

TESINA DE GRADUACIÓN  
LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

“ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN ENTRE  
EL ONCOMIR HSA-MIR-183-5P Y EL  
SUPRESOR DE TUMOR PDCD4 EN  
CÁNCER DE PRÓSTATA”

---

Carolina Oliveira Rizzo

*Tutor: María Ana Duhagón Serrat*

*Co-tutor: Rafael Fort Canobra*

*Montevideo, Diciembre 2015*



FACULTAD DE  
**CIENCIAS**

UDELAR | [fcien.edu.uy](http://fcien.edu.uy)

# ÍNDICE

---

<b>ÍNDICE</b> .....	<b>1</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	<b>3</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>5</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>7</b>
CÁNCER.....	7
CÁNCER DE PRÓSTATA.....	9
<i>Etiología del PCa</i> .....	10
<i>Detección del PCa</i> .....	10
MICROARNs (miRs) .....	14
<i>Generalidades de miRs</i> .....	14
<i>Biogénesis de miRs</i> .....	16
<i>miRs en cáncer</i> .....	18
<i>miRs en PCa</i> .....	20
FAMILIA MIR-183 .....	21
<i>Funciones de la familia miR-183</i> .....	21
<i>Blancos validados de hsa-miR-183-5p</i> .....	23
<i>Blancos compartidos del clúster hsa-miR-183-96-182</i> .....	24
PROGRAMMED CELL DEATH 4 .....	25
<i>Mecanismo de represión mediado por PDCD4</i> .....	26
<i>Localización subcelular de PDCD4</i> .....	27
<i>Expresión y regulación de PDCD4</i> .....	27
<i>Funciones de PDCD4</i> .....	28
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>31</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
GENERAL .....	36
ESPECÍFICOS.....	36
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
MATERIALES.....	37
<i>Líneas Celulares</i> .....	37
<i>Bacterias DH5α</i> .....	38
<i>Vectores reporteros</i> .....	39
<i>Oligonucleótidos</i> .....	41
MÉTODOS .....	43
<i>Preparación de ADN plasmídico</i> .....	43
<i>Cultivos celulares</i> .....	45
<i>Ensayos de Genes Reporteros</i> .....	47
<i>Cuantificación de la proteína PDCD4 por Inmunofluorescencia</i> .....	49
<i>Análisis estadísticos</i> .....	50
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>51</b>
ENSAYOS DE GENES REPORTEROS .....	51
<i>Preparación de ADN plasmídico</i> .....	51
<i>Puesta a punto de los ensayos de transfección</i> .....	54
<i>Resultados</i> .....	63
INMUNOFLUORESCENCIA DE PDCD4.....	65
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>71</b>



# AGRADECIMIENTOS

---

Quiero agradecer profundamente a todas aquellas personas que me acompañaron en esta etapa.

En primer lugar, agradecer a María Ana Duhagón por abrirme las puertas de su laboratorio desde el primer momento. Por darme su confianza y permitirme aprender de su experiencia en esta área que tanto me apasiona desde chica. Por la dedicación y el excelente clima de trabajo, gracias.

A Rafael Fort, por la ayuda incondicional en todos los experimentos y por todas las horas compartidas de trabajo. Por ser un excelente compañero y amigo, gracias.

Al grupo de laboratorio dirigido por Beatriz Garat, a Pablo, Leti, Lu, Lore, Santi Chavez, Santi Radío, Flor y Martín, por sus consejos en todo momento y por hacer las horas de trabajo más amenas.

Al grupo de José Sotelo, especialmente a Andrés y Guillermo por la ayuda brindada con los experimentos.

A mis compañeros del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina que se involucraron en el proyecto.

A mi familia, por el apoyo incondicional. A mi madre por las palabras de aliento y especialmente a mi abuelo por siempre estar dispuesto a escucharme y tratar de entender mi trabajo. Agradecer también a mi hermano, por pelearme de vez en cuando y a la vez hacerme reír.

A mis amigas de siempre y a las chichis de fcien, por ser mi soporte en cada caída. Por hacer de esta etapa la más linda de todas.

Finalmente, a la ANII por el apoyo económico.



# RESUMEN

---

El cáncer de próstata (PCa) es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia en el mundo y la segunda causa de muerte por cáncer en Uruguay, habiendo sido estimado un promedio de 1.500 de nuevos casos y 600 muertes por año entre los años 2007 y 2011, según datos del Registro Nacional de Cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Los métodos de detección actualmente utilizados no han reducido significativamente la mortalidad y su falta de especificidad conduce a someter a pacientes con bajo riesgo a tratamientos innecesarios, por lo que es relevante la identificación de nuevos biomarcadores.

Los microARNs (miRs) surgen como buenos candidatos para su uso como biomarcadores en cáncer debido a su gran estabilidad en plasma, suero y tejidos fijados, y su especificidad, reproducibilidad y consistencia entre individuos de la misma especie. Estas son moléculas endógenas de ARN no codificante de aproximadamente 22 nucleótidos, que regulan más del 60% de los genes humanos. Son frecuentemente represores que interactúan con secuencias complementarias en la región 3'UTR de su ARNm blanco, disminuyendo su estabilidad o traductibilidad. Presentan un potencial valor clínico en diagnóstico, pronóstico, predicción y terapia del cáncer, porque presentan perfiles de expresión únicos en diferentes tipos y estadios de cáncer, abriendo la posibilidad de la que se denomina la "oncología personalizada". Su relevancia clínica se extiende a toda la patología humana.

Específicamente en PCa, se ha demostrado que las firmas de miRs pueden correlacionarse con la clínica, utilizándolos como indicadores de diagnóstico, pronóstico y terapéutica.

Hsa-miR-183-5p fue identificado por nuestro grupo en un cribado de expresión diferencial de miRs modulados durante la diferenciación de células madre de PCa. Varios estudios independientes observan un incremento de los niveles de este miR en tejido tumoral o metastásico. En este contexto, nuestro grupo ha obtenido varias evidencias que apoyan la naturaleza oncogénica de hsa-miR-183, a través del análisis

de la cuantificación de hsa-miR-183 en líneas celulares de PCa, y en prostatectomías, así como por abordajes de pérdida y ganancia de función en líneas celulares. A partir de aproximaciones bioinformáticas y de meta-análisis, hemos seleccionado un grupo de genes blanco de hsa-miR-183-5p candidatos.

Este trabajo apuntó a validar experimentalmente a *PDCD4*, uno de los candidatos seleccionados por nuestro grupo, que es un conocido gen supresor de tumor cuyo producto proteico interacciona con la maquinaria de traducción, por lo que participa en la regulación de diversos procesos celulares, tales como el ciclo celular, diferenciación y apoptosis. Para esto, se estudió la modulación directa y sitio específica de hsa-miR-183-5p con la 3'UTR salvaje y mutante de *PDCD4* clonada corriente abajo de un gen reportero de luciferasa. Asimismo, se estudió la modulación de la expresión endógena de *PDCD4* por hsa-miR-183-5p mediante microscopía de inmunofluorescencia. Los resultados mostraron evidencias a favor de la regulación de *PDCD4* por hsa-miR-183-5p a través de la interacción directa con la secuencia complementaria a la región semilla del miR presente en la región 3'-UTR de su ARNm.

# INTRODUCCIÓN

---

## CÁNCER

“Cáncer” es un término general que se utiliza para identificar un amplio número de patologías, caracterizadas por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular (Pierce, Shikes et al. 1978). En el organismo adulto, las células crecen y se dividen solo a efectos de mantener la homeostasis tisular. Cuando las células normales envejecen o se dañan, las mismas pueden morir y ser reemplazadas por nuevas células con potencial replicativo, reestableciendo la estructura del tejido normal. Sin embargo, cuando este proceso ordenado se descontrola y las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, pueden formarse masas celulares que se denominan tumores.

El cáncer es fundamentalmente una enfermedad **genética** y epigenética que requiere la acumulación de alteraciones genómicas que inactivan genes supresores de tumores y activan proto-oncogenes (Kent and Mendell 2006). Algunas de estas mutaciones pueden transmitirse en la descendencia en forma heterocigota en las células germinales. Sin embargo, la mayoría del cáncer surge en forma esporádica, producto de mutaciones espontáneas en células somáticas, promovidas por de la acción de agentes carcinógenos ambientales, tales como virus, radiaciones y sustancias químicas (Leon, Guerrero et al. 1987). Entre los genes más estudiados mutados en cáncer, encontramos a los supresores tumorales PTEN y p53, y a los oncogenes MYC y RAS, que se ha visto que están involucrados en complicadas redes de interacción que regulan la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Dang 1999); (Hickman, Moroni et al. 2002); (Malumbres and Barbacid 2003). Recientemente, la familia de proteínas supresoras tumorales y oncoproteínas se ha ampliado para incluir la especie de moléculas pequeñas de ARN, conocidas como microARNs.

En el transcurso del desarrollo de un tumor, las células normales sufren una serie de cambios o **alteraciones fenotípicas** que resultan ineludibles en el proceso de transformación. Esta serie de alteraciones constituyen lo que se denominan las firmas

o sellos distintivos del cáncer (en inglés, *Hallmarks of Cancer*) y proporcionan una base conceptual para la comprensión de la biología del cáncer. Estos pueden resumirse en: capacidad de autosuficiencia en el desarrollo de señales de crecimiento y mantenimiento de señales de proliferación, evasión de las señales antiproliferativas, activación y adquisición de capacidad invasiva (local y metástasis), desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal, inducción de la angiogénesis y resistencia a la muerte celular (Figura 1) (Hanahan and Weinberg 2011). Estas firmas están siendo continuamente revisadas y ampliadas, en particular integrando la relevancia del medio ambiente tumoral en el desarrollo del cáncer (Hanahan and Coussens 2012).



**Figura 1.** Esquema que resume las diferentes capacidades o alteraciones que debe experimentar una célula normal en el proceso de carcinogénesis. Modificado de Hanahan y Coussens 2012.

A pesar de los avances en el conocimiento de los cambios moleculares y celulares involucrados en el inicio y progresión del cáncer, no ha habido una reducción sustancial en la proporción de muertes por esta enfermedad. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), en 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes. Se estima que 32,6 millones de personas viven con cáncer (dentro de los 5 años de diagnóstico) en todo el mundo (Ferlay, Shin et al. 2010). El 90% de estas muertes pueden ser atribuidas a enfermedades metastásicas

que, por su heterogeneidad y complejidad, difícilmente responden a terapias convencionales como cirugía, radiación y quimioterapia.

## CÁNCER DE PRÓSTATA

Dentro de los tumores sólidos, el cáncer de próstata (PCa) es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo. Aproximadamente 1,1 millones de hombres en todo el mundo fueron diagnosticados con cáncer de próstata en 2012, representando el 15% del total de diagnósticos de cáncer en hombres (Ferlay, Shin et al. 2010). Específicamente en Uruguay, el PCa constituye el segundo cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, habiendo sido estimado un promedio de 1.500 nuevos casos y 600 muertes por año entre 2007 y 2011, según datos del Registro Nacional de Cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (Figura 2). Datos más recientes del mismo registro indican que entre el período 2004-2013 existe una tendencia leve pero significativa del descenso de la mortalidad en Uruguay, la cual podría deberse a la introducción del cribado por PSA, como se ha visto en otros países.

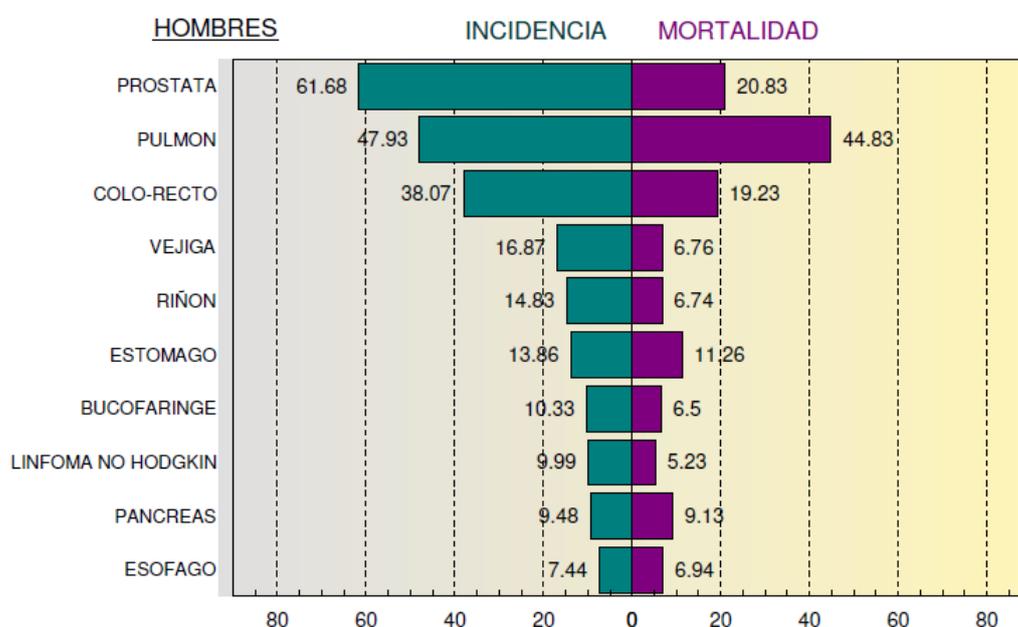


Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en hombres en Uruguay (2007 – 2011). Extraído del Registro Nacional de Cáncer (RNC), Comisión Honoraria de la Lucha contra el Cáncer.

## *Etiología del PCa*

El Cáncer de Próstata se considera una enfermedad compleja, multifactorial, con factores ambientales y genéticos involucrados en su etiología (Kral, Rosinska et al. 2011); (Nwosu, Carpten et al. 2001). Encontramos la edad, la etnia, el estilo de vida y la historia familiar como los principales factores que influyen en la incidencia de esta enfermedad. Estudios de gemelos han sugerido que la contribución de los factores genéticos en el desarrollo de PCa es mayor que en otros tipos cánceres (Lichtenstein, Holm et al. 2000).

La incidencia del cáncer de próstata aumenta vertiginosamente con la edad, siendo los hombres mayores de 65 años los que presentan mayor riesgo de padecerlo. Por otro lado, si consideramos las distintas etnias, los hombres de origen afroamericano presentan mayor riesgo de desarrollar PCa y presentan sintomatologías más severas, con una tasa de mortalidad dos veces superior en comparación con la de hombres de origen caucásico (Farkas, Marcella et al. 2000). Se ha asociado esta diferencia a factores genéticos como también a factores socio-económicos, como la disponibilidad o acceso a servicios de salud (Wallace, Prueitt et al. 2008); (Larkin, Zeidan et al. 2010). La inflamación crónica también es causa de PCa y se da con mayor frecuencia en individuos afroamericanos. Adicionalmente, se han asociado aspectos como la actividad sexual, la ingesta de grasa animal, la ingesta de alcohol, el tabaquismo, la obesidad, la ingesta de minerales como calcio, selenio, zinc, y vitaminas D y E (Kral, Rosinska et al. 2011). Finalmente, el PCa presenta un riesgo aumentado en pacientes con antecedentes familiares, estando influenciado por la edad de aparición y número de familiares afectados. Se ha estimado que cerca del 15% de quienes reciben un diagnóstico de cáncer de próstata tienen un pariente de primer grado con esta enfermedad.

## *Detección del PCa*

Los métodos de tamiz que se utilizan actualmente para la detección temprana de PCa se basan en la identificación de biomarcadores específicos. Estos son moléculas biológicas que indican la presencia o ausencia de un proceso patológico y que pueden

ser detectadas en fluidos corporales, como sangre y orina. Las características ideales que debe presentar un biomarcador comprenden una alta estabilidad, especificidad, sensibilidad y practicidad, que presente un método de cuantificación poco invasivo y que sea posible realizar una asociación directa con el estado y progreso de la enfermedad, como también con la respuesta a la terapéutica.

### *Antígeno Específico de Próstata (PSA)*

Actualmente, el **antígeno específico de próstata (PSA)** es el único marcador que se utiliza en la clínica de manera generalizada para la detección del PCa. Se trata de una serín-proteasa regulada por andrógenos, que es secretada por el epitelio prostático y el de las glándulas periuretrales, que participa en la licuefacción y liberación de espermatozoides. El principal problema del PSA es su falta de especificidad. El mismo puede verse incrementado en otros cánceres, así como también en hiperplasia prostática benigna (HPB) y la prostatitis. Adicionalmente, se ha visto que los niveles de PSA aumentan con la edad y por el uso de drogas específicas, como hormonas masculinas. Por otro lado, numerosos factores pueden causar una disminución de los niveles de PSA, como inhibidores de la 5- $\alpha$  reductasa, mezclas de hierbas, obesidad, aspirina, estatina y diuréticos tiazídicos. Consecuentemente, los falsos positivos son el principal problema de este test; de hecho se ha estimado que solo el 25-30% de los hombres con altos niveles de PSA en sangre tienen efectivamente PCa. Esto conlleva frecuentemente a un sobrediagnóstico, que conduce a intervenciones innecesarias que producen alta morbilidad así como costos de salud innecesarios. La baja sensibilidad y especificidad del PSA, así como la subjetividad del examen rectal para detectar un aumento o irregularidad en la morfología de la glándula prostática, hacen necesario la identificación de nuevos marcadores con el fin de predecir la severidad de la enfermedad, reducir la morbilidad y evitar tratamientos innecesarios (Esfahani, Ataei et al. 2015); (Filella and Foj 2015).

### *Otros biomarcadores de PCa*

En los últimos años, se han descrito nuevos biomarcadores de PCa con el objetivo de aumentar la especificidad de diagnóstico y diferenciar entre los cánceres clínicamente

agresivos de aquellos que son indolentes. Alguno de ellos son derivados o isoformas del PSA, tales como el Índice de Salud de la Próstata (en inglés, *Prostate Health Index PHI*), que se calcula tomando en cuenta las concentraciones séricas de p2PSA, PSA total y PSA libre; como también el panel de cuatro calicreínas, que incluyen el nivel de PSA total, PSA libre, PSA intacto y la calicreína humana 2 (en inglés, *Human Kalikrein 2 hK2*) (Filella and Foj 2015). El **antígeno de cáncer de próstata 3** (en inglés, *Prostate Cancer Antigen 3 o PCA3*) ha sido aprobado en 2012 por la FDA como una prueba de diagnóstico del PCa en el marco de una biopsia de próstata negativa. Se trata de un ARN no codificante que se ha demostrado que se encuentra elevado en más del 90% de los hombres con PCa, no así en la glándula prostática normal o en la hipertrofia prostática benigna. Por lo tanto, se ha considerado muy útil en el momento de decidir realizar una re-biopsia y en el seguimiento de pacientes que requieren una vigilancia activa (Crawford 2015).

Una mejor comprensión de las bases moleculares del proceso de carcinogénesis del PCa ha producido un aumento en el número de potenciales herramientas de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Bostrom, Bjartell et al. 2015). Por ejemplo, la translocación que produce la fusión entre el gen de la serín-proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) y el oncogén ERG (del homólogo al gen v-ets erythroblastosis E26 del virus de aves), es la variante predominante en el 40-80% de los PCa y se ha visto que está asociada con la significancia clínica de PCa. Adicionalmente, la pérdida total o desregulación del gen PTEN se asocia con un mayor grado de Gleason, riesgo de progresión y la recurrencia después de la terapia. Además, se asocia con la enfermedad avanzada, tanto localizada como metastásica, y la muerte. El test para la detección de una delección parcial o total del gen se realiza en hombres diagnosticados con PCa y puede ayudar a determinar la tasa de progresión de la enfermedad así como también para determinar la terapia apropiada (Crawford 2015).

Debido a la naturaleza heterogénea del PCa, se hace difícil identificar un único biomarcador adecuado. Adicionalmente, a pesar de que existen muchos biomarcadores prometedores, ninguno de ellos cumple con todos los criterios necesarios. Por lo tanto, la evidencia actual muestra una tendencia en la utilización de

paneles o series de marcadores (denominados *Multiplexing*) para caracterizar los fenotipos heterogéneos del PCa en la población. Los recientes avances en las tecnologías de alta posesividad (en inglés, *high-throughput technologies*) que permiten la rápida cuantificación y comparación de la expresión de diversas moléculas en un gran número de muestras, han ayudado a ampliar la búsqueda de tales biomarcadores. Varios paneles de genes ya están disponibles en el mercado, aunque la mayoría todavía tienen que ser ampliamente utilizados para verificar su utilidad. Entre ellos, encontramos los paneles Prolaris, Oncotype DX Genomic Prostate Score y Decipher, los cuales pueden ser utilizados para estimar evolución de la enfermedad además de los parámetros clínicos (Bostrom, Bjartell et al. 2015). ConfirmMDx es un test que detecta marcas epigenéticas características del proceso de carcinogénesis que pueden estar presentes a pesar del fenotipo normal de las células. Se ha demostrado que ayuda a distinguir aquellos pacientes que presentan una biopsia negativa real de aquellos que podrían estar desarrollando la enfermedad, y proporciona información útil para evitar que aquellos hombres que realmente no presentan PCa no se sometan a re-biopsias innecesarias e identificar aquellos que realmente lo requieren, así como un posible tratamiento (Bostrom, Bjartell et al. 2015, Crawford 2015). En la **Figura 3** se detalla la estrategia de diagnóstico del PCa con principal énfasis en los biomarcadores disponibles hasta el momento según la revisión de Crawford, D. en 2015. Estrategias futuras adicionales incluyen el uso de la información genética de las células tumorales circulantes en la sangre periférica para el diagnóstico inicial así como también para la toma de decisiones en las etapas posteriores (Bostrom, Bjartell et al. 2015).

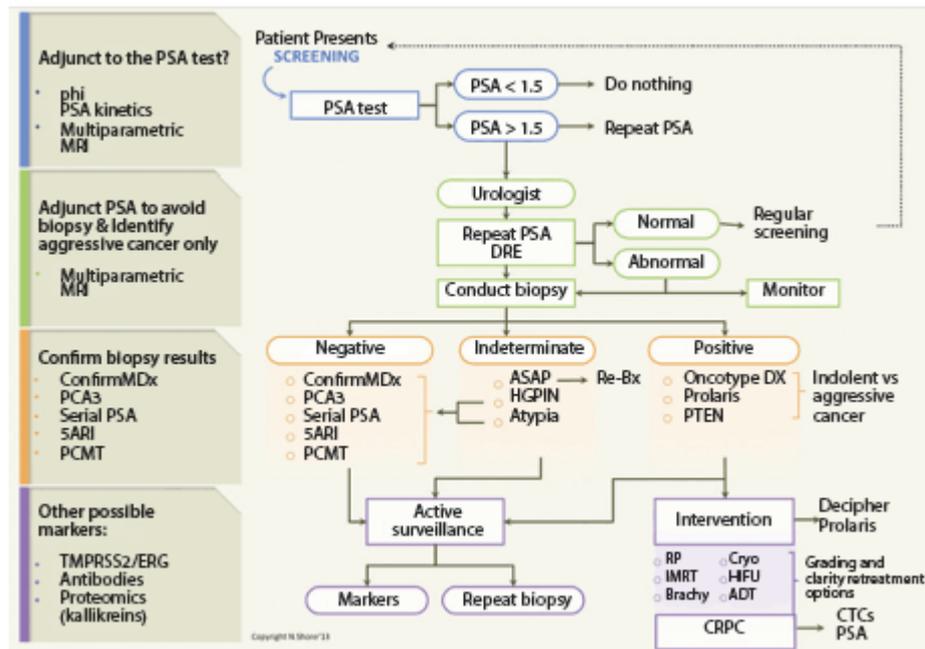


Figura 3. Estrategia de diagnóstico del PCa con principal énfasis en los biomarcadores actualmente disponibles. Tomado de Crawford, D. 2015.

