



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS**

Tesis para optar al Título de Licenciado en Bioquímica

**EFFECTO DE LA ACUMULACIÓN DE AGE_s EN LA
MEMBRANA BASAL SOBRE LOS ACINOS
PROSTÁTICOS GLANDULARES**

CLAUDIA CHIALE

Tutor: Dra. Mercedes Rodríguez-Teja
Departamento de Genética, Facultad de Medicina

Montevideo, Uruguay
2017

PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

EL TRIBUNAL DOCENTE INTEGRADO POR LOS ABAJO

FIRMANTES APRUEBA LA TESIS DE INVESTIGACIÓN:

Título

Efecto de la acumulación de AGEs en la membrana basal sobre los acinos prostáticos glandulares

Autor

Claudia Chiale

Tutor

Mercedes Rodríguez-Teja

Carrera

Licenciatura en Bioquímica

Puntaje

Tribunal

Profesor: Dra. Silvana Pereyra
(Nombre y firma)

Fecha

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y mi hermana, que me brindaron su cariño, comprensión y apoyo durante toda la carrera.

A mis amigas del liceo, y escuela que estuvieron conmigo siempre, aguantando mi locura y siempre dándome para adelante.

A mis amigos de facultad, que hicieron esta carrera mucho más linda y llevadera, sin ellos no hubiera sido lo mismo.

A Checha, por aceptarme en su laboratorio y hacerme parte de él, siempre estando dispuesta a enseñarme y ayudarme en lo que necesitara.

A Guille, que estuvo ahí para ayudarme en el comienzo en el laboratorio, las dos Fer, que también hicieron que los momentos de trabajo fueron más amenos y llevaderos.

A todos los que día a día me acompañaron, y recorrieron este camino conmigo, siendo parte de él de una forma u otra y que definitivamente la hicieron más agradable.

Figura de la carátula- imagen de microscopia de contraste de cultivos en 3D de acinos glandulares prostáticos obtenida en nuestro laboratorio durante la realización de este trabajo. Objetivo 20X.

ÍNDICE

INDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE TABLAS.....	V
ABREVIATURAS.....	VI
RESUMEN.....	VIII
1. INTRODUCCIÓN	10
1.1. GENERALIDADES DEL CÁNCER.....	10
1.2. LA GLÁNDULA PROSTÁTICA.....	15
1.3. CÁNCER DE PRÓSTATA.....	17
1.4. PRODUCTOS FINALES DE GLICACIÓN AVANZADA (AGEs)	20
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	26
2.1. HIPÓTESIS	26
2.2. OBJETIVO GENERAL	26
2.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3. MATERIALES Y MÉTODOS	28
3.1. LÍNEA CELULAR.....	28
3.2. PRODUCCIÓN DE MEMBRANA BASAL RICA EN AGEs Y CULTIVO CELULAR EN 3D.	29
3.3. EXTRACCIÓN DE ARNM TOTAL.....	31
3.4. RETRO-TRANSCRIPCIÓN	34
3.5. DISEÑO DE CEBADORES	35
3.6. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (qPCR)	38
3.7. CÁLCULO DE LA EXPRESIÓN RELATIVA MEDIANTE EL ALGORITMO $\Delta\Delta Cq$	40
3.8. CÁLCULO DE LA EXPRESIÓN RELATIVA MEDIANTE EL ALGORITMO DE PFAFFL	40
3.9. CÁLCULO DE LA EXPRESIÓN RELATIVA UTILIZANDO EL SOFTWARE REST	41
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
4.1. SELECCIÓN DE CEBADORES PARA LOS GENES BLANCO Y DE REFERENCIA	43
4.2. CÁLCULO DEL CAMBIO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE EL MÉTODO $\Delta\Delta Cq$	57
4.3. CÁLCULO CAMBIO EN LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE EL MÉTODO DE PFAFFL	68

4.4. CÁLCULO DE LA EXPRESIÓN RELATIVA UTILIZANDO EL SOFTWARE REST.....	73
5. CONCLUSIONES.....	77
6. BIBLIOGRAFÍA	80
ANEXO I- SOLUCIONES.....	85
ANEXO II- REACTIVOS Y FUNGIBLES	86
ANEXO III- FIGURAS SUPLEMENTARIAS	87

