante cinco minutos con 100 ml de una solución que contiene 50% de etanol y 50% de agua Milli-Q. Luego, se realizan otros tres lavados utilizando únicamente agua Milli-Q. Posteriormente, se añade una disolución con 100 ml de agua Milli-Q y 150 μ l de la solución A (86 mg de sulfato sódico disueltos en 1 ml de agua Milli-Q), con la cual se incuba el gel durante un minuto. Tras volver a realizar los lavados con agua, se incuba el gel durante 20 minutos con una solución que contiene 0,2 g de nitrato de plata (AgNO_3), 75 μ l de formaldehído al 40% m/v y 100ml de agua Milli-Q. Finalmente, tras realizar los lavados con agua se procede a añadir el tampón de reacción, el cual contiene 6 g de carbonato sódico (NaCO_3), 5 μ l de la solución A, 50 μ l de formaldehído y 100 ml de agua Milli-Q. Con este tampón el gel comenzará a teñirse de una forma exponencial; por tanto, hay que incubarlo hasta conseguir la tinción deseada. Para parar la tinción, se vuelven a realizar tres lavados con agua Milli-Q.

3.10 Analisis estadístico

Para poder determinar la significancia de los resultados, se ha realizado un test de Student (T-test), tomando como valores significativos aquellos que tienen un intervalo de confianza superior al 95% ($p < 0,05$). Los experimentos llevados a cabo con células HepG2 se han realizado cuatro veces ($n=4$), mientras que en células PANC-1 se han realizado únicamente dos experimentos ($n=2$) y en VLDLs purificadas uno ($n=1$). En las gráficas se representan las medidas de todos los experimentos junto con sus desviaciones estándares.

4.2 Análisis de la expresión de miR-33a en células HepG2 y en sus medios de cultivo con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas

Para realizar el estudio de la expresión de los diferentes miRNAs en células, se cultivaron las células Hep-G2 del modo en que se describe en el apartado de materiales y métodos y se trataron con estatinas durante 24 y 48 horas. A continuación, se extrajo el miRNA de la fracción celular y posteriormente se determinaron los niveles de expresión utilizando la técnica de qRT-PCR. La principal variable de este experimento es la cantidad de veces que se expresa el miRNA de estudio respecto a un control de células Hep-G2 no tratadas. Sin embargo, es necesario utilizar un control interno que garantice que el tratamiento de datos es correcto, ya que puede haber problemas durante la extracción de miRNA de las distintas muestras y por tanto el análisis de resultados sería erróneo. En caso de no utilizarse un control interno, es posible que en alguna de las muestras se haya extraído más cantidad de miRNA que en el resto, por lo que en la qRT-PCR se observaría una expresión mayor, sin tener que ser necesariamente así. En el caso de las células Hep-G2, el control de referencia utilizado es el miR-451, el cual es un miRNA que no se ve alterado por el tratamiento con estatinas, por lo que su expresión en células Hep-G2 es siempre constante (Song et al, 2012).

En cuanto a la expresión de los miRNA en medios de cultivo, no hay un miRNA de referencia. Por ello, es necesario añadir 3 µl de un control interno exógeno o Spike (miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, 1,6-108 copias/µl) antes de llevar a cabo la extracción, para de esta manera, garantizar que la cantidad de miRNA extraída en todos los casos ha sido la misma. Después, a la hora de realizar la qRT-PCR, se añadieron los primers específicos para este control interno.

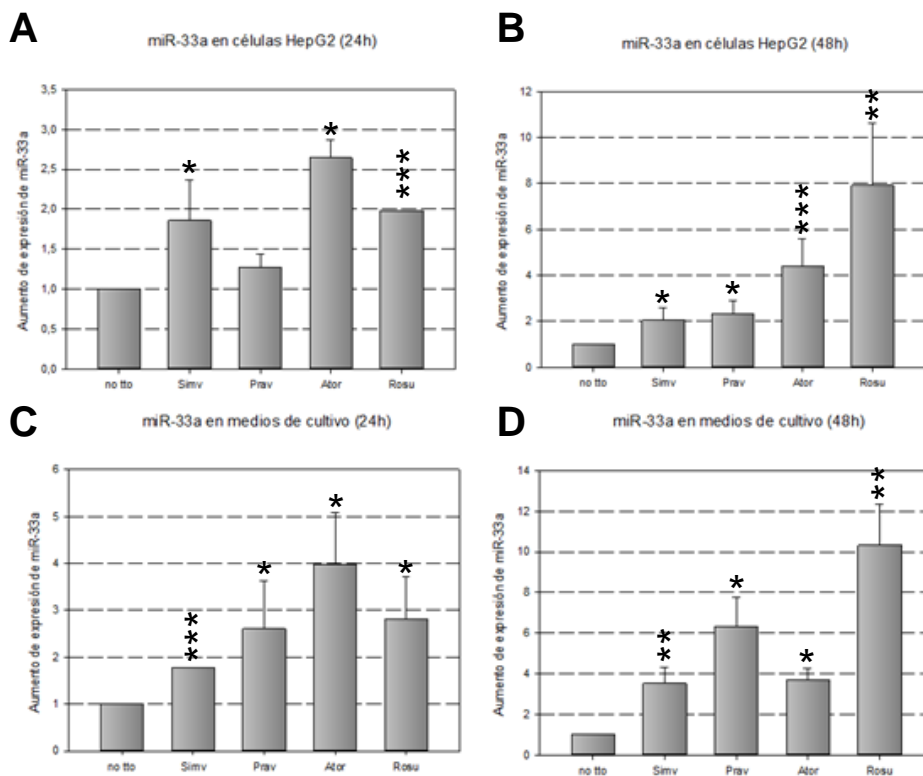


Figura 3. Niveles de expresión de miR-33a en células HepG2 (A y B) y en medios de cultivo (C y D) en presencia de estatinas (5 µM) durante 24 y 48 horas. El aumento de expresión de miR-33a se calcula respecto al control negativo. El nivel de significancia de los resultados se ha calculado mediante la prueba T-student de dos colas. . p<0,01: ***; p<0,025:**; p<0,05:*, respecto a las células no tratadas. Las gráficas representan la media de cuatro experimentos independientes (n=4).