## MICROARNs (miRs)

En este complejo escenario, los microARNs (miRs) surgen como buenos candidatos para su uso como biomarcadores en cáncer debido a su gran estabilidad en plasma, suero y tejidos fijados y su especificidad, reproducibilidad y consistencia entre individuos de la misma especie. De hecho, se ha demostrado que los miRs presentes en el suero permanecen estables después de haber sido sometidos a condiciones severas, como de ebullición, niveles extremos de pH y ciclos de congelamiento y descongelamiento, así como también pueden ser preservados por largo tiempo en biobancos (Cannistraci, Di Pace et al. 2014).

### Generalidades de miRs

Los miRs son pequeñas moléculas de ARN simple hebra, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, codificados en el genoma de una diversidad de organismos como plantas, animales, hongos y virus. Los genes de miRs pueden estar presentes tanto en secuencias intergénicas, los cuales contienen sus propios elementos reguladores, como también en regiones intrónicas, que en este caso se co-transcriben de forma independiente o dependiente del huésped y se escinden mediante eventos

de *splicing* alternativo (Lynam-Lennon, Maher et al. 2009); (Monteys, Spengler et al. 2010). Es ampliamente aceptado que los miRs son moléculas centrales en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, desempeñando su función fundamentalmente como represores de la expresión génica (Liu, Zheng et al. 2011). Con algunas pocas excepciones, los miRs regulan la expresión génica mediante la interacción imperfecta con secuencias localizadas en la región 3'UTR de ARNm específicos, produciendo la inhibición de la traducción o la desestabilización del ARNm (Costa and Pedroso de Lima 2013). Sin embargo, varios estudios muestran evidencias de que la región codificante e incluso la 5'UTR del ARNm puede ser reconocida y, por lo tanto, también puedan estar involucrados en el mecanismo de regulación por miRs. Por otro parte, se ha visto que los miR pueden también activar la expresión génica en vez de reprimirla. Específicamente, se ha visto que varios miRs se encuentran sobre-expresados en el núcleo y que activan la transcripción mediante su interacción con la región promotora del gen blanco (Khanmi, Ignacimuthu et al. 2015).

Diversos estudios indican que la represión del inicio de la traducción por los miRs se produce por la interferencia con componentes claves de la maquinaria de iniciación, involucrados en el reconocimiento de la caperuza 5' o la proteína de unión a poli-A (PABP) y el reclutamiento de la subunidad menor del ribosoma, obstaculizando así la asociación entre las subunidades mayor y menor del ribosoma y evitando, de este modo, la formación del complejo ribosomal activo. Adicionalmente, se ha visto que los miRs pueden inhibir la traducción en pasos posteriores a la iniciación, por ejemplo provocando el desensamblaje del ribosoma durante la elongación. Por otro lado, se ha visto que el decaimiento de ARNms específicos mediado por miRs se produce por el reclutamiento de la maquinaria de decaimiento, llevando a la deadenilación y decapping, para luego ser degradado por la exonucleasa Xrn1 (Costa and Pedroso de Lima 2013).

Desde la descripción del primer miR en 1993 en *C. elegans* (Lee, Feinbaum et al. 1993), se han identificado aproximadamente 1.000 miRs en el humano, encontrándose entre 500 a más de 10.000 copias de un miR específico por célula (Ragan, Zuker et al. 2011); (Pritchard, Cheng et al. 2012). Actualmente, se cuenta con 28.645 entradas de

precursores de miRs y más de 35.828 miRs maduros en 223 especies en el repositorio de secuencias Mirbase (<http://www.mirbase.org/>) y se ha estimado que el 60% de los genes humanos se encuentran bajo la regulación de los miRs (Friedman, Farh et al. 2009).

### *Biogénesis de miRs*

A pesar de que el proceso individual en cada animal puede diferir en algunos detalles específicos, el proceso básico es compartido en animales, plantas y hongos, e incluye múltiples pasos que inician en el núcleo y se completan en el citoplasma (**Figura 4**).

Los genes de los miRs son generalmente transcritos por la ARN polimerasa II para dar lugar a un transcrito primario (pri- miRNAs) que presenta una estructura de tallo-horquilla. Luego, los pri-miRNAs son clivados por la ribonucleasa Drosha, que forma un complejo con la proteína DGCR8, para dar lugar al precursor del miARN (pre-miRNAs) de 60 nucleótidos aproximadamente con estructura de horquilla. Estos son luego exportados al citoplasma por la Exportina XPO5, para ser luego procesados por Dicer, generando miARNs dúplex de aproximadamente 21 – 25 nucleótidos que consisten en una hebra guía (referida como miARN) y la hebra pasajera (referida como miARN\*). Luego, una helicasa abre el dúplex de ARN y solamente una de las hebras es cargada en un complejo proteico, ahora denominado miR-RISC, el cual es el responsable de la parte efectora del silenciamiento y está conformado por una proteína de la familia Argonata. Este complejo regula la expresión de sus genes blanco mediante represión traduccional o degradación, valiéndose de una de las hebras del miARN como guía y dependiendo del grado de complementariedad entre ellas (Ohtsuka, Ling et al. 2015).

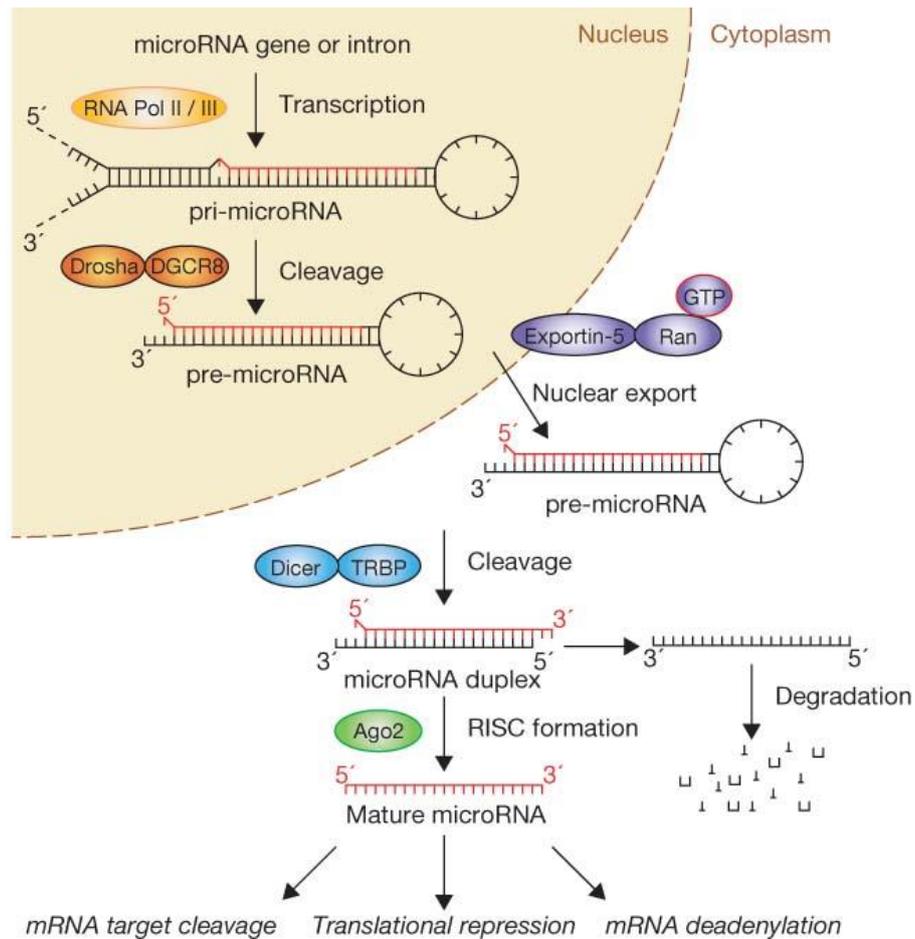


Figura 4. Esquema de la biogénesis de los miRs. Extraído de Winter, J., S. Jung, et al. 2009.

Estudios funcionales *in vitro* e *in silico*, muestran que los nucleótidos 2-8 de la región 5' del miR (región llamada semilla, en inglés *seed*), son determinantes para el reconocimiento del ARNm. Sin embargo, recientemente, se ha visto que el apareamiento insuficiente con esta región puede ser compensada por una alta complementariedad entre la región 3'UTR del miR y el ARNm blanco. (Costa and Pedroso de Lima 2013). El apareamiento imperfecto y la secuencia semilla de 6-8 nucleótidos relativamente corta permite una multitud de potenciales ARNm blancos por cada miR. Adicionalmente, un único ARNm puede tener múltiples sitios blanco para múltiples miRs, creando una red molecular redundante para el control de la expresión génica (Hayes, Peruzzi et al. 2014).

## *miRs en cáncer*

Los miRs presentan extensas funciones en la biología normal de la célula, participando en múltiples procesos como la proliferación celular, diferenciación, respuesta a estrés, apoptosis, inmunidad, entre otros. Por lo tanto, su desregulación genera eventos patológicos complejos, entre ellos el cáncer (Acunzo, Romano et al. 2015). La asociación de los miRs en cáncer fue reportado por primera vez en 2002, cuando se identificó un clúster de dos miRs: miR-15 y -16, en la región cromosómica 13q14.3, una región que se encuentra frecuentemente deletada en la leucemia linfocítica crónica (CLL) (Calin, Dumitru et al. 2002). Desde ese entonces, se han documentado miRs que presentan roles en todas las firmas moleculares del cáncer definidas por Hanahan and Weinberg en 2011, por lo que están implicados en cada etapa del manejo clínico de esta enfermedad (Hayes, Peruzzi et al. 2014). Al igual que los genes asociados al cáncer, los miRs pueden clasificarse según si funcionan como oncogenes o genes supresores de tumores (**Figura 5**). Un miR actúa como supresor tumoral cuando su expresión disminuida o pérdida de función contribuye al desarrollo del fenotipo tumoral. Esta desregulación puede ser resultado de una delección cromosómica o un defecto en algún paso de la biogénesis de dicho miR, que conlleva el aumento de la expresión de la proteína blanco u oncoproteína (**Figura 5-B**). Un miR actúa como oncogén (oncomir) cuando su expresión aumentada, o ganancia de función, contribuye al desarrollo del fenotipo maligno. Este resultado puede ser producto, entre otras cosas, de la amplificación del gen que codifica dicho miR o la activación constitutiva de su promotor, que lleva a la disminución de la expresión de su proteína blanco (**Figura 5-C**) (Costa and Pedroso de Lima 2013).

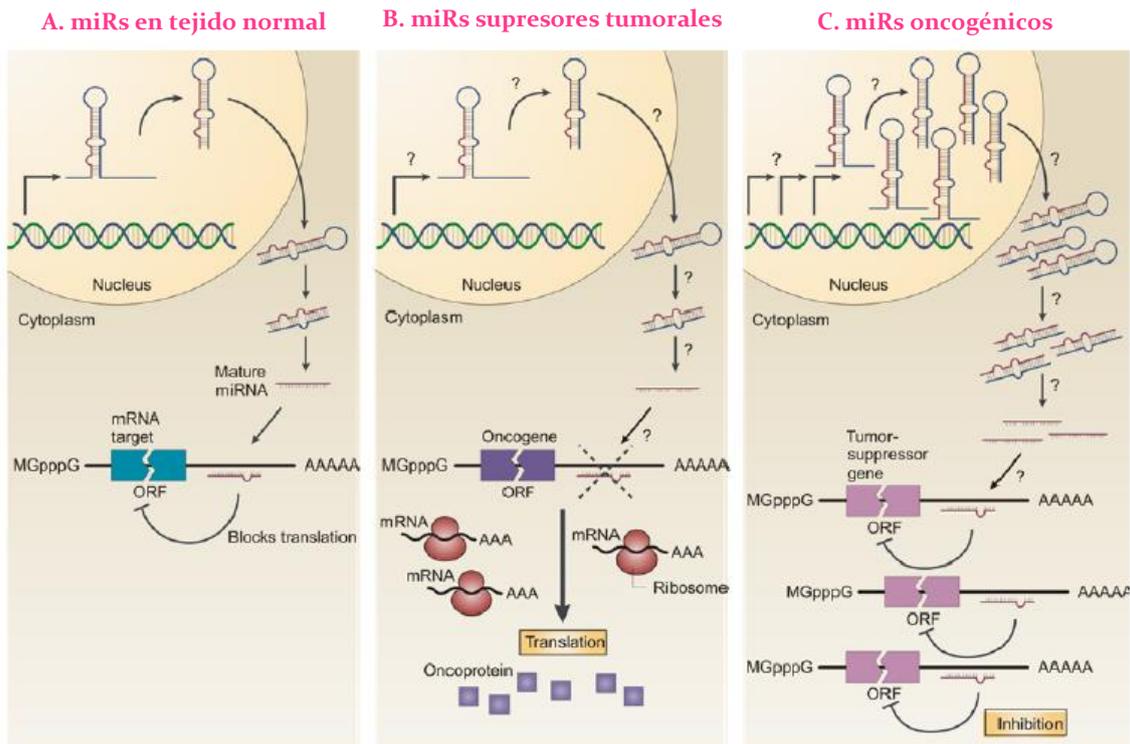


Figura 5. Función de los miRs como supresores tumorales y oncogenes. Extraído de Costa y Pedroso de Lima 2013.

Actualmente, se han reportado una gran cantidad de estudios donde identifican perfiles únicos de expresión de miRs en diferentes tipos de cáncer, así como en diferentes estadios de la enfermedad (Volinia, Calin et al. 2006, Porkka, Pfeiffer et al. 2007, Lawrie, Gal et al. 2008, Lynam-Lennon, Maher et al. 2009). Se ha visto que las firmas moleculares de las células del tumor, de células tumorales circulantes, como también del suero y de la orina, presentan un potencial uso clínico en **diagnóstico, pronóstico, predicción y terapia** del cáncer. Debido a que la expresión de miRs a menudo refleja el origen del tumor, y que se ha correlacionado con el desarrollo y progresión de diversos tipos de cánceres, los miRs resultan prometedores biomarcadores de diagnóstico. Adicionalmente, los miRs presentan mayor utilidad que los ARNm como indicadores de pronóstico, debido a su estabilidad dentro de las muestras clínicas, así porque su expresión parece reflejar con precisión la evolución de las células tumorales. En este sentido, se han propuesto varios perfiles de expresión para diferentes tipos y estadios de cánceres y su uso está siendo investigado en ensayos clínicos (Hayes, Peruzzi et al. 2014). Por otro lado, los miRs abren la posibilidad de la oncología individualizada, con un enfoque terapéutico adaptado al

paciente guiado por estos perfiles moleculares. Algunos de los miRs con potenciales usos en terapéutica ya han sido validados en modelos animales e incluso algunos se encuentran en estudios preclínicos en humanos, como miR-34 y miR-7 (Gregory, Bracken et al. 2008, Trang, Medina et al. 2010). Las estrategias terapéuticas que involucran a estos se basan en la re-introducción de miRs supresores tumorales que se encuentran disminuidos y/o la inhibición de miRs oncogénicos que se encuentran sobre-expresados (Bader, Brown et al. 2010). Revisado por Khanmi, Ignacimuthu et al. 2015.

### *miRs en PCa*

Específicamente en PCa, se han reportado varios perfiles de expresión de miRs y todos coinciden en una extensa desregulación global de los mismos. Se ha demostrado que las firmas de miRs en el PCa pueden correlacionarse con la clínica, utilizándolos como indicadores de diagnóstico, pronóstico y terapéutica. Específicamente, hasta la fecha, no ha sido posible encontrar una firma distintiva de miRs capaz de distinguir entre los pacientes sanos y enfermos pero se han obtenido resultados alentadores. Por otro lado, la predicción del pronóstico del paciente y su seguimiento siguen representando los principales retos del manejo clínico del PCa. Los estudios centrados en los perfiles de expresión de miRs al respecto han aumentado notablemente, pero los resultados han sido poco concordantes, debido probablemente a diferencias metodológicas, a la baja cobertura de alguno de los análisis, así como también a los tratamientos subestimados de los pacientes y la presencia de células contaminantes. Además, de la ausencia de indicadores de diagnóstico y pronóstico fiables, la gestión del PCa también se ve afectada por la falta de herramientas que guíen la asignación del tratamiento como también para evaluar su respuesta. Hasta la fecha, diversos estudios muestran el papel de los miRs como blancos directos para la terapia del PCa. Sin embargo, la mayoría de los estudios se basan en el análisis de líneas celulares de PCa que presentan poca relevancia clínica. Los miRs asociados al diagnóstico, pronóstico y tratamiento del PCa se listan por separado en la revisión reciente de Cannistraci (Cannistraci, Di Pace et al. 2014).

## Familia miR-183

Hsa-miR-183 es miembro de un clúster que incluye a miR-183/96/182, que se sintetizan coordinadamente como un transcrito policistrónico único en el cromosoma 7q32.2., que fueron identificados por el grupo de Xu et. al. como un clúster específico de órganos sensoriales, específicamente en fotorreceptores, células bipolares retinales y amacrinas. Según los autores, estos miRs estarían participando en el mantenimiento del fenotipo maduro de la retina y su función. En el mismo trabajo, los autores muestran que los miRs-183, -96 y -182 maduros presentan secuencias semillas casi idénticas (Figura 6) con diferencias en nucleótidos específicos. Esto conlleva a que estos miRs puedan regular varios genes en común y por lo tanto estén involucrados en procesos celulares comunes. La homología de secuencia que presentan sugiere un origen a partir de duplicaciones de un ancestro en común, y la conservada organización genómica que se encuentra en diversos organismos indica una clara ventaja evolutiva de la presencia del mismo.

```
miR-183  uauggcacugguagaauucacu
miR-96   uuuggcacuagcacauuuuugcu
miR-182  uuuggcaaugguagaacucacacu
```

**Figura 6.** Secuencias de los miRs hsa-miR-183, hsa-miR-96 y hsa-miR-182 pertenecientes al clúster miR-183. Imagen tomada de Mihelich, Khramtsova et al. 2011.

De aquí en adelante, cuando se nombre miR-183 se hará referencia a hsa-miR-183-5p para hacer la lectura más fluida.

### *Funciones de la familia miR-183*

Las funciones de los miembros de la familia miR-183 en células normales están fueron inicialmente descritas en neuronas sensoriales ciliadas, por lo que se sugiere que el clúster es parte de un mecanismo evolutivo establecido para el mantenimiento y longevidad de las mismas (Weeraratne, Amani et al. 2012). Se ha observado la sobreexpresión de los mismos en numerosas patologías. Entre ellas encontramos las enfermedades autoinmunes, como en Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) (Dai, Zhang

et al. 2010, Dai, McReynolds et al. 2013, Yu, Liu et al. 2014); en trastornos neurodegenerativos (Kye, Niederst et al. 2014, Ubhi, Rockenstein et al. 2014); en trastornos psiquiátricos, como desorden hiperactivo y déficit de atención (ADHD) (Sanchez-Mora, Ramos-Quiroga et al. 2013) y depresión (Yu, Liu et al. 2014); como también en diversos tipos de cáncer, tales como de endometrio y de colon (Sarver, French et al. 2009, Myatt, Wang et al. 2010), en gliomas (Jiang, Mao et al. 2010, Song, Liu et al. 2012, Tanaka, Sasayama et al. 2013, Yan, Wang et al. 2014) y meduloblastomas (Gokhale, Kunder et al. 2010, Weeraratne, Amani et al. 2012), en cáncer colorectal y carcinoma hepatocelular (HCC) (Sarver, French et al. 2009, Wang, Li et al. 2012, Xu, Qian et al. 2012, Zhou, Zhang et al. 2014), como también en cáncer de ovario, mama y próstata (Guttilla and White 2009, Lin, Dai et al. 2010, Lowery, Miller et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Mihelich, Khramtsova et al. 2011, Hirata, Ueno et al. 2013, Ueno, Hirata et al. 2013). Podría especularse que la sobre-expresión del clúster favorece al fenotipo tumoral otorgando a la célula una ventaja en la supervivencia (Weeraratne, Amani et al. 2012). Sin embargo, algunos estudios muestran una actividad supresora tumoral del clúster; por ejemplo, en cáncer de pulmón y mama, donde inhibe la migración e invasión celular (Lowery, Miller et al. 2010, Myatt, Wang et al. 2010), lo que sugiere una función contexto y/o tipo celular específico del mismo en la carcinogénesis.

Existe extensa literatura acerca de la regulación transcripcional conjunta de los miembros del clúster por factores de transcripción desregulados en cáncer. Así, se han reportado estudios a favor de una regulación de miR-183 por p53 (Tarasov, Jung et al. 2007). De la misma manera, se reportó la unión del supresor de tumor PDRM5, a regiones promotoras del clúster, sugiriendo su posible silenciamiento vía los remodeladores de cromatina HDAC1 y G9a (Sarver, French et al. 2009). Asimismo, en el trabajo de Lodrini (Lodrini, Oehme et al. 2013) se reporta la unión de MYCN (proto-oncogén) al promotor de hsa-miR-183 y el reclutamiento de co-represores como HDAC2, generando un estado reprimido de la cromatina. De la misma manera, varios factores de transcripción con roles establecidos en la embriogénesis y la carcinogénesis, como  $\beta$ -catenina / TCF4 / LEF y TGF $\beta$  se ha demostrado que se unen al promotor del clúster (Dambal, Shah et al. 2015).

Otro aspecto relevante sobre el clúster de miR-183 es que se ha descrito a miR-96 como potencial biomarcador junto con miR-183 en orina en carcinoma urotelial, observando una correlación con el estadio y el grado patológico (Yamada, Enokida et al. 2011). También se ha propuesto a miR-183 como biomarcador en carcinoma hepatocelular (Liu, Yao et al. 2012). Por otro lado, se ha reportado la sobre-expresión de miR-182 en cáncer de vejiga y su rol potencial como biomarcador en orina, así como su reciente asociación con la progresión del cáncer de próstata (Wang, Mao et al. 2008, Guttilla and White 2009, Sarver, French et al. 2009, Hanke, Hoefig et al. 2010, Myatt, Wang et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Hirata, Ueno et al. 2013, Tsuchiyama, Ito et al. 2013, Zhang, Sun et al. 2013). Sin embargo, en el trabajo de Stephan, Jung en 2015 (Stephan, Jung et al. 2015) se muestra que los niveles de miR-183 y miR-205 en orina no correlacionan con la clínica del PCa, no pudiendo discriminar entre pacientes con y sin la enfermedad, así como también con el grado de Gleason y el PSA sérico, a pesar de su extensa desregulación en el tejido tumoral. De este modo, los autores plantean dudas sobre la capacidad de estos miRs presentes en orina de reemplazar o mejorar los biomarcadores predictivos actualmente utilizados.

Es interesante mencionar que, recientemente, miR-183 y miR-96 han sido utilizados para desarrollar lo que se llamó *the miRNA index quote (miQ)*. Este índice se basa en la relación de 4 miRs discriminatorios, entre los que se encuentran miR-96 y miR-183,  $((\text{miR-96-5p} \times \text{miR-183-5p}) / (\text{miR-145-5p} \times \text{miR-221-5p}))$ , el cual se ha visto que tiene un fuerte potencial de diagnóstico y pronóstico de los pacientes con cáncer de próstata, incluso mejor que el PSA. (Larne, Martens-Uzunova et al. 2013).