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1- ESQUEMATIZACIÓN DE LOS DIFERENTES TIPOS DE EMT.....	11
FIGURA 2- GLÁNDULA PROSTÁTICA	16
FIGURA 3- ESQUEMA DEL PROCESO DE DESARROLLO DE UNA METÁSTASIS EN CÁNCER DE PROSTATA.....	17
FIGURA 4- TASA DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD DE LOS DIFERENTES TIPOS DE CÁNCER EN URUGUAY (2009-2013). 18	
FIGURA 5- VÍAS DE FORMACIÓN DE AGES.....	20
FIGURA 6- GENERACIÓN DE CULTIVOS EN 3D.	31
FIGURA 7- PAR DE CEBADORES SELECCIONADOS PARA LOS GENES DE REFERENCIA GAPDH Y β ACTINA.....	50
FIGURA 8- PAREJAS DE CEBADORES SELECCIONADAS PARA AMPLIFICAR ECADERINA, β 1INTEGRINA Y MLC2.....	53
FIGURA 9- PAREJAS DE CEBADORES SELECCIONADAS PARA AMPLIFICAR NCADERINA, SNAI1 Y SNAI2.....	56
FIGURA 10 – EL TRATAMIENTO DE LA MBR CON GLICOLALDEHÍDO NO AFECTA LA EXPRESIÓN DE LOS DE LOS GENES DE REFERENCIA GAPDH Y β ACTINA.....	59
FIGURA 11– COMPARACIÓN DE LOS VALORES DE CT PROMEDIO DE LAS RÉPLICAS EXPERIMENTALES OBTENIDOS EN CADA CULTIVO.....	63
FIGURA 12- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BLANCO EN CULTIVOS RICOS EN AGES VERSUS NATIVOS (MÉTODO 2- $\Delta\Delta$ CT).	66
FIGURA 13- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BLANCO EN CULTIVOS RICOS EN AGES VERSUS NATIVOS (MÉTODO PFAFFL).	70
FIGURA 14- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BLANCOS OBTENIDA MEDIANTE EL PROGRAMA REST 2009.	75
FIGURA 15- PAREJAS DE CEBADORES NO SELECCIONADOS PARA AMPLIFICAR ACTINA Y GAPDH.....	87
FIGURA 16- PAREJAS DE CEBADORES PARA AMPLIFICAR TBP.	88

FIGURA 17- PAREJAS DE CEBADORES NO SELECCIONADOS PARA AMPLIFICAR ECADERINA	89
FIGURA 18 PAREJAS DE CEBADORES NO SELECCIONADOS PARA AMPLIFICAR B INTEGRINA 1	90
FIGURA 19- ESQUEMATIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS SETS DE PRIMERS A LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE LOS GENES BLANCO, ECADERINA, NCADERINA, SNAI1, SNAI2, MLC2 Y B1 INTEGRINA	91
FIGURA 20- ESQUEMATIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS SETS DE PRIMERS A LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE LOS POSIBLES GENES DE REFERENCIA, β ACTINA, GAPDH Y TBP	92
FIGURA 21- ESQUEMATIZACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS PRIMERS SELECCIONADOS A LAS DIFERENTES ISOFORMAS DE LOS GENES BLANCO Y DE REFERENCIA, ACTINA, GAPDH, ECADERINA, NCADERINA, SNAI1, SNAI2, MLC2 Y B INTEGRINA	93

