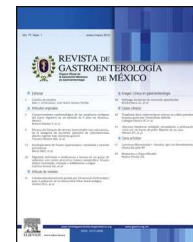




REVISTA DE  
GASTROENTEROLOGÍA  
DE MÉXICO

www.elsevier.es/rgmx



ARTÍCULO ORIGINAL

## Utilidad de la determinación sérica de microRNA-21 en la enfermedad inflamatoria del colon

P. Menéndez<sup>a,\*</sup>, P. Villarejo<sup>b</sup>, D. Padilla<sup>b</sup>, T. Palomino<sup>c</sup>, P. Nieto<sup>c</sup>,  
J.M. Menéndez<sup>d</sup> y J.A. Rodríguez-Montes<sup>e</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo, Hospital Gutiérrez Ortega, Valdepeñas, Ciudad Real, España

<sup>b</sup> Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo, Hospital General de Ciudad Real, Ciudad Real, España

<sup>c</sup> Servicio de Análisis Clínicos, Hospital General de Ciudad Real, Ciudad Real, España

<sup>d</sup> Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo «A», Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, España

<sup>e</sup> Servicio de Cirugía General y de Aparato Digestivo, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España

Recibido el 15 de septiembre de 2012; aceptado el 27 de febrero de 2013

Disponible en Internet el 14 de mayo de 2013

### PALABRAS CLAVE

Apendicitis aguda;  
MicroRNA;  
Enfermedad  
inflamatoria  
intestinal;  
Enfermedad  
de Crohn;  
Colitis ulcerosa

### Resumen

**Antecedentes:** Los microRNA son estructuras moleculares de 20-22 nucleótidos con actividad postranscripcional que están implicados en la respuesta inmunitaria, al igual que en las vías de la inflamación de diversas células y tejidos.

**Objetivos:** Presentamos un estudio prospectivo donde se determina la expresión sérica de microRNA-21 en pacientes con diagnóstico de apendicitis aguda como afección inflamatoria del colon.

**Material y métodos:** Estudio de cohorte prospectivo de pacientes con diagnóstico de apendicitis aguda. Se realizó el análisis de microRNA-21 sérico mediante PCR de las muestras sanguíneas de los pacientes obtenidas de forma preoperatoria. Los valores de microRNA-21 se compararon con variables analíticas (leucocitos, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, actividad de protrombina, glucosa, urea y creatinina) y anatomopatológicas (apéndice normal, apendicitis aguda flemosa, gangrenosa y perforada).

**Resultados:** Se incluyó, de forma consecutiva, a un total de 60 pacientes con diagnóstico de apendicitis aguda, desde junio del 2009 hasta octubre del 2009, siendo el 66% varones (40 hombres, 20 mujeres), con una edad media  $\pm$  desviación estándar de  $26.2 \pm 14.8$  años. Los niveles absolutos medios del microRNA-21 fueron de  $24.8 \pm 0.93$ , mientras que la expresión genética media del microRNA-21 fue de  $1.04 \pm 0.28$ , no observándose correlación con los parámetros analíticos y anatomopatológicos evaluados ( $p = 0.47$ ).

\* Autor para correspondencia: C/Julio Palacios 29, Esc. B. 7. B. 28029. Madrid. Teléfono: +34 660 333 554.  
Correos electrónicos: pablomensan@hotmail.com, pablo.menendez.sanchez@gmail.com (P. Menéndez).

**KEYWORDS**

Acute appendicitis;  
MicroRNA;  
Inflammatory bowel  
disease;  
Crohn's disease;  
Ulcerative colitis

**Conclusiones:** Es necesario continuar la búsqueda de cuáles son los microRNA más apropiados para que su determinación en suero conlleve una mayor precisión en el establecimiento del diagnóstico y pronóstico de las enfermedades inflamatorias intestinales.

© 2012 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Publicado por Masson Doyma México S.A. Todos los derechos reservados.