Por lo general, todas las estatinas provocaron, en mayor o menor medida, una sobreexpresión de miR-33a (Figura 3). Cuando las células HepG2 fueron tratadas con simvastatina durante 24 horas, miR-33a^a llegó a expresarse casi el doble que en las células no tratadas. Dicho nivel de expresión apenas aumentó con el tratamiento durante 48 horas (Figura 3 A y B). En el medio extracelular, por el contrario, la expresión de miR-33a pasó de ser dos veces mayor que las células no tratadas en 24 horas a casi cuatro veces mayor a las 48 horas (Figura 3 C y D). Respecto a la rosuvastatina, se observó un menor nivel de expresión de miR-33a a las 24 horas (en torno a 1,25 veces más que en el control sin tratamiento); este nivel aumentó a las 48 horas, llegando a niveles de expresión superiores al doble respecto a las células no tratadas (Figura 3 A y B). Sin embargo, los niveles de expresión de miR-33a observados en los medios de cultivos fueron mayores: tras 24 horas de incubación, se observaron niveles en torno a 2,5 veces mayores que en los medios de cultivo de células no tratadas, pasando a ser alrededor de 6,2 veces mayores tras 48 horas (Figura 3 C y D).

En el caso de atorvastatina y rosuvastatina, los niveles de expresión de miR-33a fueron mucho mayores que los observados en los tratamientos con las otras dos estatinas. Respecto a atorvastatina, su expresión a las 24 horas en células fue de alrededor de 2,6 veces mayor que en el control no tratado, y este nivel aumentó a las 48 horas llegando a niveles 4,1 veces superiores que en las células control (Figura 3 A y B). En los medios de cultivo, por el contrario, la expresión no se vio afectada por el tiempo, ya que fue de alrededor de 4 y 5 veces mayor que el control no tratado. Por último, rosuvastatina fue la estatina que mayores niveles de expresión provocó: tras 24 horas la expresión de miR-33a era el doble que la del control, pasando a ser 8 veces mayor a las 48 horas. En el medio extracelular, su expresión a las 24 horas fue de alrededor del triple que en el control, y aumentó a las 48 horas hasta llegar a niveles entre 10 y 12 veces mayores que en los medios extracelulares de células no tratadas (Figura 3 C y D).

4.3 Análisis de la expresión de miR-122 en células HepG2 y en sus medios de cultivo con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas

A continuación, se muestra la expresión de miR-122 obtenida mediante qRT-PCR en células HepG2 y en sus medios de cultivo, con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas.

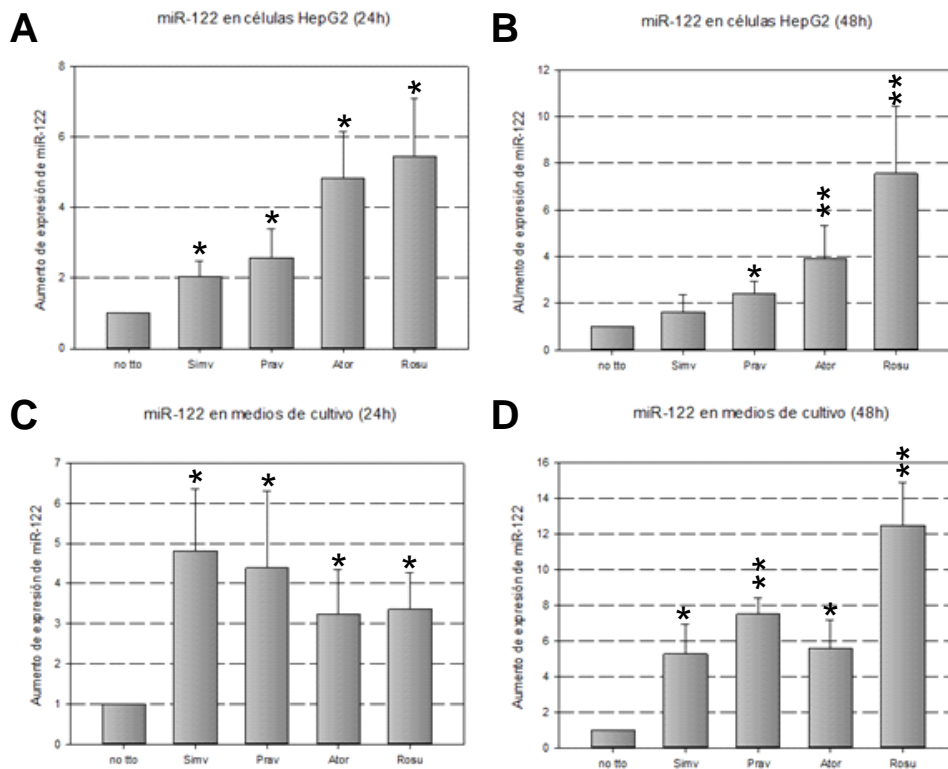


Figura 4. Niveles de expresión de miR-122 en células HepG2 (A y B) y en medios de cultivo (C y D) en presencia de estatinas (5 μM) durante 24 y 48 horas. El aumento de expresión de miR-122 se calcula respecto a un control negativo, es decir, células HepG2 no tratadas con estatinas como se describe en materiales y métodos. El nivel de significancia de los resultados, se ha calculado mediante prueba T-student de dos colas. $p < 0,01$: ***; $p < 0,025$: **; $p < 0,05$: *, respecto a las células no tratadas. Las gráficas representan la media de cuatro experimentos independientes (n=4).

En este caso, el perfil de expresión respecto a miR-33a fue similar. El tratamiento con simvastatina durante 24 horas en células provocó que los niveles de expresión de miR-122 fuera del doble que en células no tratadas, y esta sobreexpresión fue muy similar a las 48 horas (alrededor de 1,7) (Figura 4 A y B). En lo que al medio extracelular respecta, los niveles de expresión tampoco se vieron alterados con el paso del tiempo, ya que a las 24 horas su expresión fue 4,8 veces mayor que en los medios de células HepG2 no tratadas, y a las 48 horas estos niveles fueron ligeramente superiores (en torno a 5,2) (Figura 4 C y D). En el caso de las células tratadas con pravastatina, los niveles de expresión fueron ligeramente más elevados que en las células tratadas con simvastatina. Asimismo, estos niveles de expresión tampoco se vieron afectados a lo largo del tiempo de incubación (2,6 a las 24 horas y 2,4 a las 48 horas) (Figura 4 A y B). En los medios extracelulares, en cambio, si se observó un aumento en la expresión con el tiempo, ya que a las 24 horas los niveles de expresión de miR-122 fueron 4,4 veces

superiores que en los medios de cultivo de las células sin tratamiento, mientras que a las 48 horas esta expresión aumentó hasta ser 7,5 veces superior (Figura 4 C y D).