INDICE DE TABLAS

TABLA 1- TASAS DE INCIDENCIA Y MORTALIDAD ESPECIFICA POR EDAD	19
TABLA 2- CLASIFICACIÓN DE LOS DISTINTOS TIPOS DE AGES	22
TABLA 3- CARACTERÍSTICAS DE CÉLULAS RWPE-1 (ATCC® # CRL-11609™)	29
TABLA 4- DESCRIPCIÓN DE LAS CONDICIONES UTILIZADAS PARA EL DISEÑO DE LOS CEBADORES	35
TABLA 5- NÚMERO DE ACCESO DE LOS GENES DE REFERENCIA Y BLANCO ESTUDIADOS Y LAS ISOFORMAS DE LOS ADNC CORRESPONDIENTES	37
TABLA 6- CEBADORES DISEÑADOS PARA LOS GENES BLANCO	46
TABLA 7- CEBADORES DISEÑADOS PARA LOS GENES DE REFERENCIA	47
TABLA 8- INFORMACIÓN DE LA CALIDAD DEL ARN DE LOS DIFERENTES CULTIVOS	60
TABLA 9- EFICIENCIAS DE AMPLIFICACIÓN DE LAS PAREJAS DE CEBADORES SELECCIONADAS	62
TABLA 10- CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES BLANCO EN CULTIVOS DE 3D DE ACINOS PROTÁTICOS SOBRE UNA MBRICA EN AGES VERSUS NATIVA	65
TABLA 11: RESULTADOS DE LA EXPRESIÓN RELATIVA POR EL MÉTODO PFAFFL SEGÚN SU NORMALIZADOR	69
TABLA 12- EXPRESIÓN RELATIVA DE LOS GENES BLANCOS OBTENIDOS CON REST 2009	74

ABREVIATURAS

2D	Dos dimensiones
3D	Tres dimensiones

A	
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADNc	ADN copia
AGEs	Productos finales de glicación avanzada (Advanced Glycation End-products)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATCC	American Type Culture Collection

B	
BPE	Extracto bovino pituitario
BrEt	Bromuro de Etidio

C	
CCIB	The Center for Computational and Integrative Biology, Harvard Medical School
Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle treshold</i>)

D	
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol

E	
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
EMT	Transición epitelio- mesenquimal

G	
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

F	
FBS	Suero Bovino Fetal (<i>Foetal bovine Serum</i>)

H	
HRM	Análisis de disociación de alta resolución (<i>High resolution melting</i>)

K	
KSFM	Medio para queratinocitos libre de suero (<i>Keratinocyte serum free médium</i>)

M		
MB		Membrana Basal
MBr		Membrana Basa reconstituida
MLC2		Cadena Liviana de Miosina 2 (<i>Myosin Light Chain 2</i>)

N		
NCBI		Centro Nacional de Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)

P		
pb		Pares de bases
PBS		Buffer fosfato salino
PCR		Reacción en cadena de la polimerasa

Q		
qPCR		Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real

R		
REST2009		Relative Expression Software Tool 2009
RT		Retro-transcripción
RT-PCR		Transcripción reversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa

T		
TA		Temperatura ambiente
TBP		Proteína de unión a TATA (<i>TATA Binding Protein</i>)
Tm		Temperatura de disociación (<i>melting temperature</i>)

RESUMEN

El cáncer de próstata es el tumor con mayor incidencia en hombres mayores de 65 años, siendo la segunda causa de mortalidad en Uruguay en el hombre. A lo largo de la vida, el tejido prostático sufre un progresivo crecimiento y endurecimiento, variando las propiedades visco-elásticas de la matriz que contiene al acino glandular. Se ha visto que los AGEs, productos finales de glicación avanzada, se acumulan en el cuerpo a lo largo de la vida, y tienen efecto sobre diferentes proteínas, principalmente aquella de vida media larga; como lo son el colágeno y otros componentes de la membrana basal (MB). La acumulación de estos productos en la MB genera entrecruzamientos entre los componentes de esta matriz, contribuyendo a la pérdida de la elasticidad del tejido prostático. Esta acumulación de AGEs y el consecuente entrecruzamiento de los componentes de la membrana basal, genera fuerzas tensionales sobre la superficie de la célula epitelial prostática que son internalizadas por mecano receptores localizados en la membrana de la célula. Trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que una MB rica en AGEs desencadena un cambio en el fenotipo de la célula glandular prostática de epitelial a mesenquimal, sugiriendo que el microambiente rico en AGEs contribuye con la adquisición de un fenotipo mesenquimal pro-invasivo. Sin embargo, se desconocen cuáles son las moléculas efectoras moduladas (activadas o inhibidas) por el microambiente rico en AGEs que