### *Blancos validados de hsa-miR-183-5p*

Hasta el momento se han comunicado varios genes blancos directos de miR-183 en cáncer de endometrio, mama y colon, como los genes supresores de tumor *FOXO1* y *EGR1*, que regulan genes involucrados en la apoptosis, el ciclo celular y en la diferenciación celular, respectivamente (Myatt, Wang et al. 2010). Asimismo, se ha demostrado la regulación de miR-183 sobre *PDCD4* en carcinoma hepático (Li, Fu et al. 2010), en carcinoma esofágico escamoso (Ren, Chen et al. 2014), en carcinoma papilar

de tiroides (Wei, Song et al. 2015), en la línea celular SW1990 de cáncer de páncreas (Lu, Zheng et al. 2015) y en carcinoma de células escamosas del esófago (Ren, Chen et al. 2014); *EZRIN* en cáncer de pulmón (Wang, Mao et al. 2008), de mama y osteosarcoma (Lowery, Miller et al. 2010, Zhu, Feng et al. 2012); *IDH2* en glioma (Tanaka, Sasayama et al. 2013); *Bmi1* en páncreas (Wellner, Schubert et al. 2009); *TIAM1* en ovario y cáncer de colon (Xu, Rajagopal et al. 2010, Li, Liang et al. 2012); y *LPR6* en retinoblastoma (Wang, Wang et al. 2014). Estudios realizados en situaciones fisiológicas normales muestran que miR-183 puede regular la dinámica de la actina modulando directamente genes como *ITGB1*, *kinesina 2A* (Xu, Witmer et al. 2007, Li, Luna et al. 2010, Chen, Gu et al. 2015) y la vía de señalización de insulina, las integrinas, la de IGF-1, la remodelación de la cromatina (Xu and Wong 2008) y la adipogénesis (Chen, Xiang et al. 2014). En la próstata, se ha mostrado que el miR regula a genes vinculados a la homeostasis del Zn (Mihelich, Khramtsova et al. 2011) y en cáncer a *Dkk3* y *SMAD4* (Ueno, Hirata et al. 2013).

### *Blancos compartidos del clúster hsa-miR-183-96-182*

Debido a la alta homología de secuencia, los miRs-183, -96 y -182 comparten la regulación de varios genes. Sin embargo, existen pequeñas diferencias en sus secuencias que quizá han evolucionado con el tiempo para permitir la regulación de ARNm específicos. En la **Figura 7** se muestra un diagrama de Venn que detalla los ARNm de genes blanco directos validados hasta el momento por ensayos de genes reporteros, de los miembros de la familia miR-183. El análisis de enriquecimiento de vías específicas a partir de los genes blanco validados mostró que la familia de miR-183 podría estar involucrada en procesos como la apoptosis, la reparación del ADN, la regulación de la respuesta inmune y el metabolismo energético (Dambal, Shah et al. 2015), procesos que se encuentran directamente relacionados al proceso de carcinogénesis.

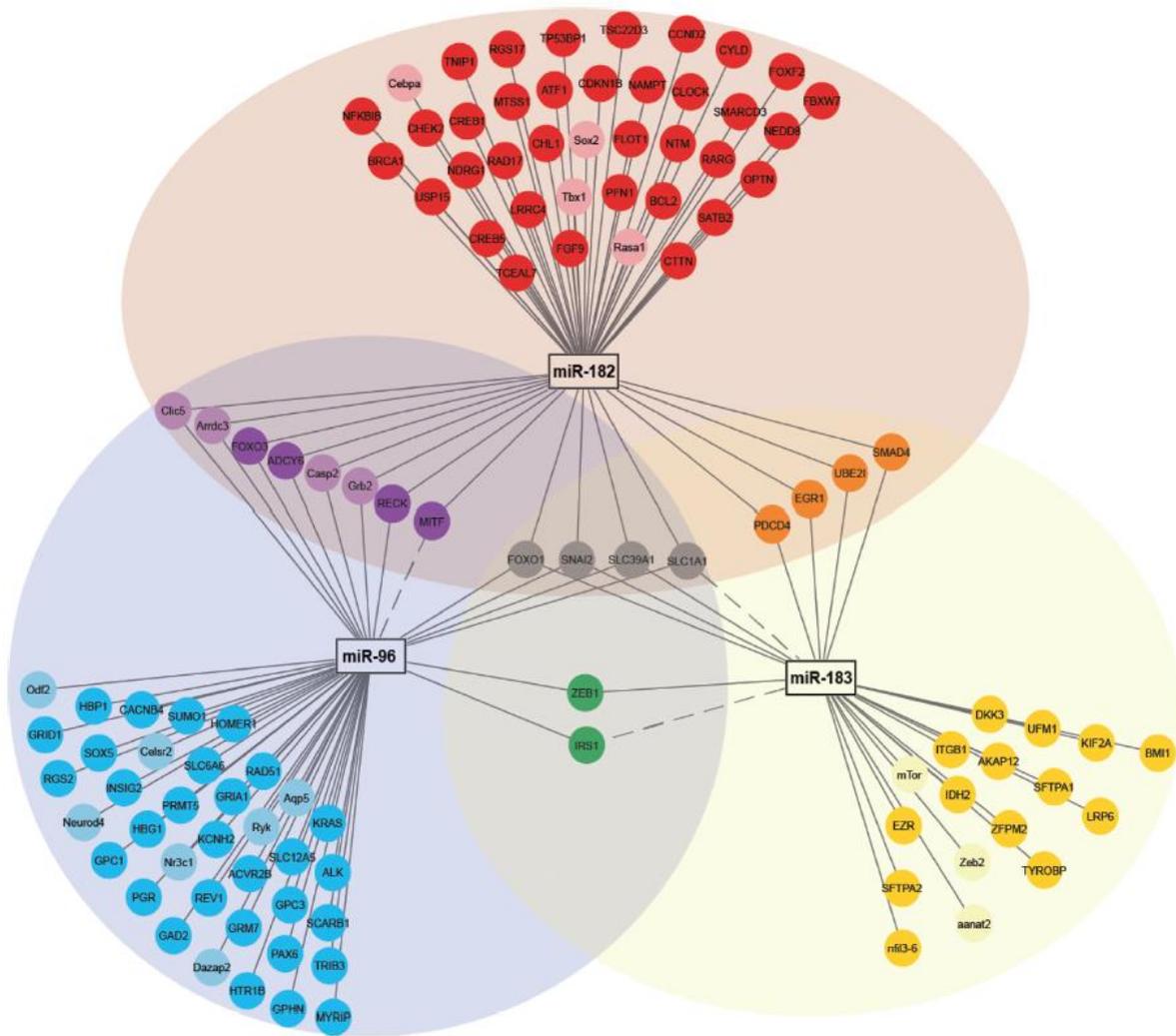
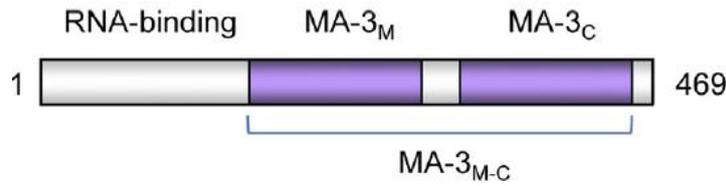


Figura 7. Diagrama de Venn representando la red de regulación de los miR-183, -182 y -96. Se observan que varios genes blanco son compartidos entre los miembros del clúster mientras que otros son únicos de cada uno. Extraído de Dumbal, Shah et. al. 2015.

## PROGRAMMED CELL DEATH 4

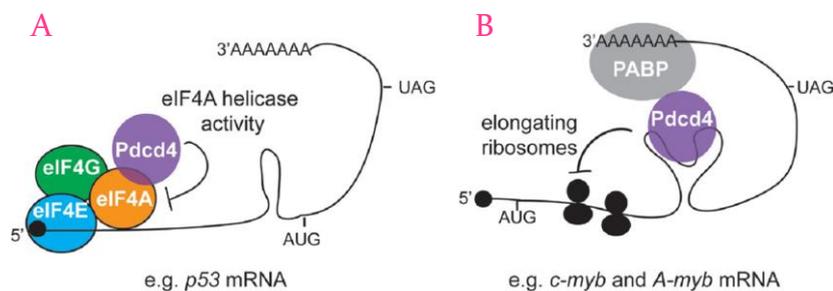
*Programmed Cell Death 4 (PDCD4)* (Gene ID: 27250) es un conocido gen supresor de tumor que inhibe la traducción de ARNm específicos. Consiste en una proteína de 469 aminoácidos que comprende tres regiones funcionales (Figura 8): un dominio N-terminal no estructurado que presenta actividad de unión al ARN y dos dominios de tipo MA-3 con estructura de  $\alpha$ -hélice, involucrado en interacciones proteína-proteína (Waters, Strong et al. 2011). Adicionalmente, existen evidencias de que presenta dos señales de localización nuclear (Shibahara, Asano et al. 1995, Lankat-Buttgereit and Goke 2009).



**Figura 8.** Esquema representativo de las regiones funcionales de pcd4. Extraído de Waters, Strong et al. 2011.

### Mecanismo de represión mediado por PDCD4

El mecanismo de represión de la traducción primeramente descrito fue mediante su asociación al factor de iniciación de la traducción eucariota 4A (eIF4A), que es una helicasa requerida para desenrollar el extremo 5' de los ARNm y permitir su lectura por el ribosoma durante la traducción CAP-dependiente. Por lo tanto, se cree que PDCD4 inhibe la traducción de aquellos ARNms que presentan 5'UTRs estructuralmente estables. Sin embargo, se cree que la regulación de la traducción por esta proteína es aún más compleja, ya que se ha reportado que también interacciona directamente con eIF4G (Kang, Ahn et al. 2002, Bohm, Sawicka et al. 2003). Estudios recientes indican que su mecanismo de inhibición traduccional podría también ser independiente de eIF4A, a través del reconocimiento directo de un motivo conformacional en la región codificante del ARNm durante el proceso de elongación de la traducción (Biyanee, Singh et al. 2015). En la **Figura 9** se esquematizan los mecanismos de acción de inhibición de la traducción propuestos para PDCD4.



**Figura 9.** Rol de Pdc4 en la inhibición de la traducción. Se proponen dos modelos de acción: A) mecanismo eIF4A dependiente y B) mecanismo eIF4A independiente. Extraído de Biyanee, Singh et al. 2015.

### *Localización subcelular de PDCD4*

Existen datos contradictorios en relación a la distribución subcelular de pdc4. Hay reportes que apuntan a una localización nuclear en tejido normal y una localización citoplasmática en tejido carcinógeno, mientras que otros resultados muestran la distribución opuesta. Estas discrepancias podrían deberse a que Pdc4 se transloca entre el núcleo y el citoplasma (Bohm, Sawicka et al. 2003). Por otra parte, estos resultados podrían explicarse por una función específica del tipo celular (Lankat-Buttgereit and Goke 2009).

### *Expresión y regulación de PDCD4*

Pdc4 se expresa de manera ubicua en tejido normal y parece estar regulado por múltiples mecanismos y a diferentes niveles. Su expresión se induce en respuesta a factores pro-apoptóticos, tales como ionomicina, PMA y dexametasona, pero no frente a ara-C (del inglés, *arabinosyl cytosine*), radiación UV o inhibidores de la topoisomerasa. De manera similar, los niveles de PDCD4 aumentan en presencia de la interleuquina 12 (IL-12) pero disminuyen en presencia de la interleuquina 2 (IL-2) y la interleuquina 15 (IL-15). Se ha visto que su expresión se encuentra disminuida e inclusive una pérdida de función total en una variedad de tumores, tales como de glía, pulmón, lengua, piel, mama, así como en tumores derivados del sistema renal, entre otros (Lankat-Buttgereit and Goke 2009). Adicionalmente, se ha visto que TGF- $\beta$  aumenta la expresión de PDCD4 promoviendo la apoptosis en líneas celulares de carcinoma hepatocelular (Zhang, Ozaki et al. 2006). Por otro lado, varios reportes muestran la regulación de PDCD4 por miR-21, el cual se destaca por ser el más comúnmente desregulado tanto en tumores sólidos como hematológicos, y por estar asociado a la quimioresistencia (Wang, Li et al. 2014). De hecho, se ha visto que la expresión de PDCD4 se induce en algunas células tumorales en respuesta a drogas anticancerígenas, como inhibidores de COX-2 (del inglés, *Cyclo-oxygenase-2*) y agonistas de RAR (del inglés, *Retinoic Acid Receptor*), sugiriendo un potencial uso como blanco terapéutico. Recientemente, se ha demostrado la regulación de esta proteína por los miembros de la familia de proteínas de unión a elementos ricos en AU: HuR (del inglés, *human antigen R*) y TIA1 (del inglés, *T-cell intracellular antigen 1*), que juegan un rol

importante en la regulación post-transcripcional de numerosos ARNms en respuesta al estrés celular (Wigington, Jung et al. 2015). Todos estos reportes indican que PDCD4 funciona como un supresor tumoral con un rol muy importante en la biología celular y, por lo tanto, en el desarrollo tumoral.

Adicionalmente, la secuencia de aminoácidos comprende múltiples sitios de fosforilación que son blanco de la Akt/protein kinase B. Se ha visto que dicha fosforilación induce dos efectos: la translocación nuclear de pdc4 y la disminución de la habilidad de inhibir la transcripción mediada por AP-1 (del inglés, *Activator Protein 1*). Por otro lado, se ha reportado que PDCD4 también es blanco de fosforilación por la proteína quinasa S6K1, marcándolo para su posterior degradación por la ubiquitin-ligasa SCF $\beta$ TrCP (Dorrello, Peschiaroli et al. 2006). Este mecanismo posiblemente permita la síntesis de proteínas y el crecimiento celular en respuesta a mitógenos (Lankat-Buttgereit and Goke 2009).

### *Funciones de PDCD4*

Numerosos trabajos muestran una función supresora tumoral de PDCD4 mediante la regulación de la expresión de múltiples proteínas involucradas en la progresión tumoral, ciclo celular y diferenciación, tanto a nivel transcripcional como traduccional. En la **Figura 10** se resumen las funciones de PDCD4 conocidas hasta el año 2009.

A modo de ejemplo, PDCD4 regula negativamente la proteína CA II (del inglés, *Carbonic Anhydrase type II*) a nivel traduccional, en la línea celular HEK-293. Esto podría contribuir a su función supresora tumoral ya que las células tumorales necesitan un buen flujo de bicarbonato para su crecimiento. Por otro lado, se demostró en muestras de cáncer colorectal que PDCD4 regula negativamente la expresión de uPAR (del inglés, *urokinase receptor*), el cual media la degradación de los componentes de la matriz extracelular, promoviendo la invasión celular y metástasis. Adicionalmente, se reportó que PDCD4 influencia la progresión del ciclo celular mediante la inducción de p21Waf1/Cip1, que, a su vez, disminuye CDK4/6 y CDK2, promoviendo la unión de la proteína retinoblastoma a E2F-DP y reprimiendo el complejo promotor CDK1/cdc2, resultando en una reducción de la proliferación

celular. Sin embargo, se han obtenido resultados contradictorios en diferentes tipos de líneas celulares tumorales, consistente con la función tipo celular específica de PDCD4 (Lankat-Buttgereit and Goke 2009).

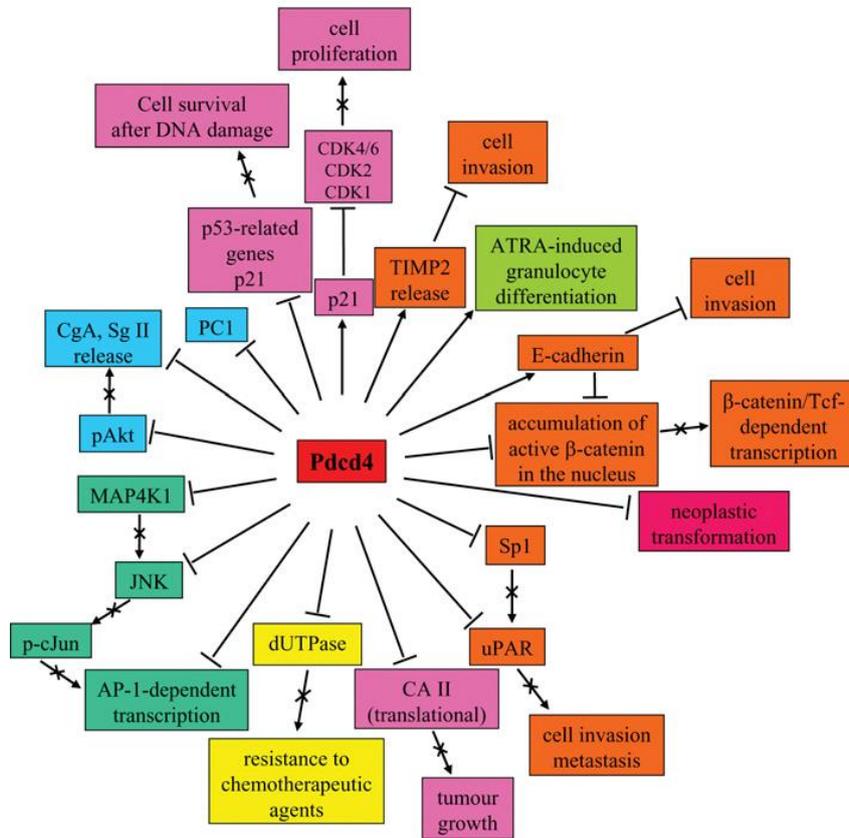


Figura 10. Visión general de las funciones conocidas de Pdc4 hasta el 2009. Extraído de Lankat-Buttgereit y Goke 2009.

Posterior a la revisión de Lankat-Buttgereit y Goke, se han reportado nuevas funciones de PDCD4. Entre ellas encontramos el efecto inhibitorio de la transcripción mediado por  $\text{NF-}\kappa\text{-}\beta$  mediante su interacción directa con p65, inhibiendo su localización nuclear en líneas celulares de glioblastoma. Es interesante notar que la inhibición de la transcripción dependiente de p65 no ocurre por la función supresora de la traducción de PDCD4, sino que se está mediada por una interacción proteína-proteína (Hwang, Baker et al. 2014). Adicionalmente, se demostró la interacción de PDCD4 con el factor de transcripción Twist1, conduciendo a una reducción en el crecimiento celular, a través de la regulación negativa del gen YB-1 (del inglés, *Y-box binding protein-1*) (Shiota, Izumi et al. 2009).

Existen varios estudios en modelos animales que destacan la importancia de PDCD4 como supresor de tumor. Ratones deficientes para PDCD4 desarrollaron linfomas de manera espontánea, posiblemente causado por un aumento de la secreción de IL-4 y/o IL-10. Por otro lado, ratones transgénicos que sobre-expresaban Pdc4 en la epidermis mostraron una reducción significativa en la conversión de papiloma en carcinoma y en la incidencia de carcinoma luego de un protocolo de carcinogénesis, en comparación con los ratones control. Adicionalmente, en queratinocitos primarios de estos ratones se observó una inhibición de la activación de AP-1 inducida por PMA, así como niveles reducidos de ornitina descarboxilasa y CDK4. Por otro lado, en ratones nulos para K-ras y ratones reporteros para AP-1-luciferasa, un suministro de PDCD4 en aerosol condujo a la inhibición de la proliferación celular, angiogénesis y a la actividad AP-1, y a facilitar la apoptosis de células de pulmón. Estos datos muestran que Pdc4 desempeña un papel muy importante en la carcinogénesis, posicionándolo como un fuerte candidato para futuros estudios.

# ANTECEDENTES

Nuestro grupo estudia la función de tres miRs en PCa: hsa-mir-301b, hsa-mir-183-5p y hsa-mir-886-3p; que fueron identificados en un cribado de expresión diferencial de miRs modulados durante la diferenciación de células madre PCa, utilizando microarreglos y validación por qRT-PCR. En el marco de la tesis de maestría de Carolina Ottati, se profundizó en la función de hsa-miR-183-5p en el cáncer de próstata (Ottati 2014) A continuación, se resumirán los resultados obtenidos por nuestro grupo y que constituyen la base de este trabajo.

Específicamente, se encontró que hsa-miR-183-5p está significativamente sobreexpresado en muestras clínicas de tumores de próstata, relativo a las muestras de glándula prostática control (Figura 11-A). Por otro lado, los pacientes con sobreexpresión de hsa-mir-183-5p en tejido tumoral presentaron una tendencia al incremento del grado histopatológico de Gleason (Figura 11-B). Esto apoya la hipótesis de que este miR presenta un rol oncogénico en esta patología con real importancia en la clínica.

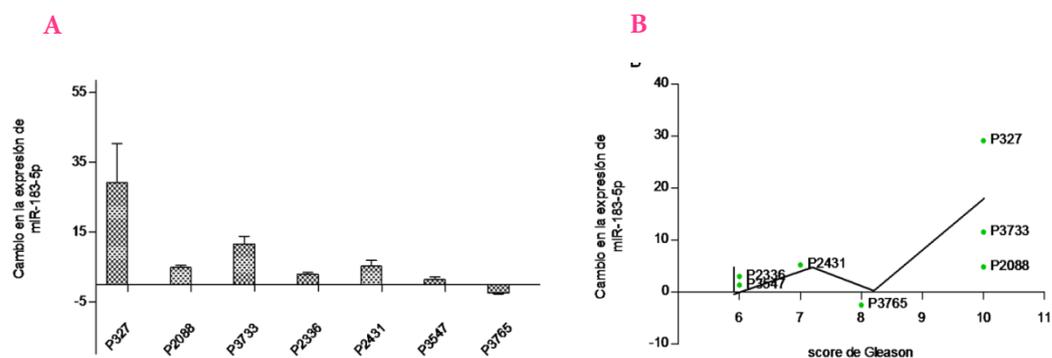
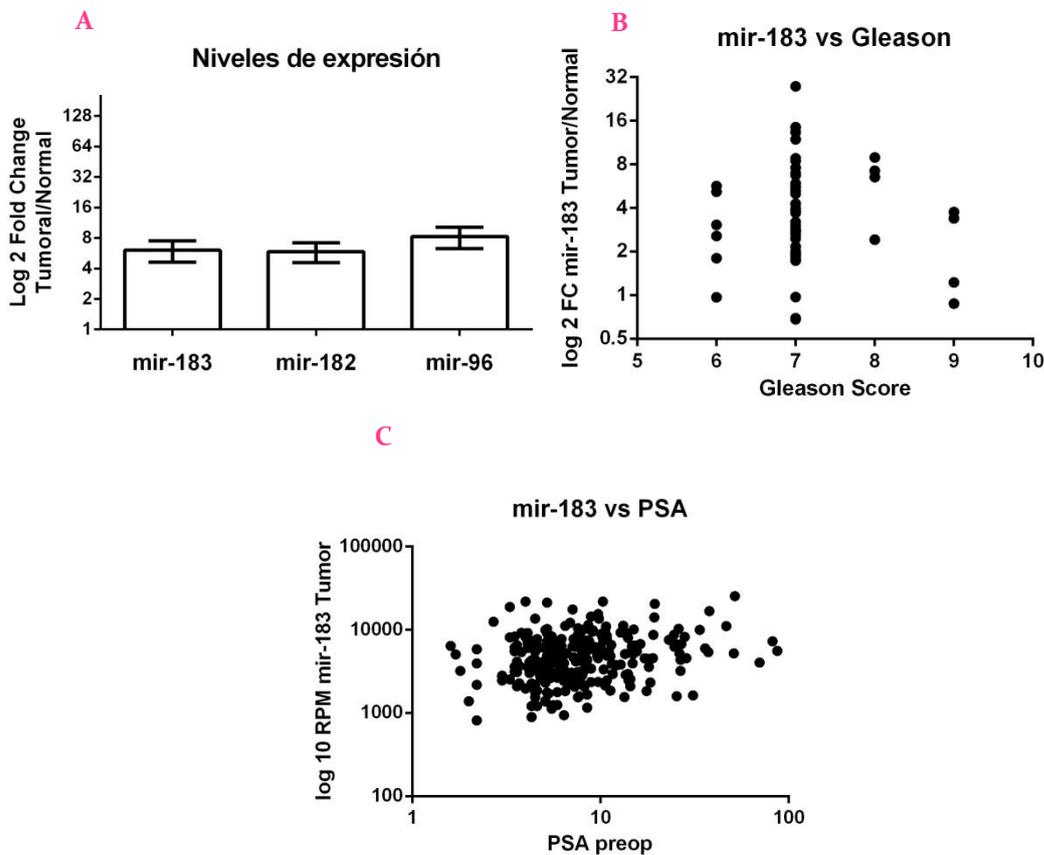


Figura 11. A) Niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en muestras clínicas de tumores de próstata, relativo a las muestras de glándula prostática control. B) Correlación entre nivel de hsa-miR-183-5p y Score de Gleason en muestras de tejido tumoral.