En el caso de la atorvastatina, la expresión de miR-122 en las células HepG2 disminuyó ligeramente con el tiempo, ya que pasó de ser 4,7 veces superior que en células no tratadas a 4 veces únicamente. No obstante, en medios extracelulares, la expresión de miR-122 a las 24 horas fue 3,2 veces mayor que el control, llegando a ser 5.7 veces superior tras 48 horas de incubación. Por último, rosuvastatina fue la estatina que mayor sobreexpresión provocó. En células, su expresión pasó de ser 5,5 a 7,5 veces superior que el control sin tratamiento, mientras que en los medios de cultivo la expresión de miR-122 pasó de ser 3,3 veces mayor a 12,5 veces mayor que el control no tratado a las 48 horas de incubación (Figura 4).

4.4 Análisis de la expresión de miR-27b en células HepG2 y en sus medios de cultivo con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas

A continuación se muestra la expresión de miR-27b obtenida mediante qRT-PCR en células HepG2 y en sus medios de cultivo, con tratamiento de estatinas durante 24 y 48 horas.

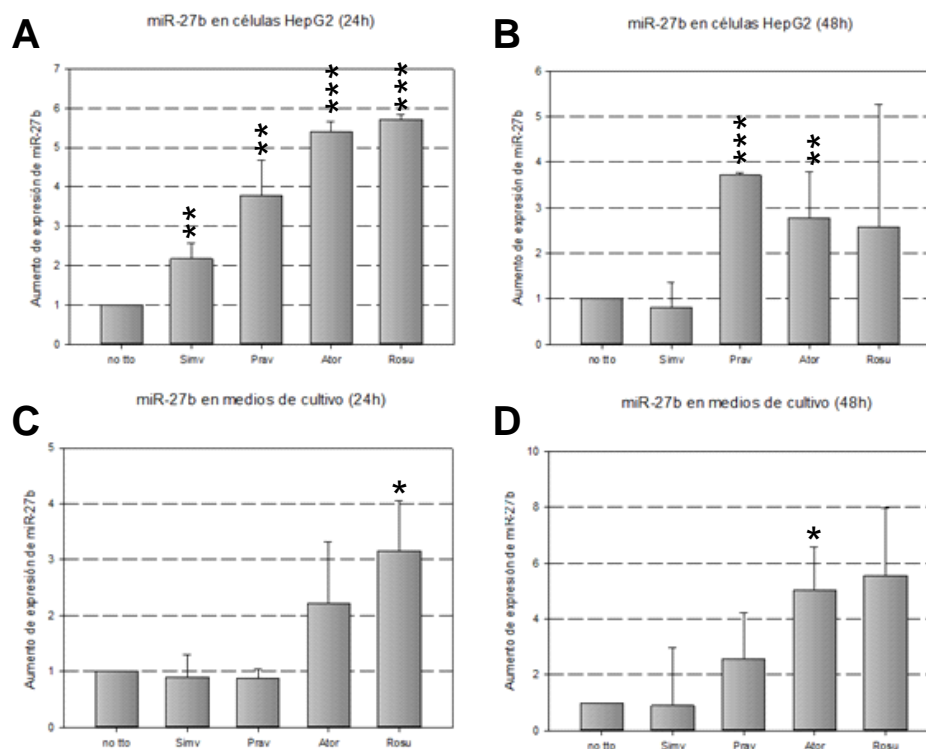


Figura 5. Niveles de expresión de miR-27b en células HepG2 y en medios de cultivo en presencia de estatinas (5 μ M) durante 24 y 48 horas. El aumento de expresión de miR-27b se calcula respecto a un control negativo, es decir, células HepG2 no tratadas con estatinas como se describe en materiales y métodos. El nivel de significancia de los resultados, se ha calculado mediante prueba T-student de dos colas. $p < 0,01$: ***; $p < 0,025$: **; $p < 0,05$: *, respecto a las células no tratadas. Las gráficas representan la media de cuatro experimentos independientes (n=4).

Cuando las células HepG2 se trataron con simvastatina durante 24 horas, los niveles de miR-27b intracelular fueron 2,2 veces mayores que en células no tratadas; sin embargo, miR-27b volvió a su nivel basal de expresión a las 48 horas. En el medio extracelular, por el contrario, miR-27b no se sobre expresó cuando las células fueron tratadas con simvastatina (Figura 5). Por otro lado, cuando las células fueron tratadas con pravastatina, la expresión de miR-27b fue en torno a 3,8 veces superior que el control no tratado, manteniéndose estos niveles tras 48 horas de incubación. En cuanto a los medios de cultivo, miR-27b no se sobre expresó respecto al control tras 24 horas de incubación con el tratamiento de pravastatina. Sin embargo, a las 48 horas los niveles de expresión aumentaron, llegando a expresarse 2,5 veces más que en los medios de cultivo de células no tratadas.

Cuando las células HepG2 fueron tratadas con atorvastatina y rosuvastatina, se obtuvieron unos perfiles de expresión muy similares: a las 24 horas, miR-27b se expresaba en torno a 5,5 veces más que el control sin tratamiento, mientras que a las 48 horas de incubación, los niveles de expresión descendieron hasta ser 2,5 veces superiores que el control únicamente (Figura 5 A y B). No obstante, la variabilidad obtenida a las 48 horas fue muy elevada, llegando en algunos experimentos a darse una sobre expresión 5 veces superior en el caso de rosuvastatina. En cambio, en el medio extracelular se vieron diferencias entre las 2 diferentes estatinas: en el caso de atorvastatina, la expresión de miR-27b pasó de ser 2,2 veces superior a 5 veces superior tras 48 horas de incubación. En el caso de rosuvastatina, la expresión fue mayor a las 24 horas (3,2), llegando a niveles 5,5 veces mayores que el control sin tratamiento a las 48 horas (Figura 5 C y D).