desencadenan la transición de un fenotipo epitelial a uno mesenquimal en la célula glandular prostática. En este estudio, nos propusimos identificar cambios en la expresión tanto del marcador epitelial (Ecaderina), como de marcadores mesenquimales (Ncaderina, MLC2, β 1integrina, SNAI1 y SNAI2). Para ello se realizaron cultivos en 3D de acinos glandulares prostáticos inmersos en MBs nativas y ricas en AGEs; luego se extrajo el ARN mensajero total de los diferentes cultivos para analizar mediante RT-qPCR la expresión de los distintos marcadores. Si bien no se pudo obtener diferencias significativas en la expresión de los marcadores analizados, se puede ver una tendencia al aumento de la expresión de los marcadores mesenquimales, y según el método que se utilizó, aumento o disminución de la expresión de Ecaderina en los acinos crecidos en un ambiente rico en AGEs

Palabras claves: Cáncer de Próstata, AGEs, EMT

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Transición epitelio-mesenquimal

Normalmente en los diferentes tejidos existe un balance entre proliferación y muerte celular, es por este mecanismo que un mismo tipo celular se mantiene constante. Fallas en este mecanismo de control favorecen el inicio del cáncer¹. El cáncer es una enfermedad heterogénea y compleja, donde la célula cancerosa necesita adquirir ciertas capacidades que le permitan escapar de los controles normales de la célula y así promover el desarrollo del mismo².

No fue hasta la década de los 80 que la transición epitelio mesenquimal (EMT, Epithelial-Mesenchymal Transition) fue reconocida como un proceso distintivo, que no solo estaba relacionada con en el desarrollo embrionario sino también con varias patologías, como ser el cáncer³. La EMT es un proceso biológico que permite a una célula epitelial atravesar una serie de cambios bioquímicos para obtener un fenotipo mesenquimal, brindándole capacidades de migración, invasión y resistencia a apoptosis⁴. Este tipo de transición se ve normalmente en el desarrollo embrionario y la curación de heridas, las cuales reciben el nombre de EMT tipo 1 y 2, respectivamente (Figura 1A). La EMT tipo 3 se ve en células que han sufrido cambios genéticos que en conjunto con la transición epitelio mesenquimal, desencadenan el desarrollo y la progresión del cáncer⁴ (Figura 1).