Adicionalmente, estudios realizados con los datos disponibles en la base de datos TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) de pacientes con adenocarcinoma de próstata, mostraron un aumento de la expresión de miR-183 en tejido tumoral respecto al tejido

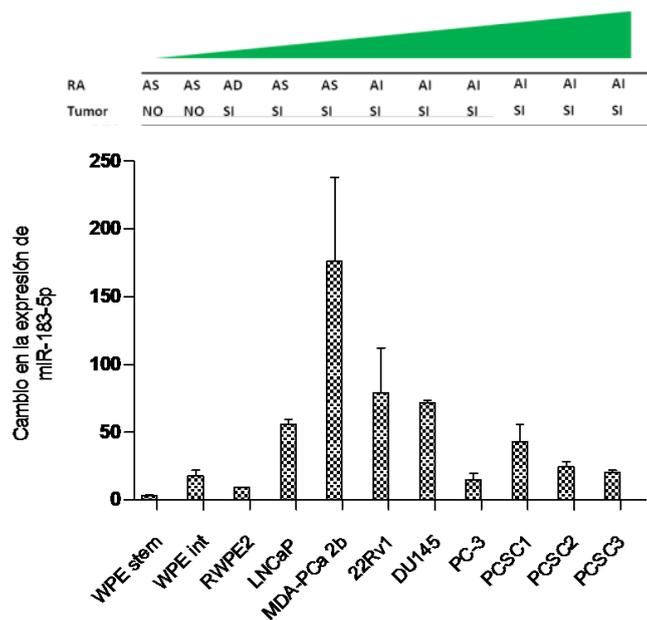
normal, igual que a los otros miembros del clúster (Figura 12-A). Por otro lado, dado que se constató que la distribución del grado de Gleason de las muestras está muy sesgada a Gleason 7, no se profundizó en el análisis, aunque se aprecia una tendencia al aumento entre 6-8 (Figura 12-B). Sin embargo, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el aumento de los niveles de miR-183 y el nivel PSA preoperatorio (Figura 12-C). Estos datos muestran que miR-183 posee relevancia clínica en el cáncer de próstata.



**Figura 12.** Expresión de miR-183 y variables clínicas en muestras de PCa de TCGA. A) cambio en los niveles de miR-183, -182 y -96 en tejido tumoral vs. normal para muestras pareadas de cada paciente, B) correlación entre el cambio en los niveles de miR-183 en tejido tumoral vs. normal para muestras pareadas de cada paciente y el grado de Gleason, y C) correlación entre los niveles de miR-183 en tumores y PSA preoperatorio en suero de pacientes con cáncer de próstata.

Por otro lado, se compararon los perfiles de expresión de miR-183 en líneas celulares de PCa dependientes, sensibles e independientes de andrógenos (LNCaP, RWPE-2, MDA PCa 2b, 22Rv1, DU145, PC-3), y líneas celulares normales de próstata (RWPE-1,

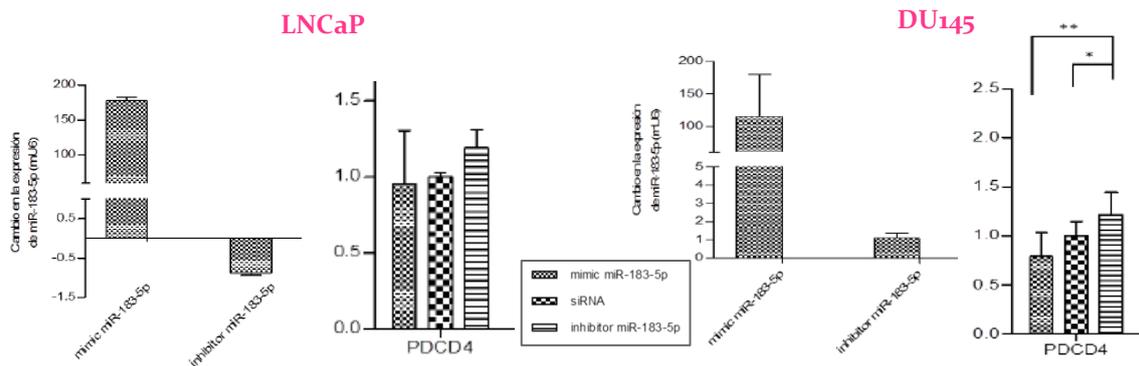
WPE-stem y WPE-int). También se analizó el perfil de expresión de miR-183 de tres líneas celulares primarias de pacientes terminales con PCa (PCSC1, PCSC2 y PCSC3), tumorigénicas e independientes de andrógenos. Los resultados obtenidos mostraron una tendencia en el aumento de la expresión de miR-183 en las líneas celulares de PCa, en comparación con la línea normal de próstata. Los niveles más altos (cambios de 20-100 veces) se ven en las líneas LNCaP, MDA-PCa 2b, 22Rv1, DU145 y las tres líneas primarias de pacientes terminales (Figura 13).



**Figura 13.** Perfiles de expresión de miR-183 en líneas celulares de PCa. RA: Respuesta a Andrógenos: AS, andrógeno sensible; AD, andrógeno dependiente; AI, andrógeno independiente; tumor, capacidad de la línea de generar un tumor mediante inoculación por vía subcutánea u ortópica en ratones nude. Las líneas celulares se ordenaron de manera creciente hacia la derecha con respecto al potencial tumorigénico.

La progresión de PCa está caracterizada por un cambio de estado andrógeno-dependiente (AD) al estado andrógeno independiente (AI), atravesando por un estado andrógeno sensible (AS), en el cual las células no requieren andrógenos para proliferar pero en su presencia lo hacen más rápidamente. El orden de forma creciente hacia la derecha de la tumorigenicidad de las líneas celulares coincide con el pasaje del estado AD al AS. Este resultado sugiere un perfil de expresión similar de miR-183 en líneas celulares tumorales y muestras clínicas, lo que valida el uso de líneas celulares como modelo en el estudio de la función oncogénica de este miR.

Con el objetivo de seleccionar un grupo reducido de genes blancos candidatos a ser regulados por miR-183, se realizaron una serie de estudios teóricos que incluyeron algoritmos de predicción de genes con sitios blancos para miR-183 y bases de datos de expresión génica de PCa. Además, se realizó la búsqueda de genes blancos a través de un análisis de expresión génica global luego de la transfección transitoria con mimmic e inhibidor de miR-183 en las líneas celulares LNCaP y DU145, de manera de validar empíricamente los genes seleccionados en base a predicciones y a la bibliografía, y posibilitando el descubrimiento de nuevos genes blancos. Esto permitió seleccionar un grupo de genes blanco candidatos de regulación por miR-183, entre los cuales se encuentra *PDCD4*. Se determinaron los cambios en los niveles de ARNm de los genes blancos candidatos a 24 hs de la sobre-expresión y el bloqueo de miR-183 mediante qRT-PCR. En la **Figura 14** se muestran los resultados para *PDCD4* en las líneas celulares LNCaP y DU145 (Ottati 2014).



**Figura 14.** Cuantificación de miR-183 y el ARNm de *PDCD4* luego de la transfección con mimmic e inhibidor del miR-183. Los niveles de ARNm fueron determinados mediante qRT-PCR a las 24 horas de la transfección de las líneas celulares LNCaP y DU145.

En la línea celular LNCaP no se observó una diferencia estadísticamente significativa en los cambios del ARNm de *PDCD4* cuando se sobre-expresan o inhibe el miR, con respecto a los valores de siRNA. Sin embargo, muestra un cambio en la dirección esperada por la hipótesis en los dos experimentos, es decir, un incremento y un decremento del ARNm cuando se incubaba con inhibidor y mimmic respectivamente. Por otro lado, en la línea celular DU145 la modulación parece estar incrementada, observándose diferencias muy significativas en los cambios del ARNm de *PDCD4*.

Si bien en ambas líneas se observan un comportamiento similar con respecto a la modulación de *PDCD4*, la magnitud y significación estadística de los cambios observados es diferente. Esto puede deberse a diferencias finas en la regulación de la expresión génica entre ambas líneas. Es interesante destacar también, que los cambios a nivel de ARNm observados en LNCaP muestran tendencias similares a los observados en DU145, lo que apoya la reproducibilidad del efecto. Adicionalmente, la mayoría de los cambios más significativos en la línea DU145 ocurren en respuesta al inhibidor. Sin duda los experimentos de sobre-expresión de miR-183 en líneas donde la expresión de este miR endógeno son bajas, como en el caso de la línea de próstata normal RWPE1, tienen una mayor significancia biológica que el realizarlos en líneas que ya presentan una sobre-expresión del mismo, debido a que en estos últimos el efecto del miR en estudio sobre el blanco podría estar ya saturado.

Cabe destacar que los miRs pueden regular de manera directa sus genes blanco dando lugar a la disminución de la estabilidad del ARNm como también disminuyendo su traducción, sin cambiar su estabilidad. Por lo tanto, es necesario evaluar los niveles de proteína, además del de ARNm, para verificar la regulación directa.

A partir de los antecedentes descritos, nos proponemos estudiar experimentalmente si existe una interacción directa y específica de hsa-miR-183-5p y *PDCD4*, como también evaluar los cambios en el nivel de la proteína en respuesta a una pérdida y ganancia de miR-183 en líneas celulares de cáncer de próstata.

# OBJETIVOS

---

## GENERAL

Investigar si el gen supresor de tumor PDCD4 se encuentra modulado directa y específicamente por hsa-mir-183-5p en líneas celulares de cáncer de próstata.

## ESPECÍFICOS

1. Estudiar si hsa-mir-183-5p interacciona directa y específicamente con la región 3'UTR del ARNm de pcd4.
2. Estudiar si hsa-mir-183-5p modula los niveles de la proteína PDCD4 producida endógenamente por las líneas celulares.

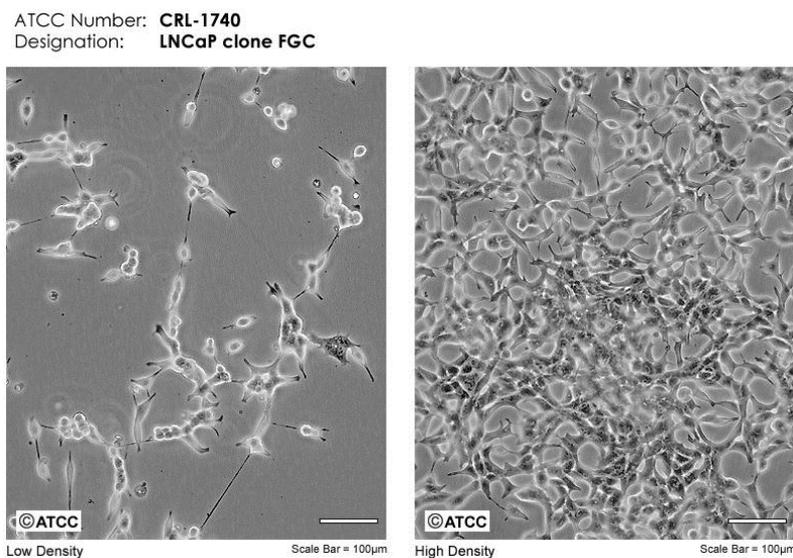
# MATERIALES Y MÉTODOS

## MATERIALES

### *Líneas Celulares*

#### *LNCaP*

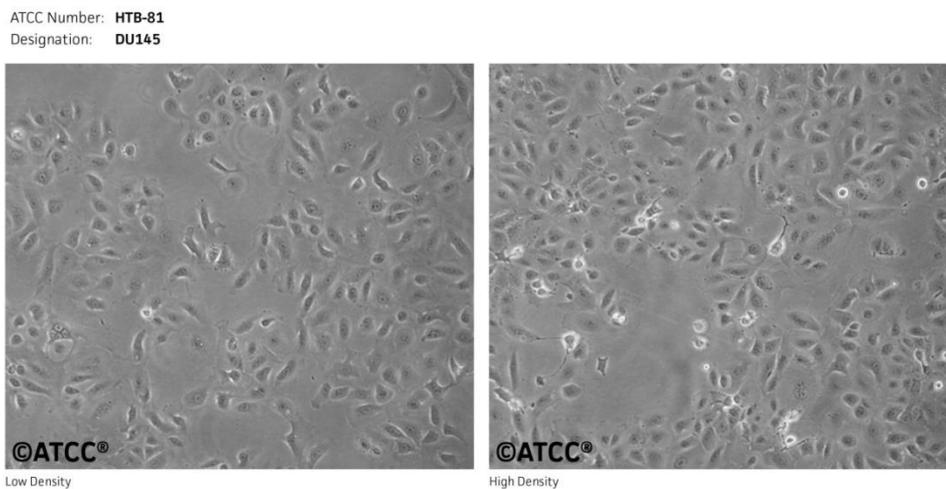
La línea celular LNCaP fue adquirida del repositorio celular de la compañía ATCC (Manassas, Virginia, EEUU). Es una línea celular humana derivada de un carcinoma de próstata, específicamente de un sitio de metástasis izquierda del nodo linfático de la región supraclavicular. Estas células fueron extraídas en 1977 de un hombre adulto caucásico de 50 años y presentan una morfología de tipo epitelial. Son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos y presentan reactividad positiva para receptor de andrógenos y para receptor de estrógenos, respondiendo a la 5-alfa-dihidrotestosterona con una modulación de su crecimiento. Se adhieren suavemente al sustrato y acidifican el medio rápidamente. No producen una monocapa uniforme y, generalmente, presentan un crecimiento lento en clústers. El análisis citogenético evidencia que es una línea celular tetraploide donde mayoritariamente las células presentan 84, 86 y 87 cromosomas (<http://www.iclc.it/listanuova.html>). (Figura 15.)



**Figura 15.** Imagen de microscopía óptica de la línea celular LNCaP en alta y baja densidad. Extraído de la página de ATCC.

## DU145

La línea celular DU145 también fue adquirida en ATCC. Es una línea celular humana proveniente de un carcinoma de próstata, específicamente de un sitio de metástasis en el cerebro de un hombre adulto caucásico de 69 años. Estas células presentan una morfología de tipo epitelial y son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos. No responden a hormonas y no expresan antígeno prostático (PSA). El análisis citogenético evidencia que sus células son triploides, presentando mayoritariamente 61 y 62 cromosomas (<http://www.iclc.it/listanuova.html>). (Figura 16).



**Figura 16.** Imagen de microscopía óptica de la línea celular DU145 en alta y baja densidad. Extraído de la página de ATCC.

## *Bacterias DH5 $\alpha$*

Para la amplificación de los plásmidos se utilizó la cepa de *E. coli* DH5 $\alpha$  obtenidas de la compañía Invitrogen. Esta cepa se encuentra atenuada y optimizada para la clonación. En primer lugar, presenta las enzimas recombinasas mutadas para que el ADN introducido en la célula no pueda insertarse en el cromosoma bacteriano. Esto es ventajoso, ya que se mantiene la integridad del plásmido en la célula que se replica de manera independiente del cromosoma, permitiendo obtener una mayor amplificación del producto y un mayor control de la expresión. Adicionalmente, esta cepa tiene una deleción del extremo 5' del gen lacZ que codifica para un fragmento C-terminal (fragmento  $\omega$ ) inactivo de la  $\beta$ -galactosidasa, necesario para poder realizar la selección de las células recombinantes. Naturalmente, esta cepa de *E. coli* no es transformable. Es decir, no tiene las proteínas necesarias que cumplen la función de toma y de

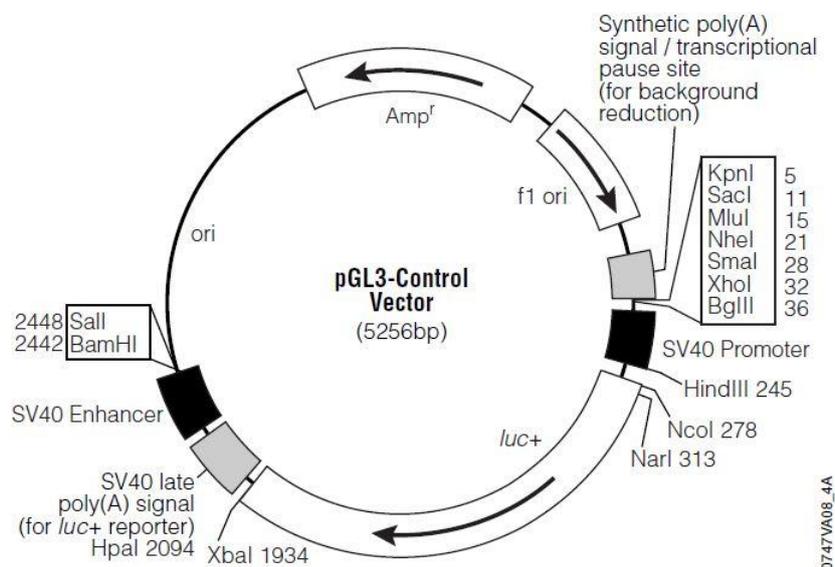
procesamiento del ADN para la transformación. Sin embargo, es posible hacer a estas células competentes para la transformación de manera transitoria, por ejemplo mediante un método químico con cloruro de calcio.

### Vectores reporteros

#### *pGL3-3'UTRpdcd4* tipo salvaje (wt) y mutante (mut)

Contamos con plásmidos reporteros de tipo pGL3 (Promega) (Figura 17), con la 3'UTR de *pdcd4* wild type (wt) y mutante clonado corriente abajo del gen luciferasa de firefly. Estos fueron enviados por el Dr. Xiaofei Zheng como gotas en papel de filtro, quien confirmó con estos plásmidos la interacción de hsa-miR-183-5p y *pdcd4* en carcinoma hepatocelular (Li, Fu et al. 2010).

Los vectores reporteros pGL3 de luciferasa proporcionan una base para un análisis rápido, sensible y cuantitativo de factores que regulan la expresión génica en mamíferos. Su estructura ha sido diseñada para aumentar la expresión de su gen reportero y contiene una región codificante de la luciferasa de *firefly* optimizada para el monitoreo de su actividad transcripcional en células eucariotas.



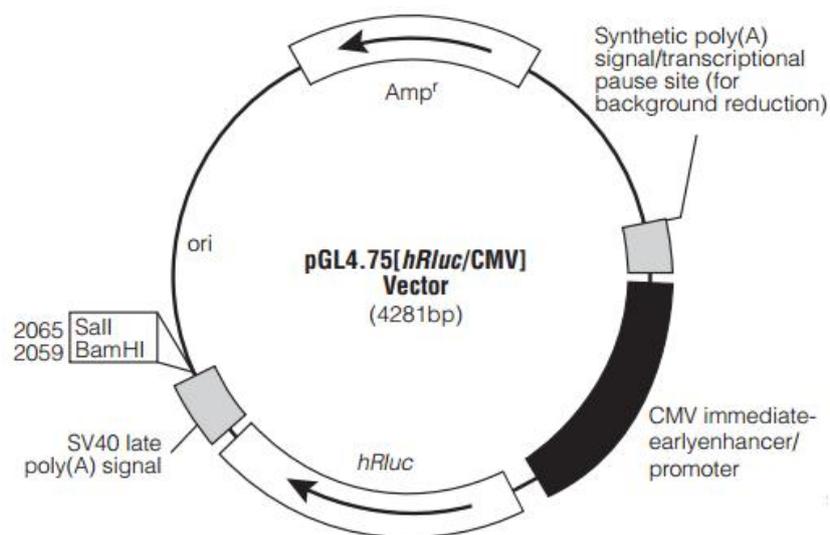
**Figura 17.** Mapa circular del vector pGL3. Se detallan los componentes de su estructura: luc+, cDNA que codifica la luciferasa de *firefly* modificada; Amp<sup>r</sup>, gen que confiere resistencia a la ampicilina en *E. coli*; F1 ori, origen de replicación derivado de bacteriófago F1; ori, origen de replicación del plásmido en *E.*

*coli*. Las flechas dentro de luc+ y el gen Amp<sup>r</sup> indican la dirección de la transcripción; la flecha dentro de f1 ori indica la dirección de la replicación.

### *pGL4-75[hRluc/CMV]*

Como control de transfección utilizamos un plásmido pGL4-75 (Promega) (Figura 18). Este vector contiene como gen reportero una luciferasa de renilla sintética, que ha sido optimizada a nivel de codones para una alta expresión y una reducción de transcripciones anómalas en mamíferos. Este se encuentra bajo la regulación de un promotor/potenciador inmediato temprano de CMV. Estos vectores están diseñados para ser utilizados como un control de expresión o un vector co-reportero.

Las luciferasas de firefly y renilla son ampliamente utilizadas como co-reporteros ya que pueden medirse de manera fácil, rápida y sensible. La luciferasa de firefly es una proteína de 61kDa mientras que la luciferasa de renilla es una proteína de 36kDa. Ambas son monoméricas y no requieren procesamiento post-traduccional, por lo que pueden ser utilizados como reporteros inmediatamente luego de la traducción, en 24 horas.



**Figura 18.** Mapa circular del vector pGL4-75. Presenta una luciferasa de renilla como gen reportero bajo el control de un promotor CMV fuerte.

## EX-EGFP-Lv01Rx-KpnI

En la puesta a punto de los ensayos de pérdida y ganancia de función de miR-183 se utilizó el plásmido control EX-EGFP-Lv01Rx-KpnI (GeneCopoeia), el cual expresa la proteína reportera EX-EGFP (un derivado potente de la proteína verde fluorescente) bajo el control de un promotor CMV. (Figura 19).

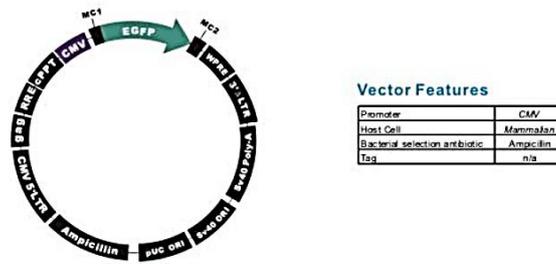


Figura 19. Mapa circular del vector EX-EGFP-Lv01Rx-KpnI.

## Oligonucleótidos

### Primer de secuenciación para los plásmidos reporteros

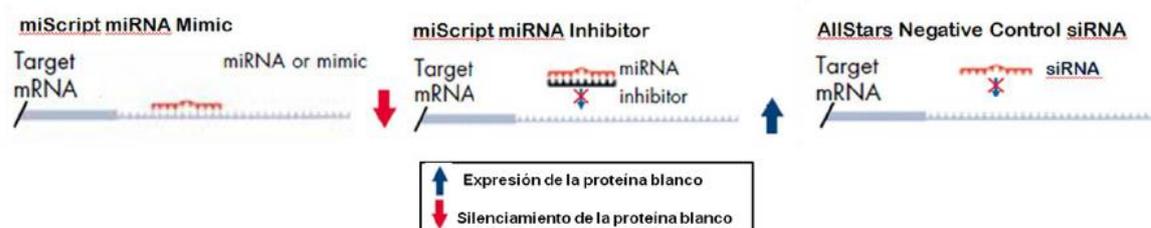
Para la secuenciación de los plásmidos reporteros con la 3'UTR de *PDCD4* salvaje y mutante, solicitamos el uso de un primer *forward* a 462pb de la secuencia complementaria a la región semilla de miR-183, cuya secuencia es 5'-CGT TGT TGT TTT GGA GCA CGG-3' con 100% complementariedad.