4.5 Análisis de la expresión de miR-27b en células PANC-1

Se ha llevado a cabo un análisis de los niveles de expresión de miR-27b en células PANC-1, una línea celular de carcinoma pancreático debido a su posible implicación en el desarrollo de diabetes mellitus de tipo 2 y el aumento de la incidencia de dicha enfermedad tras un largo período de tratamiento con estatinas. Para ello, las células se incubaron con estatinas durante un período de tiempo de 24 y 48 horas, para posteriormente llevar a cabo la extracción de miRNA y su cuantificación mediante qRT-PCR. Al igual que en el estudio realizado con células HepG2, se utilizó miR-451 como control interno, ya que su nivel de expresión es constante al no verse alterado por las estatinas. No se han tenido en cuenta los medios de cultivo, puesto que el objetivo no era ver la secreción del miRNA al medio extracelular.

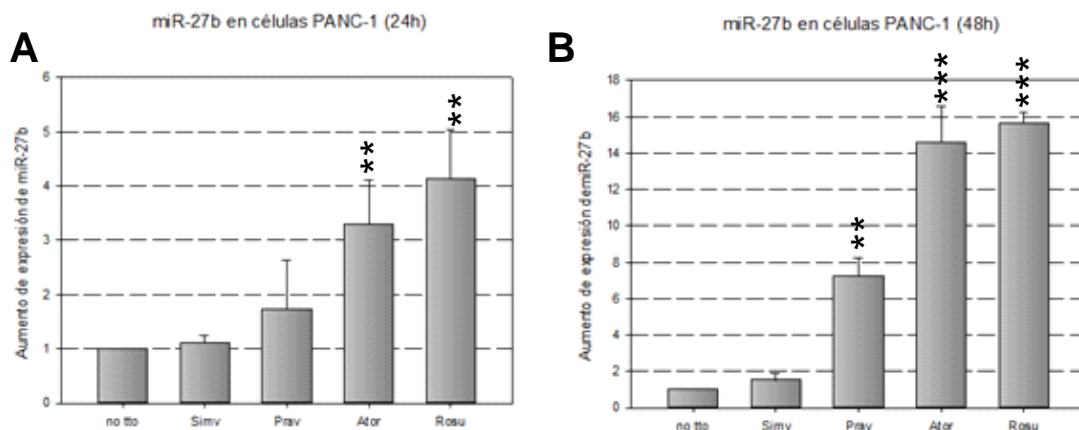


Figura 6. Niveles de expresión de miR-27b en células PANC-1 tratadas con estatinas (5 μ M) durante 24 y 48 horas. El aumento de expresión se calcula respecto a un control negativo, es decir, células PANC-1 no tratadas con estatinas. El nivel de significancia de los resultados, se ha calculado mediante prueba T-student de dos colas. $p < 0,01$ ***; $p < 0,025$ **; $p < 0,05$ *, respecto a las células no tratadas. Las gráficas representan la media de dos experimentos independientes ($n=2$).

Como se puede observar en los resultados de la figura 6, el tratamiento con simvastatina produjo una ligera sobreexpresión del miRNA a las 24 horas que aumentó a las 48 horas llegando casi a ser dos veces superior que el control sin tratamiento (1,8). El resto de estatinas, sin embargo, produjeron un gran aumento en la expresión de miR-27b: en el caso de pravastatina, la expresión tras 24 horas de incubación fue 1,7 veces superior que en el control, y a las 48 horas aumentó hasta llegar a 7,2. La atorvastatina provocó niveles 3,3 veces mayores a las 24 horas, aumentando hasta 14,6 tras 48 horas. La rosuvastatina fue la estatina que mayor sobreexpresión provocó: a las 24 horas, su expresión era en torno a 4 veces mayor, mientras que a las 48 horas esta expresión aumentó hasta llegar a niveles 16 veces mayores que el control. Como en el resto de estudios se han realizado cuatro experimentos independientes, es necesario repetir este experimento con este miRNA y con otros para confirmar estos niveles de expresión.

4.6 Purificación de VLDL a partir de los medios de cultivo de células HepG2

Teniendo en cuenta que los miRNAs son capaces de cumplir su función fuera de la célula, uno de los objetivos fue determinar su presencia en las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) secretadas por las células HepG2. Para ello, primero se añadieron estatinas a los medios de cultivo y al día siguiente se añadió un medio de inducción para aumentar la secreción de lipoproteínas. Tras una incubación de 24 horas, las VLDLs se purificaron mediante ultracentrifugación. Se utilizaron tres controles distintos: como control negativo, se utilizó medio de cultivo no inducido (al no contener oleato de sodio, se le llamó OA-) y medio de cultivo inducido pero no tratado (OA+); como control positivo, se utilizó LDL humana (Sigma-Aldrich Co, L7914), la cual contiene ApoB-100 al igual que las lipoproteínas secretadas por las células HepG2. Éstas se consideran como VLDLs porque es la principal lipoproteína sintetizada por el hígado, aunque realmente su densidad se asemeja más a la de las LDLs (Meex et al, 2011), por lo que su apolipoproteína principal es ApoB-100. Por esta razón, se utilizó LDL como control positivo.

Para llevar a cabo la detección de ApoB-100, en primer lugar se realizó una tinción azul de Coomassie con los medios de cultivo de las células HepG2. Después, tras haber purificado las VLDL, se realizó una tinción de plata. Esta segunda tinción muestra una mayor sensibilidad, por lo que permite detectar cantidades muy pequeñas de proteína (Switzer RC et al, 1979).