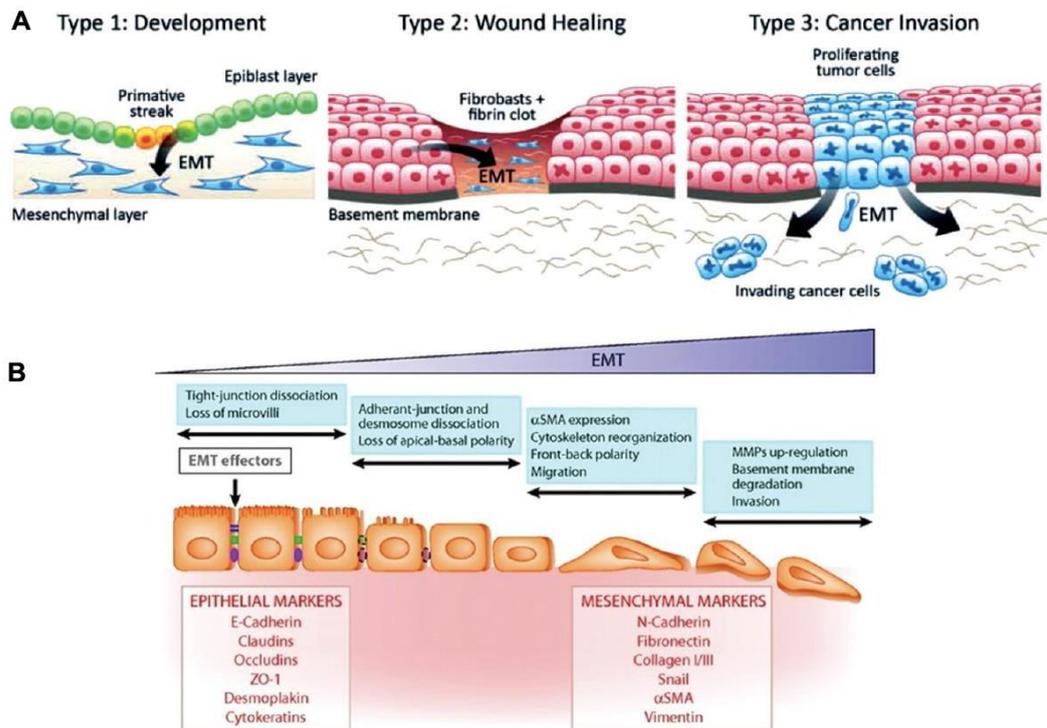


Figura 1- Esquemización de los diferentes tipos de EMT.

A, EMT Tipo 1, se ve una transición a un fenotipo mesénquimal cuando hablamos de desarrollo embrionario. EMT tipo 2, se da en el caso de curación de heridas. EMT tipo 3, las células que proliferan son del tipo tumoral y se ve en casos de invasión del cancer. **B**, A medida que progresa la EMT se observa un fenotipo mas alargado, y no el característico de las células epiteliales. Se van expresando marcadores del tipo mesenquimal y se pierde la expresion de los del tipo epitelial, como Ecaderina y otras proteínas involucradas en las uniones entre células. El aumento de la expresion de proteínas capaces de degradar la MB es algo típico de un estadio avanzado de EMT para que la célula pueda invadir. Tomado de Angadi y colaboradores⁵.

Entre las moléculas que determinan el cambio en el fenotipo observado durante la EMT se encuentra las que pertenecen a la superfamilia de las caderinas. Dentro de esta superfamilia encontramos las caderinas clásicas, glicoproteínas transmembrana que median la adhesión célula-célula de forma dependiente de calcio⁶. Ecaderina, expresada en el epitelio, Ncaderina expresada en tejido neural, fibroblastos y músculo son ejemplos de las caderinas clásicas⁷. La activación de la EMT se debe en parte por la pérdida de uniones adherentes entre las células epiteliales, en

donde Ecaderina juega un rol fundamental en el mantenimiento de las mismas y la determinación de la polaridad apico-basal necesaria para la función epitelial; por ende la pérdida de Ecaderina en las uniones adherentes es un paso esencial para que las células epiteliales pierdan su polaridad característica y el contacto con sus células vecinas, transformándose en una célula tipo mesenquimal que potencialmente puede migrar independientemente del resto, que ha sufrido una EMT^{4,8}.

La expresión de Ecaderina es reprimida por los factores de transcripción mesenquimales, SNAI1 (Snail) y SNAI2 (Slug), que se unen al promotor del gen^{9,10}; la sobreexpresión de SNAI1 tiene como resultado la represión de Ecaderina e induce un fenotipo más invasivo. Se ha propuesto que SNAI1, conjuntamente con el factor de transcripción ZEB2, inicia la desregulación de Ecaderina, mientras que SNAI2 sería el responsable de mantener esta inhibición¹¹. En varios tipos de cáncer, incluido melanoma, mama y próstata, se ha visto que la pérdida de Ecaderina está acompañada con la expresión de caderinas mesenquimales, como ser Ncaderina^{12,13}. Esta caderina actúa en tejidos no epiteliales, como tejidos neurales, el cerebro y el corazón. Al igual que Ecaderina, se encuentra formando interacciones célula célula, pero también cumple funciones no dependientes de células, como es estimular el receptor del factor de crecimiento fibroblástico¹⁴. Ncaderina es expresada en el desarrollo embrionario, durante la gastrulación y el desarrollo de la cresta neural¹⁵. Las caderinas mesenquimales median la

interacción entre las células tumorales con fenotipo tipo mesenquimal y las células del estroma por lo que la expresión de esta proteína favorece la EMT al inducir un fenotipo invasivo⁷. La expresión de Ncaderina es activada por los factores transcripcionales que inhiben la expresión de Ecaderina, sugiriendo que el cambio de caderinas es un paso en la desdiferenciación de las células^{16,17}.