**Serum microRNA-21 usefulness in inflammatory pathology of the colon****Abstract**

**Background:** MicroRNAs are 20-22 nucleotide molecular structures with post-transcriptional activity that are involved in the immune response, as well as in the inflammatory pathways of different cells and tissues.

**Aims:** We present herein a prospective study in which serum microRNA-21 expression was determined in patients diagnosed with acute appendicitis as a model of bowel inflammation.

**Material and methods:** A prospective cohort study of patients diagnosed with acute appendicitis was conducted. Serum microRNA-21 was analyzed through the PCR of blood samples taken from the patients prior to surgery. MicroRNA-21 values were compared with the analytic variables (leukocytes, hemoglobin, hematocrit, platelets, prothrombin activity, glucose, urea, and creatinine) and the anatomopathologic variables (normal appendix, phlegmonous, gangrenous, and perforated acute appendicitis).

**Results:** A total of 60 patients with acute appendicitis diagnosis were consecutively included in the study from June to October 2009. Sixty-six percent of the patients were men (40 men and 20 women), with a mean age of  $26.2 \pm 14.8$  years. The mean absolute level of microRNA-21 was  $24.8 \pm 0.93$ , whereas the mean microRNA-21 gene expression was  $1.04 \pm 0.28$ . No correlation between the analytic and anatomopathologic parameters evaluated was observed ( $P=.47$ ).

**Conclusions:** It is necessary to continue to search for the most appropriate microRNAs, so that their determination in serum can lead to greater precision in establishing the diagnosis and outcome of inflammatory disorders of the bowel.

© 2012 Asociación Mexicana de Gastroenterología. Published by Masson Doyma México S.A. All rights reserved.

**Introducción**

Los microRNA son estructuras moleculares de 20-22 nucleótidos con actividad postranscripcional que están implicados en la regulación de la expresión genética, habiéndose puesto de manifiesto su participación en distintas funciones fisiológicas y patológicas, tales como la apoptosis, la proliferación y la diferenciación celular, demostrándose su funcionalidad como genes supresores de tumores o como protooncogenes en la carcinogénesis<sup>1</sup>.

En diferentes investigaciones se ha visto que los microRNA también están implicados en la respuesta inmunitaria, al igual que en las vías de la inflamación de diversas células y tejidos, tales como artritis reumatoide (microRNA-146a, microRNA-155), psoriasis (microRNA-21, microRNA-125b, microRNA-203), osteoartritis (microRNA-9) o colitis ulcerosa (microRNA-192)<sup>2</sup>.

El objetivo del presente estudio es presentar un estudio prospectivo donde se determina la expresión sérica de microRNA-21 en pacientes con diagnóstico de apendicitis aguda como afección inflamatoria del colon, permitiendo la incidencia de esta enfermedad un periodo corto de recogida de muestras. Se optó por la determinación de este microRNA por haberse demostrado la relación de la expresión del microRNA-21 con la enfermedad inflamatoria del colon<sup>3</sup>, estar incrementado en la mucosa de pacientes con colitis ulcerosa<sup>4</sup> y estar involucrado en otros procesos celulares<sup>5</sup>.

Contrariamente, el microRNA-16 se ha determinado en diferentes tejidos humanos, así como en muestras serológicas, considerándose como un control endógeno seguro en la determinación de expresiones aberrantes de otros microRNA<sup>6</sup>.

A pesar de no existir otros estudios que analicen la participación de los microRNA en la apendicitis aguda, pretendemos poner de manifiesto la presencia de los microRNA en la fisiopatología de la enfermedad inflamatoria buscando una correlación con los diferentes estadios clínicos de la enfermedad. Nuestra hipótesis es que los microRNA participan en los procesos inflamatorios intestinales, por lo cual se decidió estudiarlos en la apendicitis aguda y correlacionarlo con los diferentes estadios clínicos de la enfermedad, y, por tanto, su determinación en sangre permitiría obtener un diagnóstico precoz y no invasivo, evitando así procesos terapéuticos agresivos en situaciones de dudas diagnósticas.