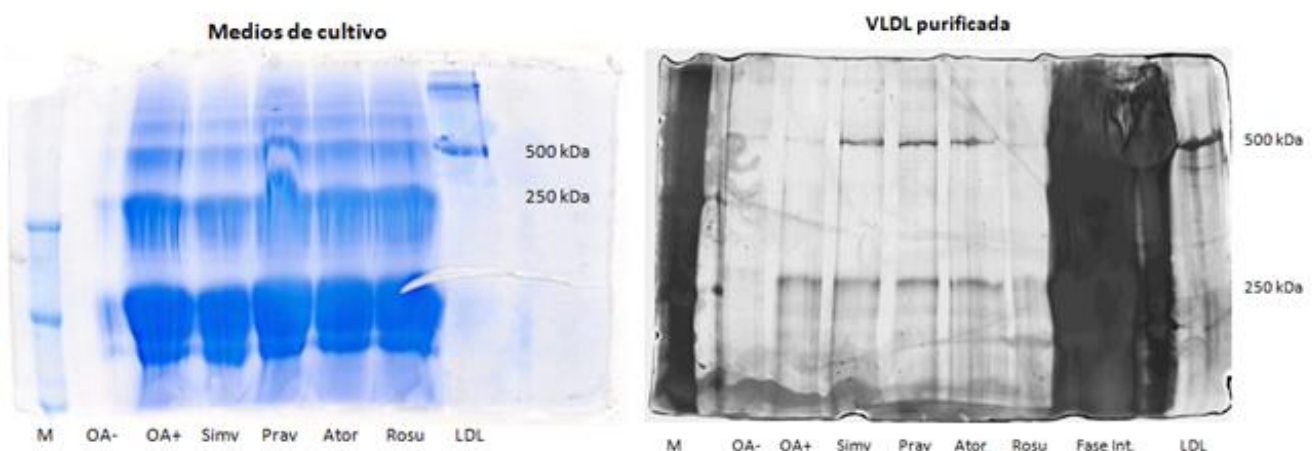


Figura 7. Detección de la apolipoproteína ApoB-100 en medios de cultivo de las células HepG2 (panel izquierdo). La primera calle corresponde al marcador (M). En el caso de las VLDL purificadas, se ha utilizado como control la fase intermedia del gradiente de KBr. La imagen de a izquierda corresponde a la tinción con azul de Coomassie y la imagen del panel derecho corresponde a tinción de plata. Las imágenes muestran dos experimentos representativos.

Antes de purificar las lipoproteínas VLDL de los medios de cultivo de las células HepG2, la banda correspondiente a ApoB-100 (500 kDa) se detectó en todos los casos excepto en el medio no inducido (OA-) (Figura 4.6 panel izquierdo). Por otro lado, el tratamiento con distintas estatinas no produjo diferencias respecto a la producción de estas lipoproteínas. El resto de bandas que aparecen en el gel corresponden a otras proteínas del medio extracelular de las células HepG2.

Tras purificar las VLDL, se extrajo la fase superior del gradiente y se hizo una electroforesis en gel de poliacrilamida de 5% que luego se tiñó con nitrato de plata para detectar bajas concentraciones de proteína, no detectables con la tinción azul de Coomassie. Como se puede observar en la figura 4.6 (panel derecho), la banda correspondiente a ApoB-100 fue detectada (500 kDa). Por otro lado, se utilizó como control la fase intermedia del gradiente de densidad para garantizar que las VLDL se encontraban en la fase superior. La saturación de la señal indica que hay muchas otras proteínas en esta fase, por lo que VLDL no se encuentra purificada.

Por último, cabe destacar que no se consiguieron purificar completamente las lipoproteínas VLDL secretadas por las células HepG2, ya que en el gel teñido con nitrato de plata se detectaron bandas correspondientes a proteínas con un peso de alrededor 250 kDa. No se consiguió determinar a qué proteína correspondían esas bandas, aunque ha descrito que en la purificación de lipoproteínas secretadas por células HepG2 pueden detectarse bandas de alrededor de 200 kDa correspondientes a fibronectina (Benoist y Grand-Perret, 1996).

4.7 Análisis de la expresión de miR-27b en VLDLs purificadas

Tras comprobar que las lipoproteínas VLDL se purificaron a partir de los medios de las células HepG2, se extrajo el miRNA y se cuantificó la expresión de miR-27b mediante qRT-PCR. En este experimento, al igual que en las células HepG2 y sus medios de cultivo, la variable principal es la cantidad veces que se expresa el miRNA de estudio respecto a un control de células HepG2 no tratadas. Sin embargo, es necesario utilizar un control interno para saber si la extracción de miRNA se ha dado de la misma manera en todos los casos. En este caso, el control interno utilizado fue el mismo que el de los medios de cultivo, es decir, 3 μ l de Spike (miRNeasy Serum/Plasma Spike-In Control, 1,6·10⁸ copias/ μ l). Posteriormente, a la hora de hacer la qRT-PCR, se añadieron los primers específicos para este control interno.

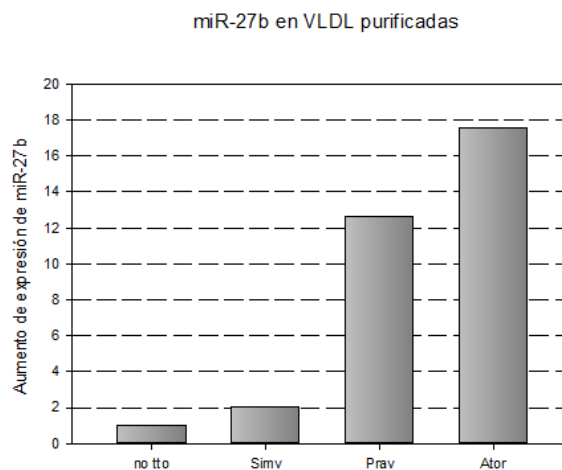


Figura 8. Niveles de expresión de miR-27b en VLDLs purificadas a partir de los medios de cultivo de células HepG2 tras haberlos incubado con estatinas (5 μ M) durante 24 horas y con el medio de inducción de secreción de lipoproteínas durante 24 horas adicionales. El aumento de expresión se calcula respecto a un control negativo, es decir, VLDLs purificadas no tratadas con estatinas. Las gráficas los valores de un experimento (n=1).

Tal y como se muestra en la figura 4.7, la expresión de miR-27b en VLDLs purificadas de los medios de cultivo de células HepG2 fue mucho más alta que el control, el cual corresponde a células que fueron inducidas con oleato pero no fueron tratadas con estatinas. Estos niveles de expresión en el caso del tratamiento con simvastatina fueron aproximadamente el doble que en las células control, mientras que en el caso de pravastatina y atorvastatina los niveles de expresión fueron 12 y 17 veces mayores que en el control respectivamente.

5. Discusión

Actualmente, las estatinas son el fármaco de primera elección para disminuir las concentraciones elevadas de colesterol en plasma. Sin embargo, las estatinas presentan importantes efectos adversos como hepatotoxicidad, miopatías o desarrollo de diabetes mellitus tipo 2. Estos fármacos son inhibidores de la síntesis del colesterol, actuando sobre la HMGCR, enzima limitante del proceso de síntesis; cuando las concentraciones de colesterol intracelular bajan, se activa el factor de transcripción SREBP-2 y este activa la expresión de genes relacionados con la síntesis del colesterol y ácidos grasos (Brown y Goldstein, 1997).