### Oligonucleótidos para ensayos de pérdida y ganancia de miR-183

Para los ensayos de pérdida y ganancia de hsa-miR-183-5p se utilizaron los oligonucleótidos que se listan en la Tabla 1. Los mismos pertenecen al sistema ofrecido por la compañía Qiagen para el análisis funcional de miRs conocido como miScript, cuyo mecanismo se describe en la Figura 20.

**Tabla 1.** Moléculas utilizadas para los ensayos de pérdida y ganancia de función de miR-183. Se describe brevemente las características de cada una de ellas y el grado de pureza que presentan.

<b>Nombre</b>	<b>Descripción</b>	<b>Pureza</b>
<b><i>Syn-hsa-miR-183-5p</i></b> <b><i>miScript miRNA</i></b> <b><i>Mimmic</i></b>	Molécula de ARN doble hebra, químicamente sintetizada, que mimetiza al hsa-miR-183-5p endógeno. No presenta modificaciones. La secuencia deriva de la secuencia madura de hsa-miR-183-5p actualizada de la base de datos miRBase ( <a href="http://microrna-sanger-ac.uk/">http://microrna-sanger-ac.uk/</a> ), cuya secuencia de la hebra líder es 5'UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU3'.	>90%
<b><i>AllStars Negative Control siRNA</i></b> <b><i>miScript siRNA</i></b>	Molécula de ARN doble hebra, químicamente sintetizada, que no presenta homología con genes humanos. No presenta modificaciones. Se utiliza como control negativo del miScript miRNA Mimmic.	>90%
<b><i>Anti-hsa-miR-183-5p</i></b> <b><i>miScript miRNA</i></b> <b><i>Inhibitors</i></b>	Molécula de ARN simple hebra químicamente sintetizada, con modificación standard (2'OMe). Deriva de la secuencia madura de hsa-miR-183-5p actualizada de la base de datos miRBase ( <a href="http://microrna-sanger-ac.uk/">http://microrna-sanger-ac.uk/</a> ).	>90%



**Figura 20.** Esquema donde se representa el mecanismo de acción de miScript miRNA Mimmic, miScript miRNA Inhibitor y AllStars Negative Control. El mimmic se une al sitio blanco en 3'UTR del gen modulado y provocando la degradación y/o bloqueo de la traducción del ARNm blanco, produciendo un silenciamiento de la proteína diana. El inhibidor se une a los miRs y/o mimmic e inhibe su función, produciendo un aumento en la expresión de la proteína blanco. El AllStars *Negative Control* no modula la expresión del gen blanco, por lo que la expresión de la proteína es igual a las muestras sin transfectar. Modificado de Qiagen (<http://www.sabiosciences.com/manuals>).

El oligonucleótido miScript siRNA está recomendado para ser utilizado como control en los ensayos de transfección de miScript miRNA Mimemics, por la compañía que los produce. Así mismo, recomienda utilizar un miScript Inhibitor Negative Control como control de los ensayos de transfección de miScript miRNA Inhibitors. Sin embargo, debido a que no contamos con esta molécula control en el laboratorio, se utilizó una aproximación alternativa que consistió en la co-transfección de miScript miRNA Mimmic junto con miScript miRNA Inhibitor. Con el fin de igualar la cantidad de ARN a

transfectar y permitir un análisis más comparativo, se compensó la cantidad de ARN en los ensayos con el miScript miRNA Inhibitor con miScript siRNA.

#### *siGLO Green Transfection Indicator (Dharmacon)*

Es un oligonucleótido fluorescente, doble hebra, modificado, que se localiza casi exclusivamente en el núcleo de manera que permite la evaluación visual inequívoca de su transfección. Es recomendado para su utilización en experimentos de optimización de transfección de siRNAs y miRs, como también para el seguimiento de la eficiencia de transfección en estos ensayos. Este oligonucleótido pretende ser un indicador cualitativo de transfección y no debe ser utilizado para la determinación cuantitativa de la misma. Las longitudes de onda máximas de absorción/emisión son 494/520 nm, por lo que se puede utilizar un filtro de FITC para su visualización.

## MÉTODOS

### *Preparación de ADN plasmídico*

#### *Transformación de bacterias DH5 $\alpha$ competentes*

Las bacterias DH5 $\alpha$  ya competentes se encontraban almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Para la transformación, se dejaron descongelar en hielo 30 min. Luego, se agregó el ADN plasmídico en una proporción menor a 25  $\mu\text{L}$  de ADN por 100  $\mu\text{L}$  de células (se procura usar menos de 0,1  $\mu\text{g}$  / 200 células). Se dejó 20 minutos en hielo y se dio un golpe de calor de 90 segundos a  $42^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se colocó en hielo 1-2 minutos y se adicionó 4 volúmenes de medio de cultivo Luria Bertani (LB) a temperatura ambiente. Se dejó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante una hora con agitación fuerte y, finalmente, se plaqueó en Agar LB Ampicilina. 48 horas después, se picaron 3 colonias y pusieron a crecer en LB para realizar la extracción.

#### *Extracción y purificación de los plásmidos reporteros*

Se realizó la extracción y purificación de los plásmidos reporteros con la 3'UTR de PDCD4 wt y mutante y del plásmido control pGL4-75 a partir de las bacterias DH5alpha

transformadas, utilizando el Kit de Midiprep de Qiagen según el protocolo recomendado.

Estos protocolos están basados en una modificación del procedimiento de lisis alcalina. El ADN plasmídico se une a una resina de intercambio aniónico, bajo condiciones apropiadas de pH y bajas concentraciones de sal. El ARN, proteínas y moléculas, de bajo peso molecular, son eliminadas en los sucesivos lavados alcalinos. El ADN plasmídico es eluído en un buffer con altas concentraciones de sal y luego concentrado y desalado mediante la precipitación con isopropanol. Las resinas de Qiagen operan mediante flujo de gravedad, reduciendo el tiempo de manipulación.

Se cuantificó la cantidad de plásmido obtenido utilizando un espectrómetro de gota y se evaluó la pureza por la relación 260/280 y 260/230. Finalmente, se evaluó la composición de la mezcla en gel de agarosa 1X en buffer TAE 1X, utilizando *Good View* para su visualización.

#### *Secuenciación de los plásmidos reporteros*

Los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar por secuenciación automática de Sanger a la compañía MacroGen (Korea) para confirmar su identidad.

#### *Reconstrucción computacional de los plásmidos reporteros*

A efectos de analizar los resultados de secuenciación, se realizó la reconstrucción de la secuencia de los plásmidos utilizando el programa *Genamics Expression*, tomando en cuenta los primers que utilizaron Zheng et. al. en la etapa de amplificación de la región 3'UTR del gen PDCD4. La secuencia nucleotídica esperada del plásmido se obtuvo de la compañía que lo produce y la de la 3'UTR bajando la secuencia del gen de la base de datos *genbank* y alineando con los *primers* en el mismo programa.

#### *Análisis de las secuencias*

Se realizó el análisis de las secuencias mediante el programa BioEdit Sequence Alignment Editor Tom Hall.

### *Precipitación del ADN plasmídico*

A los plásmidos purificados se les añadió 0,3M de Acetato de Sodio y 2 volúmenes de etanol 200%, y se centrifugó a 10.000 rpm por 10-15 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se les añadió 200 µL de etanol 70%. Luego de una agitación vigorosa, se centrifugó a máxima velocidad por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante en cámara de flujo laminar. Finalmente se resuspendió en agua estéril, libre de ARNasas.

### *Cultivos celulares*

#### *Medio de cultivo comercial Rosswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) de Capricorn*

El medio RPMI-1640 obtenido de la compañía Capricorn fue suplementado con 10% de Suero fetal Bovino (F.B.S) descomplementado, 1% Penicilina y Estreptomicina (100U/mL y 100U/mL, respectivamente). A este se llamó medio RPMI-1640 completo. Se mantuvo en la heladera a 4°C.

#### *Descomplementación del Suero Fetal Bovino*

Se inactivaron los factores del complemento presentes en el suero fetal bovino descongelado, mediante la incubación en un baño de agua a 56°C por 45min. Luego se enfrió en baño de hielo y se alicuotó convenientemente para almacenar en freezer a -20°C.

#### *Descongelamiento de crioviales*

Las células se encontraban almacenadas en freezer a -80°C en crioviales de 1,4mL en medio RPMI 1640 completo, suplementado con 5% de DMSO y 10% extra de FBS, aproximadamente un millón de células en fase exponencial de crecimiento. El descongelamiento se realizó en baño de agua a 37°C y, rápidamente, el contenido fue trasvasado a tubos falcon estériles de 15mL a los que se le añadió 8mL de medio RPMI 1640 completo precalentado a 37°C. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y luego se removió el medio sobrenadante utilizando una bomba de vacío. Las células

fueron resuspendidas en medio fresco RPMI 1640 completo y trasvasado a frascos de cultivo celular estériles de 25cm<sup>3</sup>. Los frascos se almacenaron horizontalmente en una incubadora a 37°C, a 1 atmósfera de presión, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad.

#### *Mantenimiento de los cultivos*

Los cultivos se observaron de manera rutinaria bajo el microscopio óptico invertido para evaluar el crecimiento y apariencia de las células. El medio fue cambiado cada 2 o 3 días en función de la densidad celular y el color del medio, el cual contiene un indicador colorimétrico de pH que pasa de color rosado-rojo (pH 7,4) a un tono naranja-amarillento (pH 6,5).

#### *Propagación*

Una vez que las células alcanzaron un 80% de confluencia aproximadamente, se realizaron sub-cultivos para mantener el cultivo en crecimiento. Brevemente, se aspiró el medio utilizando una bomba de vacío y se lavó la monocapa de células con 3mL de PBS 1X con el fin de remover trazas de suero que contienen inhibidores de tripsina. Luego, se adicionó una solución de tripsina 0,25% (w/v) y EDTA 0,53 mM en volumen suficiente para cubrir la monocapa celular (entre 0,5mL – 1mL para frascos de 25cm<sup>3</sup>) y se incubó por 5 a 15 minutos a 37°C. Durante este lapso, se observó bajo el microscopio y, una vez que la monocapa se desprendió completamente, se les adicionó 1,5 volúmenes de medio RPMI 1640 completo para inactivar la tripsina y el EDTA. Se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante con bomba de vacío y se resuspendieron las células en medio RPMI 1640 completo para deshacer los acúmulos celulares. Finalmente, se tomó una alícuota de la suspensión celular que contiene el número de células que deseamos subcultivar y se llevó a 5mL con medio RPMI 1640 completo en un frasco de cultivo de 25cm<sup>3</sup>.

#### *Congelamiento de células*

Con el fin de generar un stock de células para los ensayos posteriores, se congelaron células en fase exponencial de crecimiento luego del primer pasaje, cuando el cultivo alcanzó un 80% de confluencia, aproximadamente. Para esto, en primera instancia, se

verificó por observación bajo el microscopio óptico que el cultivo creció normalmente y se procedió a tripsinizar las células, tal como se realiza para los sub-cultivos. Luego, se toma una alícuota de la suspensión celular que contenga entre 1 a 2 millones de células y se resuspende en medio de congelamiento, de modo tal que cada vial resulte en un volumen final de 1,4mL aproximadamente. El medio de congelamiento consta de medio RPMI 1640 completo, suplementado con 5% de di-metil-sulfóxido (DMSO) como agente crioprotector y 10% extra de FBS. Seguidamente, los crioviales se colocan en un recipiente con alcohol isopropílico, que permite la disminución gradual y controlada de la temperatura (1°C/min) y se almacenan en freezer a -80°C.

#### *Recuento en cámara de Neubauer*

Al observar al microscopio la cámara de Neubauer, se puede apreciar que esta presenta una cuadrícula conformada por 9 cuadrados grandes, cada uno subdividido en otros 16 cuadrados pequeños. El volumen sobre cada uno de estos 9 cuadrados grandes es aproximadamente de 0.1 µL. Para realizar el recuento celular, se utilizan los dos cuadrados grandes a cada lado de la cámara, de manera que se realizan cuatro determinaciones del número de células en el cuadrado grande, cuya media será el número de células en 0.1 µL de la suspensión de células. Para reducir el error del recuento se deben contar tantos cuadrados como sean necesarios para acumular un mínimo de 100 células. Finalmente, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se calcula el número de células por mL presentes en la suspensión original.

#### *Ensayos de Genes Reporteros*

##### *Co-transfección transitoria de los vectores pGL3-3'UTRpdcd4 wt y mut con pGL4-75 y mimmic, inhibidor y controles de miR-183*

Se realizó la puesta a punto la co-transfección de los plásmidos reporteros y el plásmido control, junto con mimmic, inhibidor y controles de hsa-miR-183-5p, utilizando el protocolo de Qiagen (*Guidelines for miRNA mimmic and miRNA inhibitor experiments*). Las variables ensayadas incluyeron cantidad de células, cantidad de plásmidos, señal específica de sustrato, transfección en células adheridas o en suspensión, cantidad de agente de transfección y cantidad de ARNs funcionales.

Se utilizó *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) como agente de transfección. Es una formulación que contiene liposomas catiónicos que son capaces de acomplejarse con moléculas de ácido nucleico cargados negativamente, que permite superar la repulsión electrostática de la membrana celular. Presenta una alta eficiencia de transfección en una gama de líneas celulares. La eficiencia de transfección óptima y la viabilidad celular subsiguiente dependen de un número de variables experimentales tales como la densidad celular, cantidad de lipofectamina y de ADN, el tiempo de formación de los complejos y la presencia o ausencia de componentes de medios, tales como antibióticos y suero.

Para la detección de la actividad reportera se utilizó del kit *Dual-Glo Luciferase Assay System*, que utiliza dos sustratos diferentes para la detección de las variantes de luciferasa de una luciérnaga ("*Firefly*" de *Photinus pyralis*) y el cnidario ("*Renilla*" de *Renilla reniforme*). Estos reactivos se han desarrollado de modo que las señales de ambas luciferasas sean relativamente estables y tengan una vida media de aproximadamente 2 horas. El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del proveedor.

Las medidas de bioluminiscencia se realizaron en un equipo Varioskan Flash de Thermo Electron Corporation. El tiempo entre cada medida fue de 1000ms, un rango dinámico automático, óptica normal y tipo de medida normal.

### *Citometría de flujo*

En la puesta a punto de los ensayos de transfección se realizó el seguimiento del plásmido control EX-EGFP-Lv01Rx-KpnI y el siGLO *Green Transfection Indicator* en un citómetro de flujo BD Accuri C6 utilizando un láser 488 nm para la excitación y un filtro FL1 (515 ±15 nm) para la emisión. Para esto, luego de la transfección, se procedió a realizar las suspensiones celulares siguiendo el protocolo de tripsinación convencional, partiendo de los cultivos celulares en monocapa. Las células se resuspendieron en buffer FAC, que contiene 1% de EDTA 0,5M y 1% de BSA en PBS sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, y finalmente se procedió al análisis en el citómetro.

## Cuantificación de la proteína PDCD4 por Inmunofluorescencia

Se realizó la inmunocitoquímica de PDCD4 en células sin transfectar utilizando dos protocolos diferentes. Para esto se plaquearon  $8,0 \times 10^4$  células/pocillo de la línea celular DU145 en placa de 24 pocillos y a las 24 horas las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) 4%, 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se realizaron 3 lavados con buffer PHEM (que contiene 60 mM de PIPES, 25 mM de HEPES, 10 mM de EGTA y 2 mM de  $MgCl_2$ ) durante 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a bloquear las células por 30 minutos a 37°C, utilizando dos protocolos: 1) un protocolo sin permeabilizante, utilizando un buffer de bloqueo con 3% BSA y 2% Glicina; y 2) un protocolo con permeabilizante, utilizando un buffer de bloqueo con 3% BSA, 2% Glicina y 0,3% Tritón X-100. Luego, se incubaron las células *overnight* (ON) a 4°C con un anticuerpo primario anti-PDCD4 de conejo (Abcam 51495). Finalmente, se realizaron 3 lavados con buffer PHEM durante 10 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la incubación con un anticuerpo secundario producido en cabra inmunizada con IgG(H+L) de conejo, el cual está conjugado al fluoróforo Alexa 633 (A-21071). Las células fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para su observación y se tomaron fotos de campos representativos con un microscopio de Epifluorescencia Olympus IX81. El filtro utilizado para ver la señal del DAPI es un filtro cúbico U\_MWU2 (excitación: 330 – 385 nm; emisión: 420 nm). Para visualizar PDCD4 se utilizó un filtro cúbico U\_MWIY2 (excitación: 545-580 nm; emisión 610 nm). Para visualizar siGLO *Green* se utilizó un filtro cúbico U\_MNIBA3 (excitación: 470-495 nm; emisión 510-550 nm).

Luego de determinado el protocolo adecuado de inmunomarcación, se transfectaron  $2,5 \times 10^3$  células/pocillo de la línea celular DU145 por triplicado en placa de 96 pocillos con: 1) 5 nM de mimmic, 2) 5 nM de siRNA *negative control*, 3) 55 nM inhibidor y 5,5 nM de siRNA *negative control* y 4) 55 nM de inhibidor y 5,5 nM de mimmic, utilizando 2  $\mu$ L de Lipofectamine 2000. A todas las mezclas de transfección se les adicionó 5 nM de siGLO *Green* *transfection indicator*. A las 72hrs de transfección, las células fueron fijadas y marcadas como se describió anteriormente, pero utilizando un anticuerpo secundario producido en cabra inmunizada con IgG(H+L) de conejo, el cual está

conjugado al fluoróforo Alexa 555 (Abcam A-21429) . Finalmente, las células fueron teñidas con DAPI y se tomaron fotos de 4 campos representativos por pocillo con el mismo microscopio de epifluorescencia.

Se cuantificó la intensidad de fluorescencia nuclear de los 3 fluoróforos utilizando el programa ImageJ 1.49v de libre acceso (<http://imagej.nih.gov/ij/>). Para esto se delinearon los núcleos visualizando el DAPI y, manteniendo la misma selección, se cuantificaron las dos intensidades restantes para cada célula. De esta manera se obtuvieron datos de intensidad de DAPI, Alexa 555 y siGLO Green para cada célula. Se excluyeron del análisis los núcleos incompletos de los bordes, aquellos que presentaban precipitados de siGLO *Green*, núcleos apoptóticos como también aquellos que se encontraban en mitosis.

### *Análisis estadísticos*

Tanto en los ensayos de genes reporteros como en la cuantificación de PDCD4 por inmunofluorescencia, se analizó la significancia estadística los datos obtenidos utilizando el test t no pareado del paquete estadístico GraphPad Prism 6.01, con un p-valor < 0,05.

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## Ensayos de genes reporteros

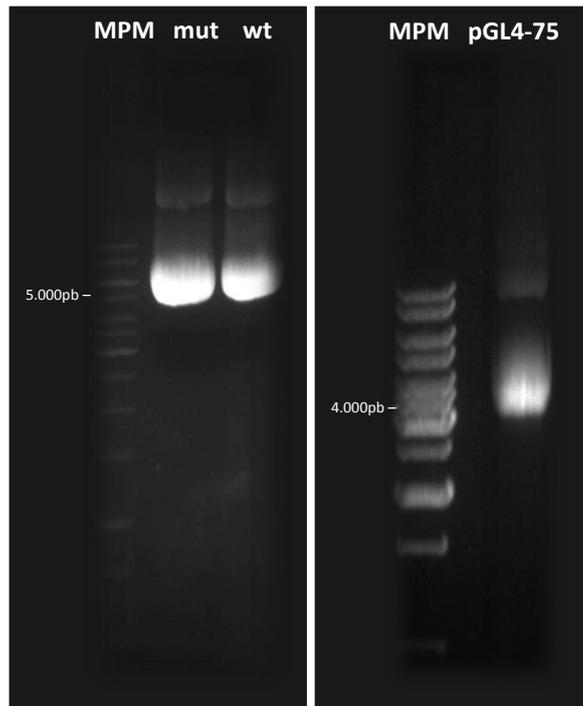
### Preparación de ADN plasmídico

Con la finalidad de obtener los plásmidos con la región 3'UTR de *PDCD4* salvaje (wt) y mutante (Khanmi, Ignacimuthu et al.) clonada corriente abajo del gen reportero luciferasa que recibimos por correo, realizamos la extracción y purificación plasmídica a partir de bacterias que habían sido transformadas por un protocolo de shock térmico por Ottati. Por otro lado, realizamos la transformación de bacterias DH5 $\alpha$  competentes con el plásmido que expresa la luciferasa de renilla bajo el control del promotor fuerte CMV pGL4-75<sub>[hRLuc/CMV]</sub>, con el fin de amplificarlo y usarlo como control de transfección, y realizamos la extracción y purificación utilizando el mismo protocolo. La concentración y el grado de pureza obtenido se detallan en la **Tabla 2**. El rendimiento del procedimiento fue el esperado y la relación de densidad óptica indica un grado de pureza adecuado para su uso en los procedimientos posteriores.

**Tabla 2.** Rendimiento de la extracción del ADN plasmídico y grado de pureza obtenido.

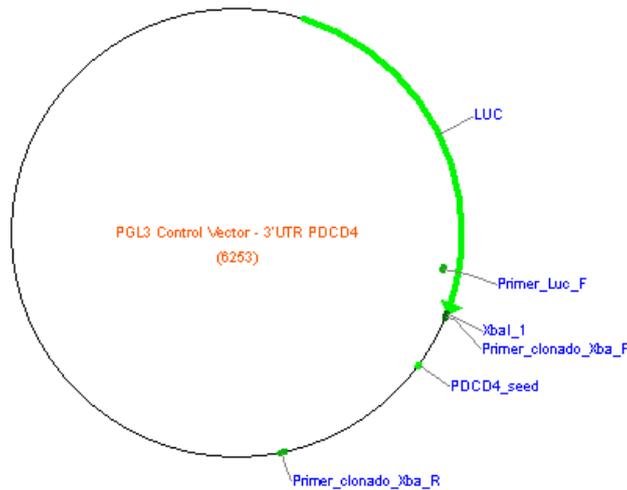
	pGL3-3'UTRpdc4 wt	pGL3-3'UTRpdc4 mut	pGL4-75
<b>Concentración (ng/uL)</b>	893,2	967,8	400,0
<b>260/280</b>	1,81	1,90	1,85
<b>260/230</b>	2.10	2.21	ND

Con la finalidad de confirmar que la lectura de ADN era debida a los plásmidos purificados, analizamos la composición de la mezcla en gel de agarosa (**Figura 21**). El patrón de bandas observado indica la presencia del plásmido en sus tres formas: superenrollado, lineal y circular. La banda que corresponde a la forma lineal del plásmido es la que migra en el medio y es la única que se puede comparar con el peso molecular si el plásmido no fue linealizado. Los plásmidos pGL3-3'UTRpdc4 wt y mut tienen un tamaño de 6.253pb (proveniente del vector pGL3-control vector (SV40) de 5256pb más la 3'UTR de *PDCD4* clonada) mientras que el plásmido pGL4-75 posee 4.281pb.