**Material y métodos****Obtención de muestras**

Estudio de cohorte prospectivo constituido por pacientes que ingresaron para intervención quirúrgica con diagnóstico de afección apendicular aguda, realizado tanto por diagnóstico ecográfico, como por sospecha clínica, analítica y

exploración física. Previamente, se solicitaría el consentimiento informado para la integración de la correspondiente historia clínica en un proyecto de investigación. Preoperatoriamente, se realizaba la extracción específica de una muestra de 5 ml de sangre periférica en tubo BD Vacutainer®. De forma inmediata, el Servicio de Análisis Clínicos almacenaba las muestras en un congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$  tras la centrifugación de la sangre para la obtención de 2 alícuotas de 2 ml de suero. Tras la realización de la apendicectomía, la pieza quirúrgica se remitía al Servicio de Anatomía Patológica, previa fijación en formaldehído 3.7-4.0% tamponado a  $\text{pH} = 7$  y estabilizado con metanol DC.

### Procesamiento de las muestras

A partir de las muestras de suero, se realizó el aislamiento del RNA, para la posterior realización de la técnica cuantitativa de la reacción en cadena de polimerasa a tiempo real, siempre siguiendo las normas de procesamiento del fabricante. El proceso de aislamiento del microRNA-21 y microRNA-16 se realizó mediante *High Pure miRNA Isolation Kit-Roche Diagnostics SL*, España (versión de julio del 2009). Para la obtención de los DNA complementarios de microRNA-21 y microRNA-16 (retrotranscripción) se empleó el kit de síntesis cDNA Strand First Transcriptor-Roche Diagnostics SL, España (versión de abril del 2007). Como *primers* específicos para la retrotranscripción inversa se emplearon los kits Taqman® microRNA Assay miR-21 y miR-16, TIB Molbiol Syntheselabor GmbH, Berlín (Alemania). Para la cuantificación de los microRNA se realizó la amplificación mediante reacción en cadena de polimerasa en LightCycler® 2.0 Roche Diagnostics SL, España, utilizando las sondas de amplificación incluidas en los kits Taqman® microRNA Assay.

### Análisis de la expresión de los microRNA y análisis estadístico

Los valores absolutos de los Ct según las curvas de amplificación de cada microRNA, así como el análisis de la expresión genética, que determina la expresión del microRNA-21 respecto al microRNA de control (microRNA-16), se estimaron siguiendo la metodología propuesta por Livak y Schmittgen (Methods 2001).

$$\begin{aligned} \text{Expresión} &= 2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{C.muestra\_Ct.housekeeping})} \\ &= 2^{-(\text{C.miR21\_Ct.miR16})} \end{aligned}$$

Los parámetros evaluados se dividieron en 3 categorías: parámetros clínicos, parámetros analíticos (leucocitos totales, hemoglobina, hematocrito, plaquetas, actividad de protrombina, glucosa, urea, creatinina, microRNA-21 en suero y microRNA-16 en suero) y parámetros anatomopatológicos (grado de afectación apendicular).

El análisis estadístico del estudio se llevó a cabo mediante el programa estadístico PASW 18.0 (SPSS Inc, Chicago, EE. UU.). Se seleccionó un riesgo alfa del 5% ( $p < 0.05$ ) en todos los contrastes. Los contrastes entre variables cuantitativas y cualitativas (niveles de expresión genética en relación a parámetros anatomopatológicos) se llevaron a cabo mediante pruebas no paramétricas para comparación de 2 grupos (U de Mann-Whitney) y más de 2 grupos (H de Kruskal-Wallis). En las correlaciones entre variables cuantitativas (correlaciones de los niveles de expresión génica con parámetros analíticos) se empleó la correlación no paramétrica de Spearman (Rho).