Así mismo, la transcripción de SREBP-2 provoca la expresión de miR-33a, el cual está codificado en su intrón y actúa sobre sus genes diana (ABCA1, ABCG1 y NPC1 entre otros). Por ello, el tratamiento con estatinas induce la sobreexpresión de miR-33a, tal y como se muestra en este estudio y en otros realizados con anterioridad (Marquart et al, 2010). En el presente estudio, además hemos detectado niveles elevados de miR-33a en el medio extracelular de las células HepG2 tratadas con diferentes estatinas. Estos resultados sugieren que la sobreexpresión de miR-33a inducida por el tratamiento con estatinas podría tener un efecto en tejidos periféricos y actuar como un elemento de comunicación/señalización intercelular o incluso entre tejidos. Los resultados obtenidos muestran que atorvastatina y rosuvastatina inducen los niveles de expresión de miR-33a más elevados; por ejemplo, en el caso de rosuvastatina, miR-33a llega a expresarse 10 veces más que en células no tratadas con estatinas, y esto ocurre tanto en células como en medio. Los genes sobre los que actúa miR-33a están relacionados mayoritariamente con el transporte reverso del colesterol, es decir, el transporte desde los tejidos periféricos a las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y posteriormente, al hígado (Rayner et al, 2010). De esta manera, el tratamiento a largo plazo con estatinas podría provocar indirectamente una acumulación de colesterol dentro de la célula, ya que se impide su transporte a las HDL; esto podría relacionarse con la acumulación de grasa en tejidos periféricos así como en el hígado (esteatosis hepática).

En el caso de miR-122 se observan unos resultados muy similares, es decir, las estatinas inducen su sobreexpresión tanto intracelularmente como en el medio extracelular. Como en el caso de miR-33a, entre las estatinas estudiadas, la rosuvastatina es la que induce mayor efecto de sobreexpresión de miR-122. En este caso, se alcanzan también niveles alrededor de 10 veces mayores que los de células no tratadas. No obstante, a las 24 horas de tratamiento con estatinas se ha determinado una mayor sobreexpresión con simvastatina y pravastatina, aunque esto solo se detecta en los medios de cultivo. A las 48 horas, estos niveles se mantienen y se observa un gran incremento de los niveles de miR-122 con rosuvastatina.

miR-122 es el microRNA principal del hígado, y participa en multitud de procesos involucrados en el metabolismo lipídico, pero también está relacionado con el desarrollo del carcinoma hepatocelular y la infección por el virus de la hepatitis C (Norata et al, 2013). Por tanto, este miRNA actúa sobre una gran variedad de dianas; una de ellas es la acetoacetil-CoA sintetasa (AACS), enzima que participa en la síntesis de colesterol y ácidos grasos (Aguiló et al, 2010). Se ha descrito que su actividad también se ve modulada por las estatinas, por lo que la inhibición de su expresión o de su actividad reduciría los niveles de colesterol y triglicéridos. Esto se contradice con lo observado por Moore et al., ya que ellos demuestran que la inhibición de miR-122 reduce los niveles de colesterol y triglicéridos en el hígado de

ratones (Moore et al, 2011). Una posible explicación sería la sobreexpresión de miR-122 inducida por las estatinas, ya que este miRNA regula genes relacionados con la síntesis del colesterol y ácidos grasos como la AACS. Por otro lado, la rosuvastatina está clasificada por la AHA (*American Heart Association*) como estatina de alta intensidad (Stone et al, 2013) porque produce grandes reducciones en los niveles de LDL-colesterol. Los resultados de este estudio demuestran que rosuvastatina es la estatina que mayor sobreexpresión de miR-122 provoca entre las cuatro estudiadas. Por esta razón, es posible que miR-122 sea un importante regulador del mecanismo de acción de las estatinas.

Por otro lado, miR-122 también regula la quinasa AKT3, una enzima involucrada en la proliferación y diferenciación celular, apoptosis, tumorigénesis e incluso en la captación de glucosa. AKT3 es activada por distintos factores de crecimiento, además de por la insulina (Nakatani et al, 1999). Por esta razón, una inhibición de su expresión podría relacionarse con el desarrollo de diabetes mellitus o incluso con el desarrollo de cáncer hepático. Además, se ha visto que miR-122 también regula la aldolasa A (ALDOA), cuya deficiencia se ha relacionado con miopatías (Yao et al, 2004). Teniendo en cuenta que las estatinas provocan miopatías, diabetes mellitus tipo 2 y hepatotoxicidad entre otros efectos (Sirtori, 2014), puede deducirse que el aumento de la expresión de miR-122 podría ser uno de los mecanismos que regula su desarrollo.

En cuanto a miR-27b, los resultados obtenidos son similares a los obtenidos con los otros miRNAs, es decir, las estatinas inducen su sobreexpresión, siendo atorvastatina y rosuvastatina las que mayor sobreexpresión provocan, tanto en células como en el medio extracelular. En el caso de simvastatina, la sobreexpresión es muy parecida al control no tratado, por lo que apenas induce su sobreexpresión. Con pravastatina, sin embargo, miR-27b llega a expresarse alrededor de cuatro veces más en células, mientras que en medios se observa una pequeña sobreexpresión.

Las dos isoformas de miR-27 regulan una gran variedad de genes que no sólo están relacionados con el metabolismo del colesterol, sino también con otros procesos como la respuesta inflamatoria o la diferenciación de adipocitos. Entre los genes regulados por miR-27b se encuentra una isoforma de la malato deshidrogenasa mitocondrial (MDH2), la cual cataliza la reacción de malato a oxalacetato y participa en la lanzadera malato-aspartato (Mullinax et al, 1982). Por tanto, la sobreexpresión de miR-27b inducida por el tratamiento con estatinas podría afectar procesos fisiológicos celulares relacionados con la energética celular. Otros genes regulados por miR-27b que están involucrados en el metabolismo lipídico son la ácido graso sintasa (FASN), y PPAR γ , el cual es un factor de transcripción que participa en la regulación de genes relacionados con la diferenciación y proliferación de adipocitos (Vidal-Puig et al, 1997). Por tanto, una reducción en la expresión de estos genes podría estar relacionada con la reducción del graso del organismo, tanto a nivel de triglicéridos como de colesterol. Esta acción es propia de las estatinas, por lo que se entiende que miR-27b active estos procesos por la inducción provocada por las estatinas. También se ha descrito que las estatinas pueden inducir la sobreexpresión de atrogina-1, un gen involucrado en la atrofia del músculo esquelético y miopatías (Hanai et al, 2007). Este mecanismo está inhibido por la sobreexpresión del coactivador 1 α de PPAR γ (PGC-1 α), el cual activa el factor PPAR γ e induce biogénesis mitocondrial y protección contra la atrofia muscular (Martini et al, 2009). Teniendo en cuenta que miR-27b inhibe la expresión de PPAR γ , es posible que esto provoque la sobreexpresión de atrogina-1, induciendo así atrofia muscular y miopatías.