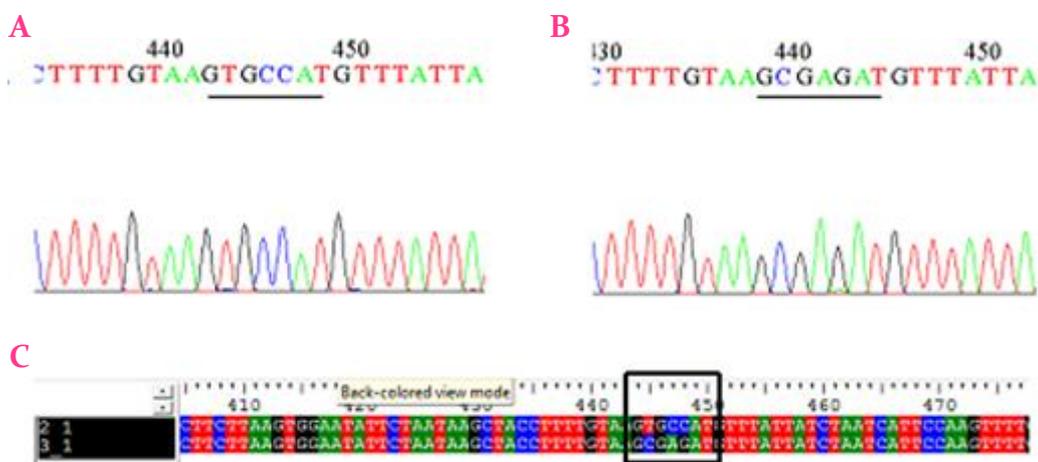
**Figura 21.** Corrida electroforética en gel de agarosa 1x teñido con Good View de ADN plasmídico. A) plásmidos reporteros pGL3-3'UTRpdc4 de tipo salvaje (wt) y mutante (Khanmi, Ignacimuthu et al.) y B) plásmido control pGL4-75. Se utilizó 1kb DNA Ladder como marcador de peso molecular, indicándose como MPM.

La migración en gel observada en la **Figura 21** está de acuerdo con que las especies aisladas corresponden esencialmente a ADN plasmídico estructurado, de un peso molecular homogéneo, cuyo tamaño coincide aproximadamente con el de los plásmidos esperados. No se profundizó el análisis en gel puesto que procedimos a la secuenciación directa de los plásmidos. Los mismos fueron entonces enviados a secuenciar para confirmar la presencia de la 3'-UTR de *PDCD4* wt y mut en las regiones esperadas. A efectos de analizar los resultados de la secuenciación, reconstruimos la secuencia del plásmido en el programa *Genamics Expression* (**Figura 22**) tomando en cuenta los *primers* que utilizaron Zheng et. al. en la etapa de amplificación. En base a la secuencia construida solicitamos el uso de un *primer forward* (indicado en la **Figura 22** como Primer Luc\_F) cuya secuencia está ubicada a 462pb corriente arriba de la secuencia complementaria a la región semilla de hsa-mir-183-5p de la 3'UTR de *PDCD4* (indicado en la **Figura 22** como PDCD4\_seed).



**Figura 22. Reconstrucción computacional del plásmido pGL3 Control Vector -3' UTR PDCD4 construido por Zheng et. al.** Este plásmido posee como gen reportero una Luciferasa de Firefly (LUC). Se observa la posición del *primer* utilizado para la secuenciación (Primer\_Luc\_F), los *primers* que fueron utilizados por Zheng para el clonado (Primer\_clonado) y la posición de la secuencia semilla de PDCD4 (PDCD4\_seed).

Las secuencias fueron recibidas de la compañía secuenciadora en forma de electroferogramas de buena definición (**Figura 23-A y B**). Realizamos el análisis de las secuencias obtenidas, alineándolas con las secuencias esperadas construidas previamente, y así confirmamos la presencia de las 3'UTR de *PDCD4* insertada corriente abajo del gen de la luciferasa en los plásmidos (**Figura 23-C**). Encontramos la secuencia complementaria a la semilla de hsa-mir-183-5p mutada, tal como fue descrito por los autores en el trabajo publicado (5'-GCGAGAT-3'), siendo la secuencia salvaje 5'-GTGCCAT-3'.



**Figura 23. Resultado de la secuenciación de los plásmidos reporteros con la 3'UTR de *PDCD4*.** A y B muestran la región del electroferograma donde se encuentra la secuencia complementaria a la semilla de hsa-miR-183-5p (subrayada). C muestra el alineamiento de las secuencias utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor. El plásmido salvaje corresponde a la muestra indicada como 2\_1 mientras que el plásmido mutante a la 3\_1. Se recuadra la posición de la secuencia complementaria a la semilla de hsa-miR-183-5p de ambos plásmidos.

Finalmente, los plásmidos fueron precipitados y resuspendidos en agua libre de RNAsas bajo flujo laminar para mantener las condiciones de esterilidad requeridas para trabajar en cultivo celular.

### *Puesta a punto de los ensayos de transfección*

Se realizó la puesta a punto de los ensayos de genes reporteros. A continuación se describe las variables ensayadas.

#### *Cantidad de plásmidos*

En una primera aproximación, dado que los plásmidos utilizados tienen diferentes esqueletos, diferentes promotores y diferentes genes de luciferasa, se buscó comparar la magnitud de luminiscencia que ambos producían en las condiciones de transfección que pensamos utilizar en adelante. Para esto se transfectaron por duplicado  $2 \times 10^4$  células de la línea celular LNCaP, en placas de 96 pocillos, con 100ng de cada plásmido (200 ng de ADN total) y se observó que el plásmido de renilla emitía una señal de luminiscencia (expresada como Unidades de Luminiscencia, UL) 2.000 veces mayor que el plásmido de firefly, tanto para el que tiene la 3'UTR de *PDCD4* wt como mut. Esto puede deberse a que el promotor CMV (pGL4-75) es más fuerte que el SV40 (pGL3-control plasmid), a que la versión pGL4 con sus genes luc2 son de una generación posterior al vector pGL3-control con el gen luc+, como también a diferencias entre la actividad enzimática de ambas proteínas. Con el fin de obtener señales de luminiscencia de al menos un orden de magnitud de diferencia entre ambos plásmidos y, a la vez, disminuir la cantidad total de plásmido utilizado para evaluar si mejora la eficiencia de transfección, repetimos el ensayo ajustando la relación de la cantidad de los plásmidos. Cabe aclarar que para estos ensayos utilizamos de manera indiferente

los plásmidos de firefly (pGL3-3'UTRpdcd4 wt y mut), ya que observamos en el primer ensayo que emiten una señal de luminiscencia muy similar. Igualmente, en esta parte trabajamos solo con la línea celular LNCaP, ya que las señales de luminiscencia emitidas por firefly y renilla deberían mantenerse proporcionales entre las líneas celulares si se mantiene la relación entre la cantidad de plásmidos.

Así, se transfectaron  $2 \times 10^4$  células en placas de 96 pocillos, con: 1) 98 ng del plásmido de firefly y 2 ng del plásmido de renilla, que corresponde a una relación 20:1; 2) 95 ng del plásmido firefly y 5 ng del plásmido renilla, que corresponde a una relación 50:1; y 3) 100 ng del plásmido de firefly y 0,2 ng de renilla, que corresponde a una relación 500:1; todas las condiciones se ensayaron por duplicado. Las cantidades se diseñaron de manera tal de que la cantidad de ADN total a transfectar se mantuviera constante en 100 ng por pocillo. Para este ensayo se cuantificó la luminiscencia a las 24h de la transfección. Los resultados obtenidos se detallan en la **Tabla 3** y se expresan como el promedio de los duplicados.

**Tabla 3.** Se detalla la relación entre la cantidad de plásmidos y las unidades de luminiscencia emitidas de la luciferasa de Firefly (UL FF) y de Renilla (UL Ren). Se muestra la relación de las unidades relativas de luminiscencia (URL) emitidas por ambos plásmidos.

<b>FF/ Ren</b>	<b>UL FF</b>	<b>UL Ren</b>	<b>URL FF : URL Ren</b>
<b>1: 1</b>	549	1.103.525	1 : 2.000
<b>20:1</b>	3.699	597.195	1 : 160
<b>50:1</b>	2.315	127.959	1 : 50
<b>500:1</b>	2.130	18.705	1 : 10

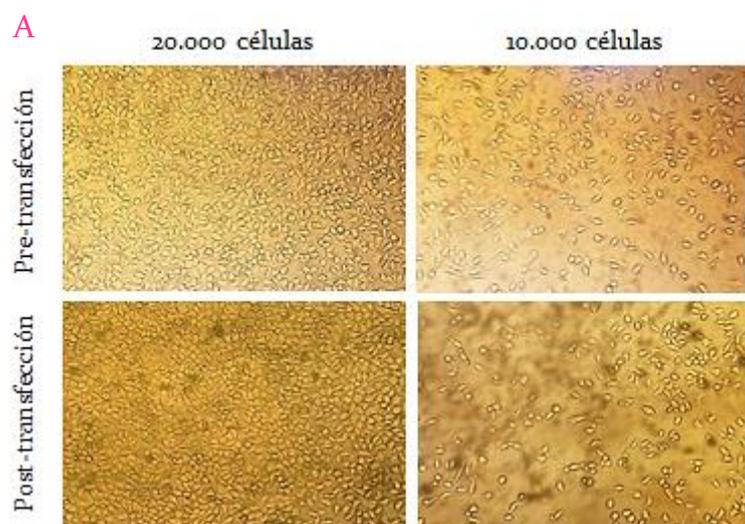
Estos resultados muestran que la disminución de la cantidad total de ADN a 100 ng mejora notoriamente la eficiencia de transfección del plásmido de firefly en comparación con el primer ensayo, en el que se utilizó un total de 200 ng; y que se logró obtener señales de luminiscencia de al menos un orden de magnitud de diferencia entre las luciferasas de firefly y renilla, cuando se utilizó una relación FF/Ren de 500:1. De esta manera, se decidió utilizar esta condición para los ensayos posteriores.

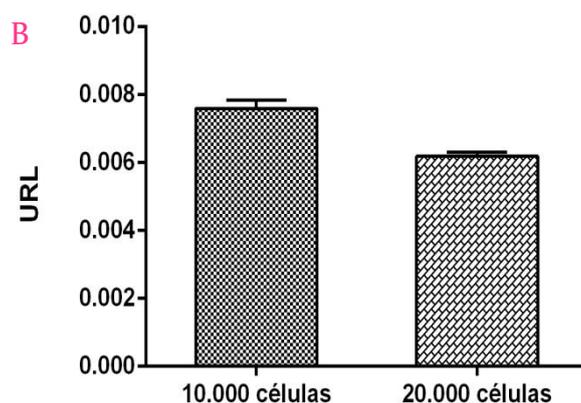
Los resultados de aquí en adelante se expresarán como unidades relativas de luminiscencia (URL) que corresponde a la señal de luciferasa de firefly normalizada por la señal de la luciferasa de renilla.

### *Cantidad de células*

La eficiencia de transfección y la viabilidad celular subsiguiente depende de muchas variables, entre ellas la cantidad de células y su distribución en el pocillo (que integran el concepto de confluencia celular para células adhesivas).

Para determinar el porcentaje de confluencia más adecuado para este ensayo, se transfectaron  $1 \times 10^4$  y  $2 \times 10^4$  células de la línea celular LNCaP en placa de 96 pocillos, con 95 ng de pGL3-3'UTRpdc4 wt y mut, y 5 ng de pGL4-75 y se cuantificó la luminiscencia a las 24 horas de la transfección. Cabe aclarar que en este ensayo no se utilizó la relación 500:1 determinada en la sección anterior ya que este ensayo se realizó de manera paralela. Los resultados muestran que en ambas condiciones se emiten niveles relativos de luminiscencia similares (Figura 24-B). Sin embargo, bajo el microscopio óptico observamos una mayor muerte celular con  $1 \times 10^4$  células (Figura 24-A). A partir de esto, decidimos utilizar  $2 \times 10^4$  células por pocillo de la línea celular LNCaP para los ensayos posteriores.





**Figura 24. Efecto de la confluencia en la eficiencia de transfección.** A. Fotografía al microscopio invertido a un aumento de 20x de los cultivos celulares en placa de 96 pocillos a las diferentes confluencias ensayadas, antes y después de la transfección. B. Unidades relativas de luminiscencia (URL) obtenidas 24 horas después de la transfección.

### *Señal específica de sustrato*

Con el fin de determinar si las señales obtenidas con cada sustrato eran específicas de cada luciferasa, se transfectaron células solo con el plásmido de Firefly y solo con el plásmido de Renilla, y se procedió a medir la luminiscencia utilizando ambos sustratos. En este ensayo se transfectaron  $1 \times 10^4$  células de la línea celular LNCaP con 98 ng de Firefly y 2 ng de Renilla. Los resultados, que se muestran en la **Tabla 4**, muestran que solo se observa señal de luminiscencia (UL), por arriba de la señal de fondo, en aquellas células que realmente fueron transfectadas con la luciferasa cuando se utiliza el sustrato específico para la variedad firefly o renilla.

**Tabla 4.** Se detalla las unidades de luminiscencia (UL) emitidas por la luciferasa de Firefly y de Renilla cuando se transfecta solo con el plásmido que contiene la de Firefly y solo con el plásmido que contiene la de Renilla. Se detalla también la señal de fondo obtenida en los pocillos libres.

	<b>Sustrato Firefly (UL)</b>	<b>Sustrato Renilla (UL)</b>
<b>Plásmido Firefly</b>	533,8	67,5
<b>Plásmido Renilla</b>	29,3	148.510,5
<b>Señal de fondo</b>	47,2	152,1

Estos resultados indican que las señales observadas en los ensayos anteriores son específicas de la variante de luciferasa ensayada.

### *Cantidad de agente de transfección*

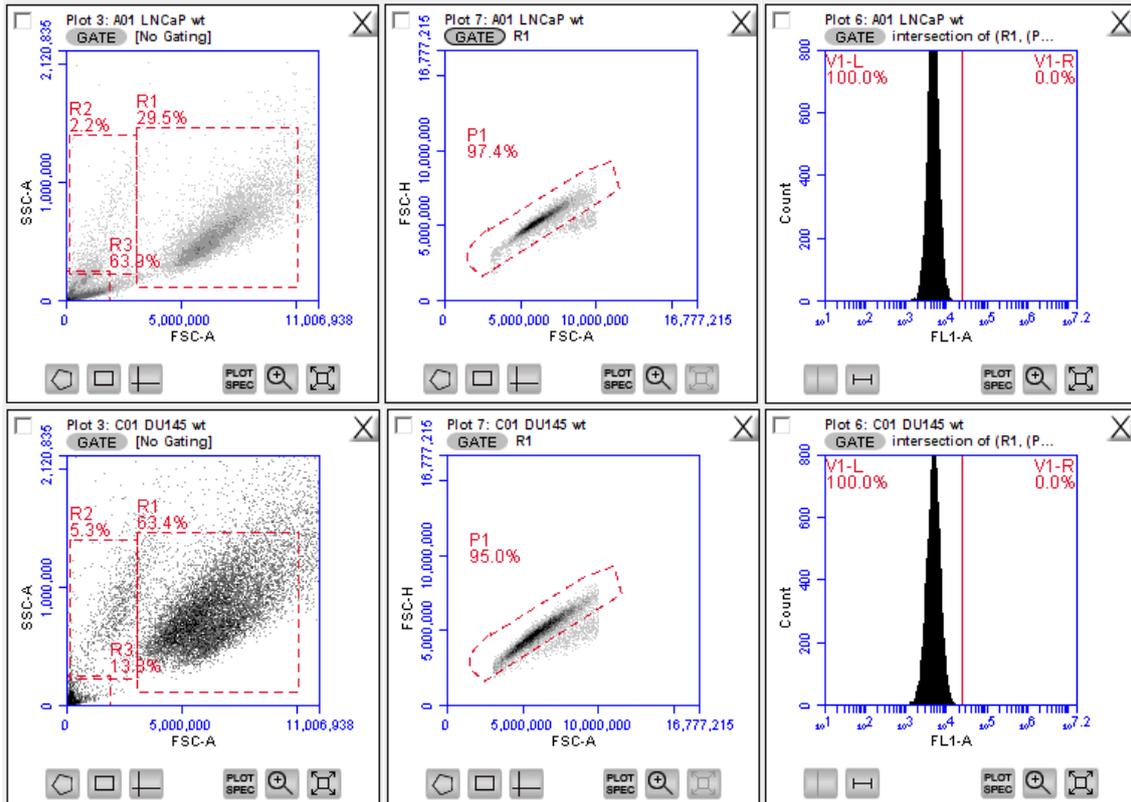
La cantidad de agente de transfección es determinante de la eficiencia del proceso de transfección, así como también en la viabilidad celular subsiguiente, ya que muchas veces los reactivos resultan muy tóxicos para las células. De la misma manera, la cantidad de ácido nucleico que logra ingresar depende en gran medida de la cantidad de agente de transfección, así como también de la línea celular.

Para determinar la cantidad de lipofectamina óptima, se utilizó un plásmido reportero que codifica para la proteína GFP (del inglés, *Green fluorescent protein*) que permite realizar un análisis citométrico de la eficiencia de transfección, lo que tiene alto poder cuantitativo y de manera económica. Adicionalmente, se evaluó la eficiencia de transfección con el agregado de miScript siRNA a distintas concentraciones, de manera de mimetizar las condiciones a las cuales se realizarán los ensayos finales. En esta instancia se utilizaron placas de 24 pocillos para tener suficientes células para el análisis citométrico, extrapolarlo a la misma cantidad de células, plásmido y lipofectamina. Se realizó así la transfección de  $1 \times 10^5$  células de las líneas celulares LNCaP y DU145 con 500 ng del plásmido EX-EGFP, solo y junto con 5 y 50 nM de miScript siRNA, y probando 1, 2 y 2,5 uL de lipofectamina por pocillo. Se siguió la intensidad de fluorescencia de GFP por Citometría de Flujo utilizando el filtro FL1.

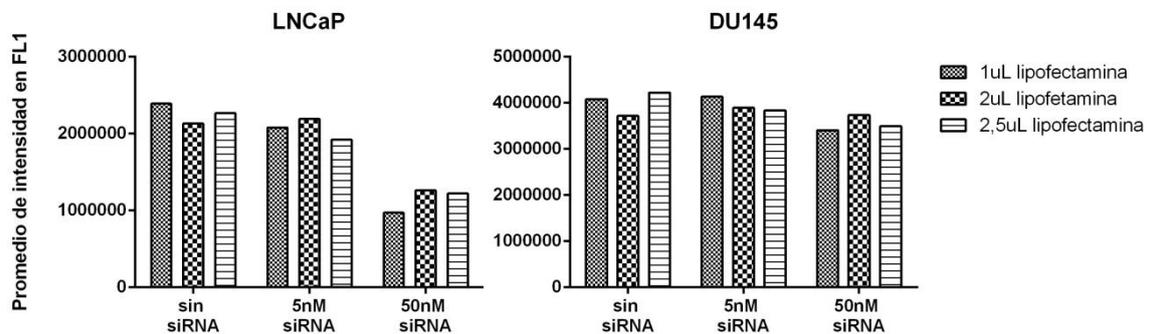
Para el análisis citométrico de los datos, en primer lugar se analizaron células sin transfectar, y se registró la dispersión de luz *side* y *forward* (SSC-A vs FSC-A) que muestra el tamaño y la complejidad de las partículas. Esto nos permitió observar dos poblaciones diferentes que fueron agrupadas en regiones (en inglés, *gates*) separadas: en la región llamada R3, se agrupó la población de menor tamaño y complejidad, que podría corresponder a detrito celular, y en la región llamada R1, la población de mayor tamaño y complejidad, que corresponde a las células. Luego, para eliminar los dobletes de células, analizamos los eventos de R1 en un gráfico FSC-H vs. FSC-A y seleccionamos una nueva región, llamada P1, correspondiente a aquellas células que muestran una relación lineal de ambos parámetros. Finalmente, se registró la intensidad de fluorescencia de aquellos eventos que se agrupan dentro de la intersección de R1 y P1 y se generó un gráfico de *Counts* vs. FL1-A, en el cual se estableció el umbral (en inglés,

*cutoff*) de autofluorescencia. Las células que expresen GFP deberán situarse por encima de este valor umbral (V1-R). Estos gráficos se muestran en la **Figura 25-A**. Hecho esto, se procedió a analizar las células transfectadas manteniendo los parámetros descritos y se adquirieron 10.000 eventos totales en R1 por muestra. Finalmente, se graficó la media de intensidad de fluorescencia obtenida en V1-R para cada condición (**Figura 25-B**).

**A**



**B**



**Figura 25. Determinación de la eficiencia de transfección utilizando un plásmido productor de GFP. A)** Análisis citométrico para la selección de las células y la determinación del umbral de fluorescencia negativa: SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y Counts vs. FL1-A para LNCaP (panel de arriba) y DU145 (panel de abajo). **B).** Se grafica la media de intensidad de fluorescencia de GFP por célula obtenida en

V1-R, cuando se transfecta el plásmido sin ARNs y con 5 y 50 nM de un siRNA control. Se indican los valores obtenidos para las tres concentraciones de lipofectamina ensayadas.

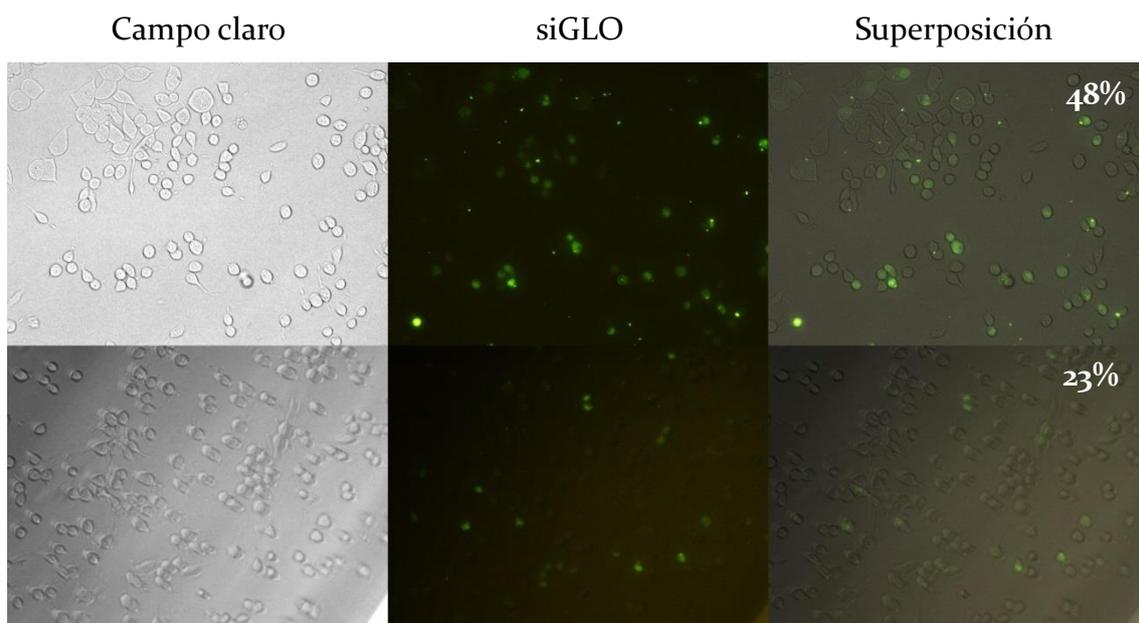
En primer lugar, los datos muestran que las cantidades de lipofectamina ensayadas no modifica substancialmente la eficiencia de transfección para ambas líneas celulares, por lo que decidimos continuar con la concentración más baja. En segundo lugar, se evidencia que LNCaP se transfecta relativamente menos que DU145. En tercer lugar, se observa que en la línea celular LNCaP, el agregado de 50 nM de miScript siRNA disminuye casi en un 50% la intensidad de GFP y que el aumento de la cantidad de lipofectamina no mejora la señal. Esto podría sugerir que los ensayos se están realizando en una concentración de saturación de ácido nucleico, lo que podría estar afectando la eficiencia de transfección de los ARNs. A partir de esto, decidimos realizar los próximos ensayos disminuyendo a la mitad la cantidad total de plásmidos, puesto que observamos que la señal de luciferasa a esta concentración se mantenía muy alta respecto al ruido de fondo (resultados no mostrados). Por otro lado, los resultados obtenidos con la línea celular DU145 no muestran el mismo comportamiento de saturación, lo que va de acuerdo con su mayor capacidad de incorporar ADN respecto a LNCaP.