### Resultados

Se incluyó, de forma consecutiva, a un total de 60 pacientes con diagnóstico de apendicitis aguda, desde junio del 2009 hasta octubre del 2009, siendo el 66% varones (40 hombres, 20 mujeres), con una edad media  $\pm$  desviación estándar de  $26.2 \pm 14.8$  años. Expresados como media  $\pm$  desviación estándar, los parámetros analíticos que se determinaron fueron, entre otros: leucocitos ( $\times 10^9/\text{L}$ )  $13.90 \pm 3.44$ ; hemoglobina (g/dL)  $14.87 \pm 1.61$ ; plaquetas ( $\times 10^9/\text{L}$ )  $240 \pm 63$ ; (tabla 1).

El diagnóstico anatomopatológico más frecuente fue de apendicitis aguda flemonosa en 48 casos (77.4%), seguido de la apendicitis aguda gangrenosa en 11 casos (17.7%), de apéndice ileocecal de características normales en 2 casos (3.2%) y de apendicitis aguda perforada en un caso (1.6%).

La expresión absoluta media tanto del microRNA-21 como del microRNA-16 fue de  $24.8 \pm 0.93$ . La expresión genética media del microRNA-21 fue  $1.04 \pm 0.28$  (tabla 2, fig. 1), indicando la sobreexpresión del microRNA-21 respecto al microRNA de control (*housekeeping*), microRNA-16. No hubo ningún tipo de correlación en la expresión del microRNA-21 respecto a los resultados de laboratorio, ni diferencias en la expresión con respecto a los tipos anatomopatológicos (tablas 3 y 4). No se llevaron a cabo las correlaciones del microRNA-16 con los diferentes parámetros, ya que al considerarse un control endógeno, su principal utilidad es determinar la expresión relativa del miR-21.

**Tabla 1** Parámetros analíticos

Analíticos	Media	Mediana	DE	Mín	P25	P50	P75	Máx
Leucocitos ( $\times 10^9/\text{L}$ )	13,902	13,600	3,4379	6.6	11.8	13.6	16.0	22.5
Hemoglobina (g/dL)	14,876	15,150	1,6098	10.3	13.8	15.2	15.9	18.3
Hematocrito (%)	43,979	44,700	4,7193	30.3	41.2	44.7	47.4	54.1
Plaquetas ( $\times 10^9/\text{L}$ )	240.24	241.00	63,781	65	202	241	281	407
Act. de protrombina (%)	86,740	87,850	11,0617	58.2	78.8	87.9	97.8	100.0
Glucosa (mg/dL)	105.84	103.00	17.470	72	96	103	114	165
Urea (mg/dL)	24.43	23.50	7,315	8	19	24	30	46
Creatinina (mg/dL)	0.794	0.800	0.1932	0.5	0.6	0.8	0.9	1.5

**Tabla 2** Niveles absolutos y expresión genética de microRNA-21 y microRNA-16

MicroRNA	Media ± DE	Mediana	P25-P75	Rango
microRNA-21	24.8 ± 0.93	24.7	24.1-25.6	22.9-27.0
microRNA-16	24.8 ± 0.93	24.7	24.1-25.6	22.9-26.4
Expresión	1.04 ± 0.28	0.98	0.84-1.21	0.49-1.74