El análisis bioinformático realizado mediante la plataforma miRTarBase y la bibliografía, refuerzan los resultados obtenidos y confirma que los tres miRNAs analizados en el presente estudio están involucrados en el metabolismo de lípidos y en otros tipos de rutas.

En el presente trabajo además se ha estudiado el efecto del tratamiento de estatinas sobre los niveles intracelulares de miR-27b en células pancreáticas (PANC-1), con el objetivo de establecer una posible relación con el desarrollo de diabetes mellitus. Los resultados obtenidos muestran que miR-27b se encuentra sobreexpresado sobre todo en células tratadas con atorvastatina y rosuvastatina, y en menor medida, con pravastatina. Sin embargo, el tratamiento con simvastatina no altera la expresión de este miRNA. Anteriormente, se ha descrito que miR-27b se encuentra sobreexpresado en condiciones de hiperglucemia en el tejido adiposo (Herrera et al, 2010), pero todavía no se ha descrito que en células pancreáticas también lo esté. Teniendo en cuenta que el tratamiento con estatinas aumenta la incidencia de diabetes mellitus tipo 2 (Ridker et al, 2012), es posible que la inducción de sobreexpresión de miR-27b esté involucrado en el desarrollo de esta enfermedad. Sin embargo, es necesario hacer estudios adicionales para identificar a miR-27b o a otros miRNAs como biomarcadores de esta enfermedad.

Por otro lado, nuestro grupo ha comprobado que la actividad del receptor purinérgico P₂Y₂ se ve afectado por el tratamiento con estatinas. Los receptores de esta familia están involucrados en multitud de procesos como la proliferación celular, migración, actividad vascular, secreción de citoquinas y apoptosis. Sin embargo, una investigación reciente demuestra que estos receptores están involucrados en la aterosclerosis (Ferrari et al, 2015). Los receptores P₂Y₂ son receptores acoplados a proteínas G_q, cuya activación por nucleótidos (ATP, ADP, UTP y UDP principalmente) da lugar a un aumento de la concentración intracelular de calcio (Ca²⁺) vía fosfolipasa-C. Cuando el receptor se activa, la fosfolipasa-C genera inositol trifosfato (IP₃), el cual activa los canales de calcio del retículo endoplasmático, provocando la liberación de Ca²⁺ (Abbracchio et al, 2006). Además, cuando se tratan células HepG2 con estatinas, la actividad de los receptores P₂Y₂ en respuesta a ATP es menor y la capacidad movilizadora de calcio intracelular disminuye (resultados no mostrados). Esta disminución de la concentración de calcio intracelular es mayor cuando las células son tratadas con estatinas de tipo 2, es decir, atorvastatina y rosuvastatina. Teniendo en cuenta que el perfil de la disminución de Ca²⁺ intracelular es similar al de la sobreexpresión de los miRNAs estudiados en este trabajo, es posible que los receptores P₂Y₂ guarden una relación con alguno de estos, pudiendo uno de sus genes diana. Se ha utilizado la base de datos miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), la cual predice posibles interacciones miRNA-diana o diana-miRNA por homología entre secuencias (Dweep y Gretz, 2015) y ver así la posible interacción de mir-27b con P₂Y₂. Las predicciones demuestran que miR-27b-3p tiene como diana el receptor P₂Y₂. Siendo así, la inhibición en la expresión de estos receptores podría dar lugar a una reducción en las concentraciones de calcio, lo que podría generar señales relacionadas con los efectos adversos de las estatinas.

Además de secretarse al medio extracelular, se ha demostrado que los miRNA son capaces de transportarse a otros tejidos mediante lipoproteínas de alta densidad (HDL) y exosomas (Vickers et al, 2011). Los resultados de este estudio demuestran que miR-27b es capaz de incorporarse en lipoproteínas de muy baja densidad (VLDLs) secretadas por las células HepG2. Además, los niveles de expresión se ven alterados por el tratamiento con estatinas durante 24 horas, llegando a expresarse alrededor de 15 veces más en el caso de pravastatina y atorvastatina. Por tanto, estos resultados

sugieren que los miRNAs también son capaces de incorporarse en VLDL, pudiendo ser transportados así a distintos tejidos periféricos y actuando sobre ellos. Sin embargo, es necesario hacer estudios adicionales para confirmar que este miRNA y otros son realmente capaces de incorporarse en lipoproteínas y llegar a niveles de expresión tan altos como los observados en los resultados.

Estos resultados sugieren que el tratamiento con estatinas de tipo 2 (atorvastatina y rosuvastatina), induce una mayor sobreexpresión de miR-33a, miR-122 y miR-27b que el tratamiento con estatinas de tipo 1. Según las guías de la AHA (American Heart Association), atorvastatina y rosuvastatina son las estatinas de mayor intensidad, y reducen las concentraciones de colesterol en un 50% (Stone et al, 2013) pero también se asocian con una mayor incidencia de efectos adversos como la diabetes mellitus tipo 2. La razón por la que las estatinas de tipo 2 se asocian con más efectos adversos que las de tipo 1 todavía no está clara; se ha propuesto que la principal razón puede ser la lipofilia que tienen algunas estatinas. Las estatinas con mayor lipofilia son las que alcanzan mayores niveles de exposición en tejidos no hepáticos, ya que difunden con mayor facilidad por el torrente sanguíneo que las estatinas no lipofílicas. Así, las estatinas lipofílicas tienen menor hepatoselectividad que las no lipofílicas, ya que difunden de una manera similar por células hepáticas y por células no hepáticas. Por esta razón, se ha propuesto que las estatinas lipofílicas y por tanto poco hepatoselectivas, pueden tener mayor riesgo de provocar efectos adversos (Hamelin y Turgeon, 1998).