### *Transfección en células adheridas o en suspensión*

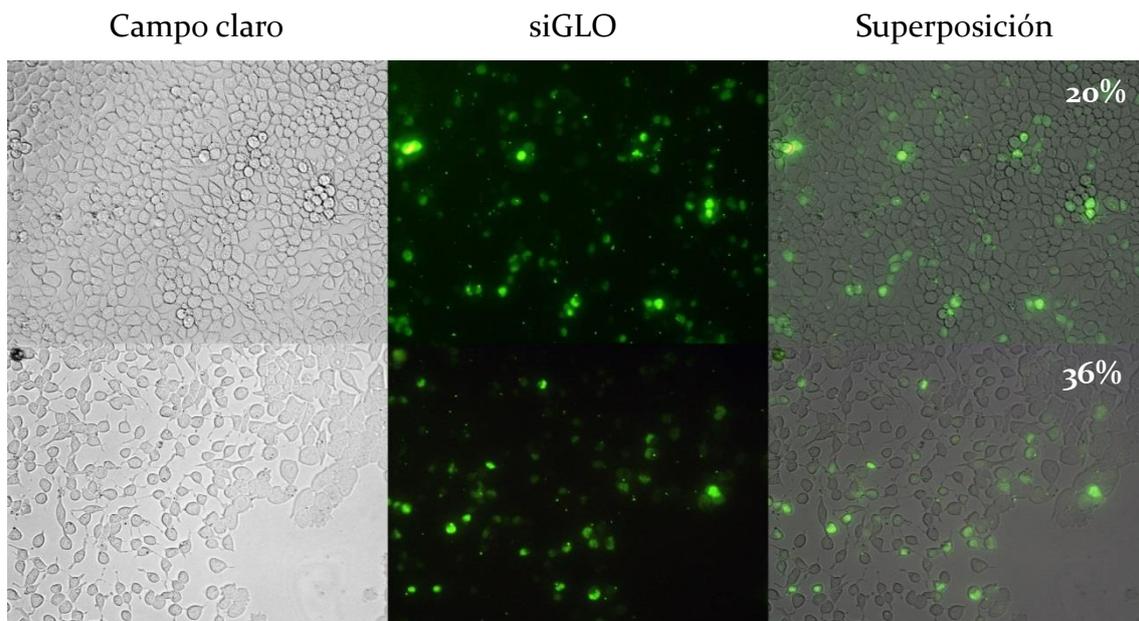
El protocolo que recomienda Qiagen para la transfección de pequeños ARNs indica que la misma se debe realizar mientras las células se encuentran aún en suspensión, ya que la superficie de la célula estaría totalmente disponible para la entrada de los ARNs y así mejoraría la eficiencia de transfección. Por lo tanto, se realizó el ensayo de luciferasa transfectando los plásmidos reporteros, solos y junto con 5 nM de mimmic y 50 nM de inhibidor de hsa-miR-183-5p en células en suspensión. De este ensayo se observó una gran muerte celular y un nivel de luminiscencia notoriamente menor, tanto para las células transfectadas con y sin ARNs, en comparación a los obtenidos en los ensayos realizados anteriormente con células adheridas.

Con el fin de determinar si esta condición era realmente necesaria, es decir, si la eficiencia de transfección aumentaba significativamente en esta condición, se realizó

la transfección de células LNCaP adheridas y en suspensión de los plásmidos junto con un siRNA fluorescente (*siGLO Green Transfection Indicator*), y se analizó bajo un microscopio de Epifluorescencia. Se tomaron fotos de varios campos representativos y se contaron las células positivas y negativas. (Figura 26 y 27). Los resultados muestran una leve mejora de la eficiencia de transfección de las células viables en la suspensión (23-48% vs. 20-36%). Sin embargo, se observa un notorio aumento de la muerte celular en esta condición, al igual que en el ensayo anterior. Estos resultados podrían indicar que, a pesar de que la entrada del siRNA en ambas condiciones no varía notoriamente, el estado fisiológico de la célula se ve más comprometido en las células transfectadas en suspensión que en las adheridas, lo que podría reflejarse en el estado metabólico de la misma y, por lo tanto, explicar la disminución de la señal de luciferasa observada en el ensayo anterior.

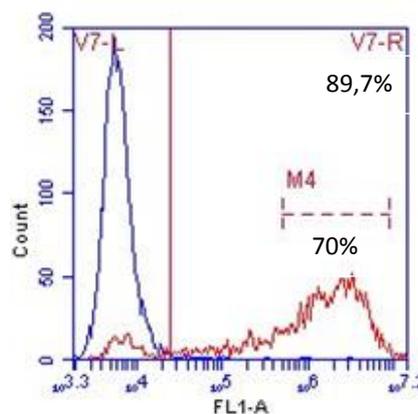


**Figura 26.** Fotografías por microscopía de epifluorescencia de cultivos transfectados con siGLO en **Suspensión**. Los números indican el porcentaje de células transfectadas en cada campo. Se muestran dos campos representativos, para cada uno de los cuales se incluye campo claro, señal en el filtro FITC y la superposición de ambas imágenes.



**Figura 27.** Fotografías por microscopía de epifluorescencia de cultivos transfectados con siGLO adheridas. Los números indican el porcentaje de células transfectadas en cada campo. Se muestran dos campos representativos, para cada uno de los cuales se incluye campo claro, señal en el filtro FITC y la superposición de ambas imágenes.

Sin embargo, la sensibilidad de esta técnica es muy baja y está afectada por la subjetividad del investigador. Por esto, para corroborar los resultados, se realizó un ensayo más cuantitativo evaluando la entrada del siRNA fluorescente en células transfectadas estando adheridas mediante Citometría de Flujo (**Figura 28**). Como células control se utilizaron unas que fueron tratadas de igual manera pero que no se les adicionó lipofectamina a la mezcla de transfección, ya que el siGLO puede adsorberse en la superficie de las células y sobrevalorar el resultado obtenido.



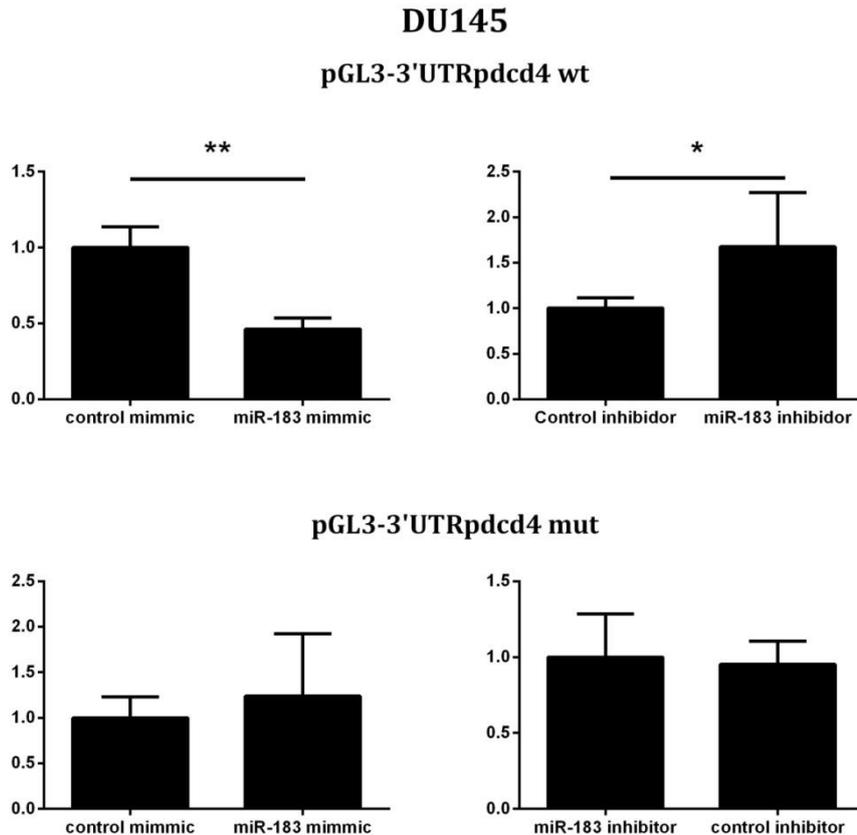
**Figura 28.** Histograma del número células en función de la fluorescencia en FL1-A. La curva azul muestra la población de células control y la roja la población de células transfectadas con siGLO. La

cuantificación realizada en el citómetro de flujo fue analizando un total de 1.000 células en ambas condiciones. El marcador M4 señala la población de células que presentan alta intensidad de fluorescencia de siGLO.

Los resultados muestran que en condiciones de adherencia, el 89,7% de las células incorporaron el siRNA, un valor notoriamente mayor al obtenido por microscopía. Incluso, el 70% de las células positivas se agrupan dentro del marcador M4, el cual delimita una zona de alta intensidad de fluorescencia. Teniendo en cuenta todo esto, decidimos realizar las próximas transfecciones en esta condición, ya que mejora la viabilidad celular sin cambiar significativamente la eficiencia de transfección.

### *Resultados*

Finalmente, habiendo decidido las condiciones de transfección en función de los resultados expuestos anteriormente, realizamos los ensayos solo en la línea celular DU145, ya que presentó la mayor eficiencia de transfección. Así se co-transfectó por triplicado  $8 \times 10^4$  células en placas de 24 pocillos con 250ng del plásmido pGL3-3'UTRpdc4 wt y mut y 0,5 ng de pGL4-75, con 1) 5 nM de mimmic, 2) 5 nM de siRNA como control, 3) 55 nM inhibidor + 5,5 nm de siRNA y 4) 55 nM de inhibidor + 5,5 nM de mimmic como control, y se cuantificó la señal de luminiscencia a 24, 48 y 72 horas después de la transfección. En la **Figura 29** se muestran los resultados a las 48 horas de un experimento representativo de tres que se realizaron, para el plásmido salvaje y mutante. Los valores se expresan relativizados a cada control.



**Figura 29.** Efecto de miR-183 sobre la actividad luciferasa del gen reportero con la 3'UTR de *PDCD4* clonada corriente debajo. Se muestran los ensayos de genes reporteros a 48 horas con el plásmido salvaje arriba (wt) y mutante (mut) abajo, en la línea celular DU145.

Los resultados obtenidos a 48 horas con el plásmido salvaje en el ensayo con el mimmic, muestran una disminución estadísticamente significativa de aproximadamente un 50% de la actividad reportera, con un p-valor de 0,0063, consistente con la hipótesis de que hsa-miR-183-5p regula a PDCD4 por un mecanismo mediado por su 3'UTR. Así mismo, en el ensayo con el inhibidor se observa un aumento estadísticamente significativo, aunque menor, de la señal luciferasa, con un p-valor de 0,0369, consistente con la hipótesis de que esta molécula inhibe el miR-183 que se encuentra presente de manera endógena en la célula, liberando la represión basal del sistema reportero que se observa con el control.

Los resultados a 24 horas mostraron la misma tendencia que en el ensayo con el mimmic. Sin embargo, en el ensayo con el inhibidor el efecto se observó a partir de las 48 horas. Estos efectos no se incrementan a 72 horas (datos no mostrados).

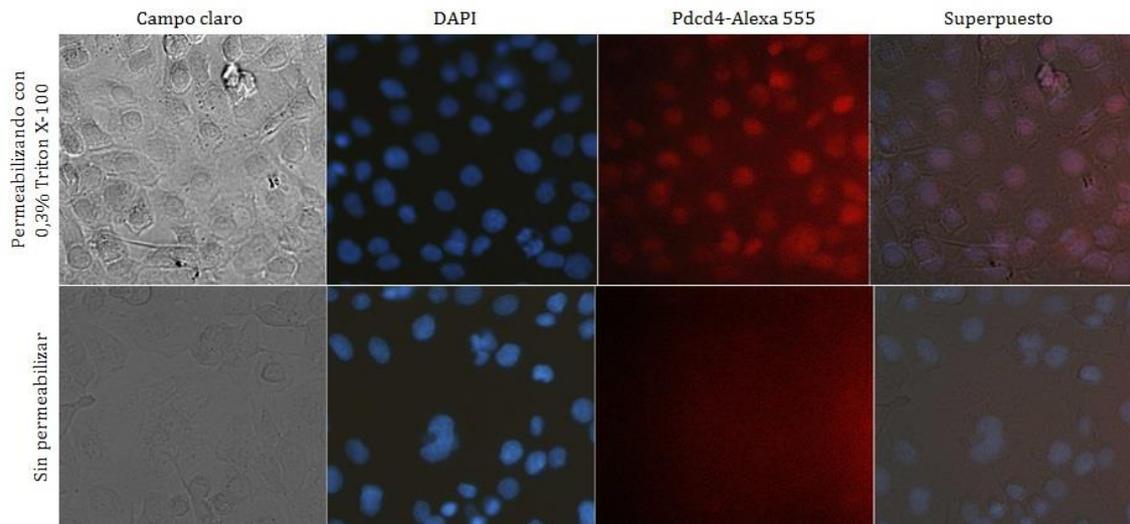
Por otro lado, los resultados obtenidos con el plásmido mutante en el sitio predicho de unión a miR-183, tanto en el ensayo con el mimmic como con el inhibidor, muestran que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la señal del reportero con respecto a cada control. Estas observaciones indican que la regulación se da a través del sitio predictivo ensayado.

En conjunto, estos datos son una clara evidencia a favor de la regulación directa y sitio específica de *pdcd4* por *hsa-miR-183-5p* en este contexto celular.

### Inmunofluorescencia de PDCD4

El hecho de obtener evidencias a favor de la interacción entre miR-183 y la 3'UTR de *PDCD4* mediante ensayos de genes reporteros no asegura que esta conduzca a una inhibición de la expresión de la proteína PDCD4 endógena con su ARNm completo. Para esto, es necesario hacer un estudio más profundo con el objetivo de verificar que realmente esa interacción genera un cambio a nivel de la proteína, que en definitiva, es el resultado final del flujo de la información genética.

En función de la controversia existente en la literatura sobre la localización subcelular de PDCD4, decidimos en una primera instancia probar los protocolos de inmunocitoquímica, con el fin de encontrar la condición en la cual la marcación de PDCD4 se logra de manera específica: un protocolo sin un paso de permeabilización y otro protocolo con 0,3% de Tritón X-100. Los resultados muestran que solo se marcó PDCD4 cuando se utilizó el segundo protocolo y, a su vez, que este presenta una localización predominantemente nuclear, tal como está reportado en la literatura para próstata (**Figura 30**). En virtud de este resultado, decidimos utilizar en adelante el paso de permeabilización para poder cuantificar PDCD4 nuclear, ya que es donde se encuentra predominantemente. Si bien existen varios métodos para cuantificar proteínas, y el ensayo de *western blot* es uno de los más aceptados en la literatura, nosotros utilizamos aquí la cuantificación por microscopía, dado que resulta mucho más económica y permite tener una mejor idea de la variabilidad célula a célula, que otorga un mayor peso estadístico, e incluso permite diferenciar en los compartimientos sub-celulares.

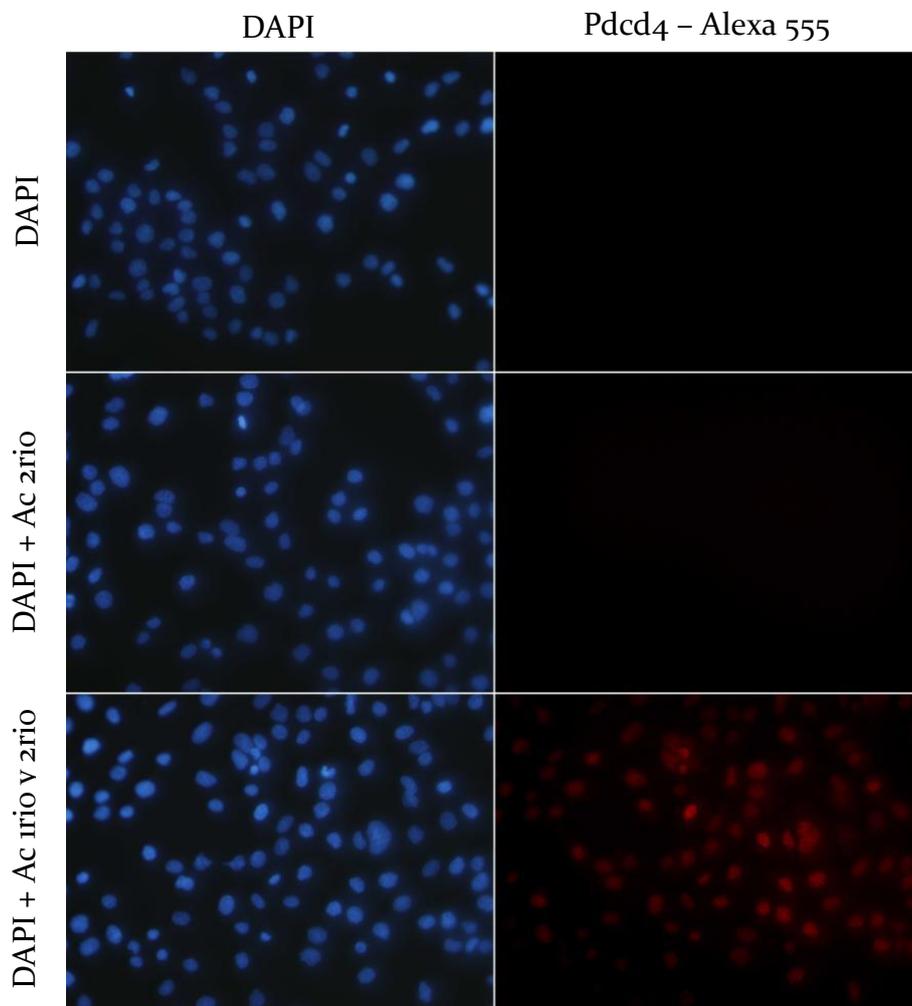


**Figura 30.** Inmunofluorescencia de cultivos de la línea celular DU145 con y sin permeabilización, usando un anticuerpo primario específico contra pcd4 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa555 (panel de arriba y abajo respectivamente). Se muestra un campo representativo con imágenes tomadas con el objetivo 40x en campo claro, azul (DAPI), rojo (Alexa 555) y la superposición de las tres imágenes.

Con el objetivo entonces de determinar si el nivel de la proteína pcd4 endógena de DU145 se ve afectado por hsa-miR-183.5p, se realizaron las transfecciones con el mimmic, inhibidor y controles de miR-183 y se dejó en incubadora por 72 horas. A todas las mezclas de transfección se les adicionó siGLO *Green Transfection Indicator* con la finalidad de visualizar las células transfectadas. Pasado este tiempo, las células fueron fijadas y marcadas con el protocolo con permeabilizante anteriormente descrito y luego teñidas con DAPI. Se tomaron fotos de 4 campos representativos por pocillo, resultando en un total de 12 fotos por condición, y se cuantificó en las fotografías la intensidad nuclear de las tres señales: DAPI, Pcd4-Alexa 555 y siGLO *Green*. En la **Figura 31** se muestra las tres fotos tomadas de un campo representativo. Adicionalmente, se realizaron controles que verificaron que la señal de Pcd4 era específica con los filtros que presentaba el microscopio, así como también la especificidad del anticuerpo secundario (**Figura 32**).



**Figura 31.** Inmunofluorescencia de cultivos de la línea celular DU145 transfectada con el mimmic de hsa-miR-183-5p y SiGLO *Green Transfection Indicator* (que se excita a 494 nm) usando un anticuerpo primario específico contra PDCD4 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa555. Se muestra un campo representativo, con imágenes tomadas con el objetivo 40x usando los filtros para azul (DAPI), rojo (Alexa 555), verde (SiGLO).

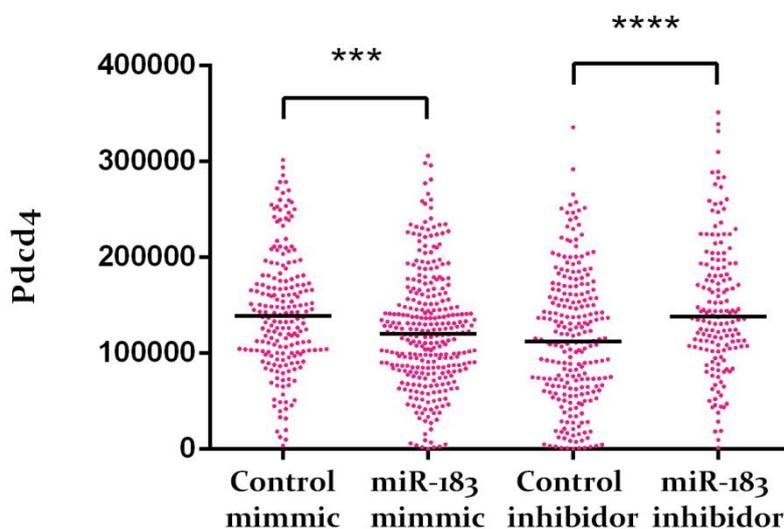


**Figura 32.** Inmunofluorescencia de cultivos de la línea celular DU145 usando un anticuerpo primario específico contra PDCD4 y un anticuerpo secundario conjugado a Alexa555. Se realizó tinción: Panel superior: DAPI, Panel intermedio: DAPI y anticuerpo secundario, Panel inferior: DAPI con anticuerpo

primario y secundario. Se muestra un campo representativo para cada experimento, con imágenes tomadas con el objetivo 40x usando los filtros para azul (DAPI) y rojo (Alexa 555).

La distribución de la intensidad de PDCD4 obtenida para cada condición se muestra en la **Figura 33**. Es importante notar que esta técnica presenta una variabilidad intrínseca producto de la diferencia de foco en la que se encuentra cada célula, a pesar de que las fotos se tomaron con la precaución de mantener la mayor cantidad de núcleos posibles en foco. Sin embargo, como todas las fotos se tomaron en las mismas condiciones y se registró un importante número de núcleos (mayor a 150 en todas las condiciones), fue posible obtener resultados concluyentes.

Como se puede observar, las células transfectadas con el mimmic de miR-183 muestran una disminución estadísticamente significativa de la intensidad de PDCD4, con un p-valor de 0,0004. Así mismo, las células transfectadas con el inhibidor muestran un aumento estadísticamente significativo de la intensidad de pdc4, con un p-valor de < 0,0001.



**Figura 33** Efecto de hsa-miR-183-5p en pdc4 producida de manera endógena en la línea celular DU145. Se observa la distribución de los datos de intensidad de pdc4 de células transfectadas con el mimmic de miR-183 y su control, y con el inhibidor de miR-183 y su control. Se observa la mediana de la distribución y la significancia estadística de la variación.

La alta significancia estadística obtenida, en contraste con la obtenida en los ensayos de reportero, se puede explicar por la ventaja de esta metodología de permitir evaluar

el comportamiento célula a célula, en comparación con los ensayos de genes reporteros, en el que se evalúa la totalidad de las células en conjunto.