**Tabla 3** Expresión de microRNA-21 respecto a los parámetros de laboratorio

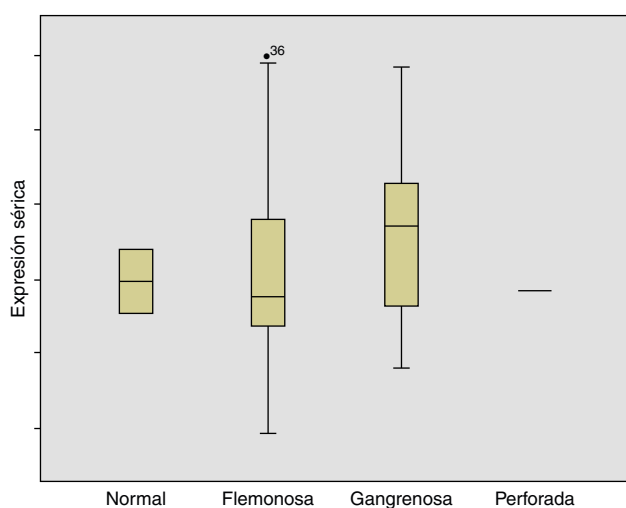
Análíticos	Rho	p
Leucocitos (×10 <sup>9</sup> /L)	-0.048	0.71
Hemoglobina (g/dL)	0.197	0.13
Hematocrito (%)	0.153	0.24
Plaquetas (×10 <sup>9</sup> /L)	0.024	0.85
Actividad de protrombina (%)	-0.139	0.29
Glucosa (mg/dL)	-0.117	0.37
Urea (mg/dL)	0.036	0.79
Creatinina (mg/dL)	0.118	0.37

**Tabla 4** Expresión de microRNA-21 respecto a los parámetros anatomopatológicos

Afectación apendicular	Media ± DE	p
Normal	0.99 ± 0.16	0.47
Flemonosa	1.01 ± 0.27	
Gangrenosa	1.14 ± 0.32	
Perforada	0.96	

### Discusión

Un gran número de investigaciones tienen como objetivo identificar métodos de cribado no invasivos enfocados hacia el diagnóstico temprano de diferentes enfermedades, tales como pruebas hematológicas o el análisis del DNA en heces<sup>7</sup>.



**Figura 1** Expresión genética según el grado de afectación apendicular.

La implicación de los microRNA sobre la estabilidad de la regulación del RNA en la expresión genética ha llevado a determinar estas «moléculas no codificantes» de RNA en diferentes fluidos orgánicos (plasma, suero, orina, lágrima y saliva), habiéndose constatado una alta concentración de microRNA libres en sangre periférica<sup>5</sup>. También se pusieron de manifiesto ciertas modificaciones en las concentraciones de microRNA en las enfermedades inflamatorias, tales como el incremento de microRNA-146a y microRNA-223 en estados sépticos debidos al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica<sup>5,8</sup>.

En las enfermedades inflamatorias, se ha evidenciado una expresión diferente de los microRNA en sangre periférica, y su participación en enfermedades inflamatorias y autoinmunes<sup>9</sup>. La primera determinación de los microRNA en heces puso de manifiesto una expresión diferente en el cáncer colorrectal con respecto a la colitis ulcerosa, resultados coincidentes con las determinaciones histopatológicas en ambas situaciones<sup>10</sup>. Se evidenció también la diferencia de expresión de los microRNA en pacientes con colitis ulcerosa, colitis infecciosa y pacientes con síndrome del intestino irritable<sup>11</sup>. A pesar de las referencias bibliográficas que establecen una sobreexpresión de los microRNA en el proceso inflamatorio, los resultados obtenidos en este estudio no otorgan ninguna utilidad para el diagnóstico de la apendicitis aguda.

En el presente estudio, se empleó como microRNA de control o *housekeeping* el microRNA-16; el microRNA-16 se ha determinado en diferentes tejidos humanos y muestras serológicas, considerándose como un control endógeno seguro en la determinación de los microRNA. Dos estudios diferentes coincidieron en la determinación de microRNA-16 como microRNA normalizador. Diferentes estudios han empleado otros controles endógenos como RNU6B, 5S rRNA, microRNA-26a, microRNA-425, microRNA-454 o let-7a<sup>6,12</sup>.

A pesar de que en el presente estudio la determinación del microRNA-21 en suero ha demostrado un rendimiento diagnóstico bajo para la apendicitis aguda, existen posibles connotaciones que podrían explicar los resultados obtenidos. Los microRNA pueden ser mediadores dependientes de la inflamación al haberse evidenciado la modificación de las concentraciones de los microRNA en enfermedades inflamatorias y en estados sépticos<sup>5,8</sup>. Resultados funcionales que concuerdan con los obtenidos por Bihrer et al., en el sentido de que la expresión de microRNA-21 está claramente relacionada con la actividad necroinflamatoria<sup>3</sup>.