Otra posible explicación de las diferencias en el desarrollo de efectos adversos de las estatinas podría residir en los miRNAs. Como se ha comprobado en este trabajo, las estatinas de tipo 2 son las que mayor sobreexpresión de miR-33a, miR-122 y miR-27b provocan. Por esta razón, es posible que los miRNAs participen en el desarrollo de dichos efectos alterando la expresión de muchos genes que no solo están relacionados con el metabolismo del colesterol, y difundiendo estas señales por tejidos periféricos, ya sea por secreción al medio extracelular o por incorporación a lipoproteínas (tanto HDL como VLDL) o a exosomas. Sin embargo, son necesarios estudios adicionales que determinen exactamente cuál es la relación entre estos miRNAs con los efectos adversos provocados por las estatinas.

6. Bibliografía

Abzacchio MP, Burnstock G, Boeynaems JM, et al. (2006) International Union of Pharmacology LVIII: update on the P2Y G protein-coupled nucleotide receptors: from molecular mechanisms and pathophysiology to therapy. *Pharmacol Rev.* 58(3):281-341.

Aguiló F, Camarero N, Relat J, et al. (2010) Transcriptional regulation of the human acetoacetyl-CoA synthetase gene by PPAR γ . *Biochem J.* 427(2):255-64.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. (2010) Molecular biology of the cell, fifth edition. 493-494.

Allen RM, Marquart TJ, Albert CJ, et al. (2012) miR-33 controls the expression of biliary transporters, and mediates statin- and diet-induced hepatotoxicity. *EMBO Mol Med.* 4(9):882-95.

Ambros V. (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature.* 431:350-5.

Benoist F, Grand-Perret T. (1996) ApoB-100 secretion by HepG2 cells is regulated by the rate of triglyceride biosynthesis but not by intracellular lipid pools. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* 16(10):1229-35.

Brown MS, Goldstein JL (1997) The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane bound transcription factor. *Cell* 89(3):331-340.

Chen WJ, Yin K, Zhao GJ, et al. (2012) The magic and mystey of microRNA-27 in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 222(2):314-23.

Dweep H, Gretz N. (2015) miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods.* 12(8):697.

Ferrari D, Vitiello L, Idzko M, et al. (2015) Purinergic signaling in atherosclerosis. *Trends Mol Med.* 21(3):184-92.

Goedeke L, Rotllan N, Ramirez CM, et al. (2015) MiR-27b inhibits LDLR and ABCA1 expression but does not influence plasma and hepatic lipid levels in mice. *Atherosclerosis.* 243:499-509.

Hamelin BA, Turgeon J. (1998) Hydrophilicity/lipophilicity: relevance for the pharmacology and clinical effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Pharmacol Sci.* 19(1):26-37.

Hanai J, Cao P, Tanksale P, et al. (2007) The muscle-specific ubiquitin ligase atrogin-1/mafbx mediates statin-induced muscle toxicity. *J Clin Invest.* 117:3940-51.

Herrera BM, Lockstone HE, Taylor JM, et al. (2010) Global microRNA expression profiles in insulin target tissues in a spontaneous rat model of type 2 diabetes. *Diabetologia.* 53:1099-109.

Hsu SD, Lin FM, Wu WY, et al. (2011) miRTarBase: a database curates experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acid Res.* 39:D163-69.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-5.

Marquart TJ, Allen RM, Ory DS et al. (2010) miR-33 links SREBP-2 induction to repression of sterol transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 107(27):12228-12232.

Martini C, Trapani L, Narciso L, et al. (2009) 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase increase is essential for rat muscle differentiation. *J Cell Physiol.* 220:524-30.

Meex SJ, Andreo U, Sparks JD, et al. (2011) Huh-7 or HepG2 cells: which is the better model for studying human apolipoprotein-B100 assembly and secretion? *J Lipid Res.* 52(1):152-8.

Moore KJ, Rayner KJ, Suarez Y et al. (2011) The role of microRNAs in cholesterol efflux and hepatic lipid metabolism. *Annu Rev Nutr.* 31:49-63.

- Mullinax TR, Mock JN, McEvily AJ, et al. (1982) Regulation of mitochondrial malate dehydrogenase. Evidence for an allosteric citrate-binding site. *J Biol Chem.* 257(22):13223-9.
- Nakatani K, Sakaue H, Thompson DA, et al. (1999) Identification of a human Akt3 (protein kinase B gamma) which contains the regulatory serine phosphorylation site. *Biochem Biophys Res Commun.* 257(3):906-10.
- Norata GD, Sala F, Catapano AL, et al. (2013) MicroRNAs and lipoproteins: a connection beyond atherosclerosis? *Atherosclerosis.* 227(2):209-15.
- Pierce B. A. (2010). *Genetics: a conceptual approach*. Fourth edition: 387
- Rayner KJ, Suarez Y, Davalos A, et al. (2010) MiR-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis. *Science.* 328:1570-73.
- Ridker PM, Pradhan A, MacFayden JG, et al. (2012) Cardiovascular benefits and diabetes risks of statin therapy in primary prevention: an analysis from the Jupiter trial. *Lancet.* 380:565-71.
- Sirtori CR. (2014) The pharmacology of statins. *Pharmacol Res.* 88:3-11
- Song J, Bai Z, Han W, et al. (2012) Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients. *Dig Dis Sci.* 57(4):897-904.
- Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, et al. (2013) ACC/AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular disease risk in adults. *J Am Coll Cardiol.* doi:10.1016/j.jacc.2013.11.002.
- Switzer RC 3rd, Merrill CR, Shifrin S. (1979) A highly sensitive silver stain for detecting proteins and peptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem.* 98(1):231-37.
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, et al. (2011) MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol.* 13(4):423-33.
- Vidal-Puig AJ, Considine RT, Jimenez-Liñan M, et al. (1997) Pre-oxidative proliferator-activated receptor gene expression in human tissues: effects of obesity, weight loss, and regulation by insulin and glucocorticoids. *J Clin Invest.* 99(10):2416.
- Yao DC, Tolan DR, Murray MF, et al. (2004) Hemolytic anemia and severe rhabdomyolysis caused by compound heterozygous mutations of the gene for erythrocyte/muscle isozyme of aldolase, ALDOA. *Blood.* 103(6):2401-3.
- Zhou Q, Gallagher R, Ufret-Vincenty R, et al. (2010) Regulation of angiogenesis and choroidal neovascularization by members of microRNA-23-27-24 clusters. *Proc Natl Acad Sci USA.* 108:8287-92.