Estos resultados apoyan los resultados obtenidos con los genes reporteros en el apartado anterior, indicando que la interacción de miR-183 con la 3'UTR de *PDCD4* efectivamente produce un cambio a nivel de la proteína endógena en esta línea celular, validando así al gen *PDCD4* como blanco directo de miR-183 en este modelo.

# CONCLUSIONES

---

Se pusieron a punto los ensayos de transfección en las líneas celulares LNCaP y DU145 para la co-transfección de los plásmidos reporteros junto con ARNs funcionales.

Se demostró que la secuencia complementaria a la semilla de miR-183 presente en la región 3'UTR del ARNm de PDCD4 es probablemente responsable de la inhibición de la actividad reportera por miR-183, en la línea celular DU145.

Por otro lado, se demostró que hsa-miR-183-5p es capaz de inhibir la expresión de la proteína PDCD4 endógena en la línea celular DU145.

Estos resultados muestran evidencias a favor de la regulación directa de PDCD4 por hsa-miR-183-5p, por la interacción directa con la secuencia de unión predicha en la región 3'-UTR de su ARNm.

# BIBLIOGRAFÍA

---

- Acunzo, M., G. Romano, D. Wernicke and C. M. Croce (2015). "MicroRNA and cancer--a brief overview." Adv Biol Regul **57**: 1-9.
- Bader, A. G., D. Brown and M. Winkler (2010). "The promise of microRNA replacement therapy." Cancer Res **70**(18): 7027-7030.
- Biyanee, A., P. Singh and K. H. Klemptner (2015). "Translation, Pdc4 and eIF4A." Oncoscience **2**(9): 731-732.
- Bohm, M., K. Sawicka, J. P. Siebrasse, A. Brehmer-Fastnacht, R. Peters and K. H. Klemptner (2003). "The transformation suppressor protein Pdc4 shuttles between nucleus and cytoplasm and binds RNA." Oncogene **22**(31): 4905-4910.
- Bostrom, P. J., A. S. Bjartell, J. W. Catto, S. E. Eggen, H. Lilja, S. Loeb, J. Schalken, T. Schlomm and M. R. Cooperberg (2015). "Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer." Eur Urol **68**(6): 1033-1044.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15524-15529.
- Cannistraci, A., A. L. Di Pace, R. De Maria and D. Bonci (2014). "MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples." Biomed Res Int **2014**: 146170.
- Costa, P. M. and M. C. Pedroso de Lima (2013). "MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression." Pharmaceuticals (Basel) **6**(10): 1195-1220.
- Crawford, D. V., K.; D. Shore, N. (2015). "New Biomarkers in Prostate Cancer." Oncology Journal.
- Chen, C., H. Xiang, Y. L. Peng, J. Peng and S. W. Jiang (2014). "Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway by targeting LRP6." Cell Signal **26**(6): 1155-1165.
- Chen, J., L. Gu, J. Ni, P. Hu, K. Hu and Y. L. Shi (2015). "MiR-183 Regulates ITGB1P Expression and Promotes Invasion of Endometrial Stromal Cells." Biomed Res Int **2015**: 340218.
- Dai, R., S. McReynolds, T. Leroith, B. Heid, Z. Liang and S. A. Ahmed (2013). "Sex differences in the expression of lupus-associated miRNAs in splenocytes from lupus-prone NZB/WF1 mice." Biol Sex Differ **4**(1): 19.
- Dai, R., Y. Zhang, D. Khan, B. Heid, D. Caudell, O. Crasta and S. A. Ahmed (2010). "Identification of a common lupus disease-associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus." PLoS One **5**(12): e14302.
- Dambal, S., M. Shah, B. Mihelich and L. Nonn (2015). "The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together." Nucleic Acids Res **43**(15): 7173-7188.
- Dang, C. V. (1999). "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." Mol Cell Biol **19**(1): 1-11.
- Dorrello, N. V., A. Peschiaroli, D. Guardavaccaro, N. H. Colburn, N. E. Sherman and M. Pagano (2006). "S6K1- and betaTRCP-mediated degradation of PDCD4 promotes protein translation and cell growth." Science **314**(5798): 467-471.
- Esfahani, M., N. Ataei and M. Panjehpour (2015). "Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis." Asian Pac J Cancer Prev **16**(7): 2601-2611.
- Farkas, A., S. Marcella and G. G. Rhoads (2000). "Ethnic and racial differences in prostate cancer incidence and mortality." Ethn Dis **10**(1): 69-75.

- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.
- Filella, X. and L. Foj (2015). "Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer." Clin Chem Lab Med **53**(7): 963-973.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res **19**(1): 92-105.
- Gokhale, A., R. Kunder, A. Goel, R. Sarin, A. Moiyadi, A. Shenoy, C. Mamidipally, S. Noronha, S. Kannan and N. V. Shirsat (2010). "Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway." J Cancer Res Ther **6**(4): 521-529.
- Gregory, P. A., C. P. Bracken, A. G. Bert and G. J. Goodall (2008). "MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition." Cell Cycle **7**(20): 3112-3118.
- Guttilla, I. K. and B. A. White (2009). "Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells." J Biol Chem **284**(35): 23204-23216.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." Cancer Cell **21**(3): 309-322.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hanke, M., K. Hoefig, H. Merz, A. C. Feller, I. Kausch, D. Jocham, J. M. Warnecke and G. Sczakiel (2010). "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer." Urol Oncol **28**(6): 655-661.
- Hayes, J., P. P. Peruzzi and S. Lawler (2014). "MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy." Trends Mol Med **20**(8): 460-469.
- Hickman, E. S., M. C. Moroni and K. Helin (2002). "The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 60-66.
- Hirata, H., K. Ueno, V. Shahryari, G. Deng, Y. Tanaka, Z. L. Tabatabai, Y. Hinoda and R. Dahiya (2013). "MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer." PLoS One **8**(1): e55502.
- Hwang, S. K., A. R. Baker, M. R. Young and N. H. Colburn (2014). "Tumor suppressor PDCD4 inhibits NF-kappaB-dependent transcription in human glioblastoma cells by direct interaction with p65." Carcinogenesis **35**(7): 1469-1480.
- Jiang, L., P. Mao, L. Song, J. Wu, J. Huang, C. Lin, J. Yuan, L. Qu, S. Y. Cheng and J. Li (2010). "miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival." Am J Pathol **177**(1): 29-38.
- Kang, M. J., H. S. Ahn, J. Y. Lee, S. Matsushashi and W. Y. Park (2002). "Up-regulation of PDCD4 in senescent human diploid fibroblasts." Biochem Biophys Res Commun **293**(1): 617-621.
- Kent, O. A. and J. T. Mendell (2006). "A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes." Oncogene **25**(46): 6188-6196.
- Khanmi, K., S. Ignacimuthu and M. G. Paulraj (2015). "MicroRNA in prostate cancer." Clin Chim Acta.
- Kral, M., V. Rosinska, V. Student, M. Grepl, M. Hrabec and J. Bouchal (2011). "Genetic determinants of prostate cancer: a review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(1): 3-9.
- Kye, M. J., E. D. Niederst, M. H. Wertz, C. Goncalves Ido, B. Akten, K. Z. Dover, M. Peters, M. Riessland, P. Neveu, B. Wirth, K. S. Kosik, S. P. Sardi, U. R. Monani, M. A. Passini and M. Sahin (2014). "SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway." Hum Mol Genet **23**(23): 6318-6331.
- Lankat-Buttgereit, B. and R. Goke (2009). "The tumour suppressor Pcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation." Biol Cell **101**(6): 309-317.
- Larkin, S. E., B. Zeidan, M. G. Taylor, B. Bickers, J. Al-Ruwaili, C. Aukim-Hastie and P. A. Townsend (2010). "Proteomics in prostate cancer biomarker discovery." Expert Rev Proteomics **7**(1): 93-102.

- Larne, O., E. Martens-Uzunova, Z. Hagman, A. Edsjo, G. Lippolis, M. S. den Berg, A. Bjartell, G. Jenster and Y. Ceder (2013). "miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer." Int J Cancer **132**(12): 2867-2875.
- Lawrie, C. H., S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A. H. Banham, F. Pezzella, J. Boulwood, J. S. Wainscoat, C. S. Hatton and A. L. Harris (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma." Br J Haematol **141**(5): 672-675.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Leon, J., I. Guerrero and A. Pellicer (1987). "Differential expression of the *ras* gene family in mice." Mol Cell Biol **7**(4): 1535-1540.
- Li, G., C. Luna, J. Qiu, D. L. Epstein and P. Gonzalez (2010). "Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183." J Biol Chem **285**(8): 5461-5471.
- Li, J., H. Fu, C. Xu, Y. Tie, R. Xing, J. Zhu, Y. Qin, Z. Sun and X. Zheng (2010). "miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells." BMC Cancer **10**: 354.
- Li, J., S. Liang, H. Jin, C. Xu, D. Ma and X. Lu (2012). "Tiam1, negatively regulated by miR-22, miR-183 and miR-31, is involved in migration, invasion and viability of ovarian cancer cells." Oncol Rep **27**(6): 1835-1842.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe and K. Hemminki (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.
- Lin, H., T. Dai, H. Xiong, X. Zhao, X. Chen, C. Yu, J. Li, X. Wang and L. Song (2010). "Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a." PLoS One **5**(12): e15797.
- Liu, A. M., T. J. Yao, W. Wang, K. F. Wong, N. P. Lee, S. T. Fan, R. T. Poon, C. Gao and J. M. Luk (2012). "Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study." BMJ Open **2**(2): e000825.
- Liu, J., M. Zheng, Y. L. Tang, X. H. Liang and Q. Yang (2011). "MicroRNAs, an active and versatile group in cancers." Int J Oral Sci **3**(4): 165-175.
- Lodrini, M., I. Oehme, C. Schroeder, T. Milde, M. C. Schier, A. Kopp-Schneider, J. H. Schulte, M. Fischer, K. De Preter, F. Pattyn, M. Castoldi, M. U. Muckenthaler, A. E. Kulozik, F. Westermann, O. Witt and H. E. Deubzer (2013). "MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma." Nucleic Acids Res **41**(12): 6018-6033.
- Lowery, A. J., N. Miller, R. M. Dwyer and M. J. Kerin (2010). "Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells." BMC Cancer **10**: 502.
- Lu, Y. Y., J. Y. Zheng, J. Liu, C. L. Huang, W. Zhang and Y. Zeng (2015). "miR-183 induces cell proliferation, migration, and invasion by regulating PDCD4 expression in the SW1990 pancreatic cancer cell line." Biomed Pharmacother **70**: 151-157.
- Lynam-Lennon, N., S. G. Maher and J. V. Reynolds (2009). "The roles of microRNA in cancer and apoptosis." Biol Rev Camb Philos Soc **84**(1): 55-71.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years." Nat Rev Cancer **3**(6): 459-465.
- Martens-Uzunova, E. S., S. E. Jalava, N. F. Dits, G. J. van Leenders, S. Moller, J. Trapman, C. H. Bangma, T. Litman, T. Visakorpi and G. Jenster (2012). "Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer." Oncogene **31**(8): 978-991.
- Mihelich, B. L., E. A. Khramtsova, N. Arva, A. Vaishnav, D. N. Johnson, A. A. Giangreco, E. Martens-Uzunova, O. Bagasra, A. Kajdacsy-Balla and L. Nonn (2011). "miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells." J Biol Chem **286**(52): 44503-44511.

- Monteys, A. M., R. M. Spengler, J. Wan, L. Tecedor, K. A. Lennox, Y. Xing and B. L. Davidson (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." *RNA* **16**(3): 495-505.
- Myatt, S. S., J. Wang, L. J. Monteiro, M. Christian, K. K. Ho, L. Fusi, R. E. Dina, J. J. Brosens, S. Ghaem-Maghani and E. W. Lam (2010). "Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer." *Cancer Res* **70**(1): 367-377.
- Nwosu, V., J. Carpten, J. M. Trent and R. Sheridan (2001). "Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease." *Hum Mol Genet* **10**(20): 2313-2318.
- Ohtsuka, M., H. Ling, Y. Doki, M. Mori and G. A. Calin (2015). "MicroRNA Processing and Human Cancer." *J Clin Med* **4**(8): 1651-1667.
- Ottati, C. (2014). Estudio de hsa-miR-183-5p en cáncer de próstata e identificación de sus blancos de acción. Master PEDECIBA, Area Ciencias Biológicas, Sub-area Biología Molecular y Molecular, Universidad de la República.
- Pierce, G. B., R. H. Shikes and L. M. Fink (1978). Cancer: A Problem of Developmental Biology, Prentice-Hall.
- Porkka, K. P., M. J. Pfeiffer, K. K. Waltering, R. L. Vessella, T. L. Tammela and T. Visakorpi (2007). "MicroRNA expression profiling in prostate cancer." *Cancer Res* **67**(13): 6130-6135.
- Pritchard, C. C., H. H. Cheng and M. Tewari (2012). "MicroRNA profiling: approaches and considerations." *Nat Rev Genet* **13**(5): 358-369.
- Ragan, C., M. Zuker and M. A. Ragan (2011). "Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations." *PLoS Comput Biol* **7**(2): e1001090.
- Ren, L. H., W. X. Chen, S. Li, X. Y. He, Z. M. Zhang, M. Li, R. S. Cao, B. Hao, H. J. Zhang, H. Q. Qiu and R. H. Shi (2014). "MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4." *Br J Cancer* **111**(10): 2003-2013.
- Sanchez-Mora, C., J. A. Ramos-Quiroga, I. Garcia-Martinez, N. Fernandez-Castillo, R. Bosch, V. Richarte, G. Palomar, M. Nogueira, M. Corrales, C. Daigre, N. Martinez-Luna, L. Grau-Lopez, C. Toma, B. Cormand, C. Roncero, M. Casas and M. Ribases (2013). "Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs)." *Eur Neuropsychopharmacol* **23**(11): 1463-1473.
- Sarver, A. L., A. J. French, P. M. Borralho, V. Thayanithy, A. L. Oberg, K. A. Silverstein, B. W. Morlan, S. M. Riska, L. A. Boardman, J. M. Cunningham, S. Subramanian, L. Wang, T. C. Smyrk, C. M. Rodrigues, S. N. Thibodeau and C. J. Steer (2009). "Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states." *BMC Cancer* **9**: 401.
- Schaefer, A., M. Jung, H. J. Mollenkopf, I. Wagner, C. Stephan, F. Jentzmik, K. Miller, M. Lein, G. Kristiansen and K. Jung (2010). "Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma." *Int J Cancer* **126**(5): 1166-1176.
- Shibahara, K., M. Asano, Y. Ishida, T. Aoki, T. Koike and T. Honjo (1995). "Isolation of a novel mouse gene MA-3 that is induced upon programmed cell death." *Gene* **166**(2): 297-301.
- Shiota, M., H. Izumi, A. Tanimoto, M. Takahashi, N. Miyamoto, E. Kashiwagi, A. Kidani, G. Hirano, D. Masubuchi, Y. Fukunaka, Y. Yasuniwa, S. Naito, S. Nishizawa, Y. Sasaguri and K. Kohno (2009). "Programmed cell death protein 4 down-regulates Y-box binding protein-1 expression via a direct interaction with Twist1 to suppress cancer cell growth." *Cancer Res* **69**(7): 3148-3156.
- Song, L., L. Liu, Z. Wu, Y. Li, Z. Ying, C. Lin, J. Wu, B. Hu, S. Y. Cheng, M. Li and J. Li (2012). "TGF-beta induces miR-182 to sustain NF-kappaB activation in glioma subsets." *J Clin Invest* **122**(10): 3563-3578.
- Stephan, C., M. Jung, S. Rabenhorst, E. Kilic and K. Jung (2015). "Urinary miR-183 and miR-205 do not surpass PCA3 in urine as predictive markers for prostate biopsy outcome despite their highly dysregulated expression in prostate cancer tissue." *Clin Chem Lab Med* **53**(7): 1109-1118.

Tanaka, H., T. Sasayama, K. Tanaka, S. Nakamizo, M. Nishihara, K. Mizukawa, M. Kohta, J. Koyama, S. Miyake, M. Taniguchi, K. Hosoda and E. Kohmura (2013). "MicroRNA-183 upregulates HIF-1alpha by targeting isocitrate dehydrogenase 2 (IDH2) in glioma cells." *J Neurooncol* **111**(3): 273-283.

Tarasov, V., P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister and H. Hermeking (2007). "Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest." *Cell Cycle* **6**(13): 1586-1593.

Trang, P., P. P. Medina, J. F. Wiggins, L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, R. Homer, D. Brown, A. G. Bader, J. B. Weidhaas and F. J. Slack (2010). "Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA." *Oncogene* **29**(11): 1580-1587.

Tsuchiyama, K., H. Ito, M. Taga, S. Naganuma, Y. Oshinoya, K. Nagano, O. Yokoyama and H. Itoh (2013). "Expression of microRNAs associated with Gleason grading system in prostate cancer: miR-182-5p is a useful marker for high grade prostate cancer." *Prostate* **73**(8): 827-834.

Ubhi, K., E. Rockenstein, C. Kragh, C. Inglis, B. Spencer, S. Michael, M. Mante, A. Adame, D. Galasko and E. Masliah (2014). "Widespread microRNA dysregulation in multiple system atrophy - disease-related alteration in miR-96." *Eur J Neurosci* **39**(6): 1026-1041.

Ueno, K., H. Hirata, V. Shahryari, G. Deng, Y. Tanaka, Z. L. Tabatabai, Y. Hinoda and R. Dahiya (2013). "microRNA-183 is an oncogene targeting Dkk-3 and SMAD4 in prostate cancer." *Br J Cancer* **108**(8): 1659-1667.

Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris and C. M. Croce (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(7): 2257-2261.

Wallace, T. A., R. L. Prueitt, M. Yi, T. M. Howe, J. W. Gillespie, H. G. Yfantis, R. M. Stephens, N. E. Caporaso, C. A. Loffredo and S. Ambs (2008). "Tumor immunobiological differences in prostate cancer between African-American and European-American men." *Cancer Res* **68**(3): 927-936.

Wang, G., W. Mao and S. Zheng (2008). "MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells." *FEBS Lett* **582**(25-26): 3663-3668.

Wang, J., J. Li, J. Shen, C. Wang, L. Yang and X. Zhang (2012). "MicroRNA-182 downregulates metastasis suppressor 1 and contributes to metastasis of hepatocellular carcinoma." *BMC Cancer* **12**: 227.

Wang, J., X. Wang, Z. Li, H. Liu and Y. Teng (2014). "MicroRNA-183 suppresses retinoblastoma cell growth, invasion and migration by targeting LRP6." *FEBS J* **281**(5): 1355-1365.

Wang, W., J. Li, W. Zhu, C. Gao, R. Jiang, W. Li, Q. Hu and B. Zhang (2014). "MicroRNA-21 and the clinical outcomes of various carcinomas: a systematic review and meta-analysis." *BMC Cancer* **14**: 819.

Waters, L. C., S. L. Strong, E. Ferlemann, O. Oka, F. W. Muskett, V. Veverka, S. Banerjee, T. Schmedt, A. J. Henry, K. H. Klemptner and M. D. Carr (2011). "Structure of the tandem MA-3 region of Pdc4 protein and characterization of its interactions with eIF4A and eIF4G: molecular mechanisms of a tumor suppressor." *J Biol Chem* **286**(19): 17270-17280.

Weeraratne, S. D., V. Amani, N. Teider, J. Pierre-Francois, D. Winter, M. J. Kye, S. Sengupta, T. Archer, M. Remke, A. H. Bai, P. Warren, S. M. Pfister, J. A. Steen, S. L. Pomeroy and Y. J. Cho (2012). "Pleiotropic effects of miR-183~96~182 converge to regulate cell survival, proliferation and migration in medulloblastoma." *Acta Neuropathol* **123**(4): 539-552.

Wei, C., H. Song, X. Sun, D. Li, J. Song, K. Hua and L. Fang (2015). "miR-183 regulates biological behavior in papillary thyroid carcinoma by targeting the programmed cell death 4." *Oncol Rep* **34**(1): 211-220.

Wellner, U., J. Schubert, U. C. Burk, O. Schmalhofer, F. Zhu, A. Sonntag, B. Waldvogel, C. Vannier, D. Darling, A. zur Hausen, V. G. Brunton, J. Morton, O. Sansom, J. Schuler, M. P. Stemmler, C. Herzberger, U. Hopt, T. Keck, S. Brabletz and T. Brabletz (2009). "The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs." *Nat Cell Biol* **11**(12): 1487-1495.

Wigington, C. P., J. Jung, E. A. Rye, S. L. Belaret, A. M. Philpot, Y. Feng, P. J. Santangelo and A. H. Corbett (2015). "Post-transcriptional regulation of programmed cell death 4 (PDCD4) mRNA by the RNA-

binding proteins human antigen R (HuR) and T-cell intracellular antigen 1 (TIA1)." *J Biol Chem* **290**(6): 3468-3487.

Xu, J. and C. Wong (2008). "A computational screen for mouse signaling pathways targeted by microRNA clusters." *RNA* **14**(7): 1276-1283.

Xu, K., S. Rajagopal, I. Klebba, S. Dong, Y. Ji, J. Liu, C. Kuperwasser, J. A. Garlick, S. P. Naber and R. J. Buchsbaum (2010). "The role of fibroblast Tiam1 in tumor cell invasion and metastasis." *Oncogene* **29**(50): 6533-6542.

Xu, S., P. D. Witmer, S. Lumayag, B. Kovacs and D. Valle (2007). "MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster." *J Biol Chem* **282**(34): 25053-25066.

Xu, X. M., J. C. Qian, Z. L. Deng, Z. Cai, T. Tang, P. Wang, K. H. Zhang and J. P. Cai (2012). "Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer." *Oncol Lett* **4**(2): 339-345.

Yamada, Y., H. Enokida, S. Kojima, K. Kawakami, T. Chiyomaru, S. Tatarano, H. Yoshino, K. Kawahara, K. Nishiyama, N. Seki and M. Nakagawa (2011). "MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology." *Cancer Sci* **102**(3): 522-529.

Yan, Z., J. Wang, C. Wang, Y. Jiao, W. Qi and S. Che (2014). "miR-96/HBP1/Wnt/beta-catenin regulatory circuitry promotes glioma growth." *FEBS Lett* **588**(17): 3038-3046.

Yu, H., Y. Liu, L. Bai, A. Kijlstra and P. Yang (2014). "Predisposition to Behcet's disease and VKH syndrome by genetic variants of miR-182." *J Mol Med (Berl)* **92**(9): 961-967.

Zhang, H., I. Ozaki, T. Mizuta, H. Hamajima, T. Yasutake, Y. Eguchi, H. Ideguchi, K. Yamamoto and S. Matsuhashi (2006). "Involvement of programmed cell death 4 in transforming growth factor-beta1-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma." *Oncogene* **25**(45): 6101-6112.

Zhang, Q. H., H. M. Sun, R. Z. Zheng, Y. C. Li, Q. Zhang, P. Cheng, Z. H. Tang and F. Huang (2013). "Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues." *Gene* **527**(1): 26-32.

Zhou, T., G. J. Zhang, H. Zhou, H. X. Xiao and Y. Li (2014). "Overexpression of microRNA-183 in human colorectal cancer and its clinical significance." *Eur J Gastroenterol Hepatol* **26**(2): 229-233.

Zhu, J., Y. Feng, Z. Ke, Z. Yang, J. Zhou, X. Huang and L. Wang (2012). "Down-regulation of miR-183 promotes migration and invasion of osteosarcoma by targeting Ezrin." *Am J Pathol* **180**(6): 2440-2451.