Según lo expuesto, la participación del microRNA-21 en los procesos inflamatorios —tal y como se ha descrito en literatura médica—<sup>5,8,13</sup>, así como las modificaciones vasculares secundarias al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, podrían apuntar a las limitaciones propias de la presente investigación, ya que la elección de la patología provocase *per se* un sesgo en la comparativa de las

expresiones del microRNA-21. La elección de pacientes con apendicitis aguda se basó en la facilidad para la obtención de muestras, séricas y quirúrgicas, de una enfermedad cólica inflamatoria que resultaba inédita en la literatura médica sobre este campo de investigación. La repetición del estudio incluyendo un grupo de controles sanos, muy probablemente otorgase al microRNA-21 una capacidad discriminativa mayor con respecto a las enfermedades inflamatorias intestinales.

## Conclusiones

En el presente estudio, las determinaciones de microRNA-21 en sangre no obtuvieron una utilidad diagnóstica en la apendicitis aguda. Estos resultados no pueden considerarse necesariamente concluyentes (la ausencia de evidencia no significa evidencia de la ausencia), ya que los resultados se han obtenido sin llevar a cabo la comparación con un grupo control.

Es necesario continuar la búsqueda de cuáles son los microRNA más apropiados para que su determinación en suero conlleve una mayor precisión en el establecimiento del diagnóstico y pronóstico de las enfermedades inflamatorias intestinales, siendo imprescindible continuar avanzando en el conocimiento no solo de las funciones que desempeñan los microRNA circulantes, sino también sobre su auténtica procedencia. Igualmente, es necesario continuar con las investigaciones preoperatorias en relación con las variaciones de expresión de los microRNA, para determinar la utilidad pronóstica de la determinación sérica postoperatoria.

## Financiación

El presente estudio ha sido financiado con la ayuda otorgada por La Fundación para la Investigación Sanitaria en Castilla-La Mancha (FISCAM) y por la Fundación Mutua Madrileña Investigación Médica.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

## Bibliografía

1. Tang JT, Fang JY. MicroRNA regulatory network in human colorectal cancer. *Mini Rev Med Chem.* 2009;9:921–6.
2. Bostjancic E, Glavac D. Importance of microRNAs in skin morphogenesis and diseases. *Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat.* 2008;17:95–102.
3. Bihrer V, Waidmann O, Friedrich-Rust M, et al. Serum microRNA-21 as marker for necroinflammation in hepatitis C patients with and without hepatocellular carcinoma. *PLoS One.* 2011;6:e26971.
4. Takagi T, Naito Y, Mizushima K, et al. Increased expression of microRNA in the inflamed colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 2010;25 Suppl 1:S129–33.
5. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:10513–8.
6. Luo X, Burwinkel B, Tao S, et al. MicroRNA signatures: Novel biomarker for colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2011;20:1272–86.
7. Tsang JC, Lo YM. Circulating nucleic acids in plasma/serum. *Pathology.* 2007;39:197–207.
8. Brase JC, Wuttig D, Kuner R, et al. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer.* 2010;9:306.
9. Wu F, Guo NJ, Tian H, et al. Peripheral blood microRNAs distinguish active ulcerative colitis and Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis.* 2011;17:241–50.
10. Ahmed FE, Jeffries CD, Vos PW, et al. Diagnostic microRNA markers for screening sporadic human colon cancer and active ulcerative colitis in stool and tissue. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009;6:281–95.
11. Wu F, Zikusoka M, Trindade A, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology.* 2008;135:1624–35.
12. Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, et al. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2010;10:173.
13. Schetter AJ, Heegaard NH, Harris CC. Inflammation and cancer: interweaving microRNA, free radical, cytokine and p53 pathways. *Carcinogenesis.* 2010;31:37–49.