Además, para que la célula tumoral sea capaz de propagarse a otros tejidos del cuerpo, la misma debe cambiar la forma en que interactúa con su entorno, con la matriz extracelular (ECM). La interacción con la ECM, esta mediada por las integrinas. Las integrinas son glicoproteínas heterodímeras de superficie, cuyo dominio extracelular interacciona con la ECM y el dominio intracelular se conecta con el citoesqueleto de la célula epitelial, formando los hemidesmosomas¹⁰. Las integrinas han sido implicadas en múltiples procesos celulares, son las encargadas de mantener la integridad de los tejidos y de promover la migración celular. Esto ocurre por la formación de adhesiones focales que se unen indirectamente a los filamentos de actina¹⁸; el montaje y desmontaje de estas adhesiones en conjunto con la contractilidad celular se necesita para la migración celular^{10,18}. Durante la EMT se observa un cambio en los tipos de heterodímeros formado por las integrinas, donde el aumento en la expresión de los heterodímeros $\alpha 5\beta 1$ y $\alpha 1\beta 1$ (o $\alpha 2\beta 2$) de integrinas median la unión de la célula a los componentes del estroma de fibronectina¹⁹ y del colágeno tipo I²⁰, respectivamente, promoviendo así las capacidades

migratorias de la célula tumoral. Además, el aumento de la expresión de $\alpha1\beta1$ o $\alpha2\beta2$ facilita el desensamblaje de las uniones adherentes de la célula, desestabilizando el complejo formado por las E-cadherinas²⁰.

Como se mencionó anteriormente la célula que atraviesa una transición epitelio mesenquimal adquiere la capacidad de migrar, involucrando en este proceso el citoesqueleto celular. La contracción de los filamentos de actina está mediada por la cadena liviana de miosina 2 (MLC2). La actividad de MLC2 está regulada por su estado de fosforilación, donde la fosforilación en diferentes partes de la molécula la activa y contribuye con la maduración de las adhesiones focales²¹.

Durante el proceso de carcinogénesis la célula epitelial requiere pasar de un fenotipo cuboidal con fuertes uniones adherentes célula-célula y polaridad apico-basal establecida, a un fenotipo elongado con polaridad anterior-posterior y un citoesqueleto contráctil capaz de interactuar con el estroma circundante, adquiriendo así las capacidades pro-migratorias e invasivas de una célula tumoral. Por lo tanto, para el proceso de EMT se requieren cambios en los patrones de adhesión célula-célula (de E-cadherina a N-cadherina) y de adhesión célula-matriz (mediados por heterodímeros de integrinas), así como la activación de los factores de transcripción mesenquimales (SNAI1 y SNAI2) y del aparato contráctil celular (activación de MLC2).

1.2. La glándula prostática

La próstata es una glándula exócrina con forma de pirámide invertida y que se asemeja a una castaña²² (Figura 2A); funciona como una glándula sexual accesoria que secreta proteínas e iones que forman parte del fluido seminal^{22,23}. La misma va modificando su tamaño, desde el desarrollo hasta la pubertad, llegando a un tamaño máximo en la adultez. En ella se pueden distinguir tres zonas glandulares: la zona periférica, la central y la de transición (Figura 2B); estas son diferentes tanto biológicamente como histológicamente. Cada zona glandular tiene sus características estromales, pero en todas ellas los ductos y acinos glandulares están revestidos por células epiteliales columnares altas y secretoras (células lumbinales), y por debajo de ellas se encuentran células epiteliales basales, que nutren y separan a las células secretoras de la MB (Figura 2C), así como células endócrinas-parácrinas intercaladas²⁴. La MB que rodea al acino glandular prostático está formada por interacciones covalentes y no covalentes de un set único de macromoléculas (laminina, colágeno tipo IV, enactina, heparán sulfatos y proteoglicanos) que mantienen la arquitectura acinar del epitelio glandular. Esta glándula es el lugar de desarrollo de dos enfermedades importantes en hombres mayores, como lo son la hiperplasia benigna prostática y el cáncer de próstata. La primera se desarrolla principalmente en la zona de transición mientras que el cáncer generalmente se desarrolla en la zona periférica²².

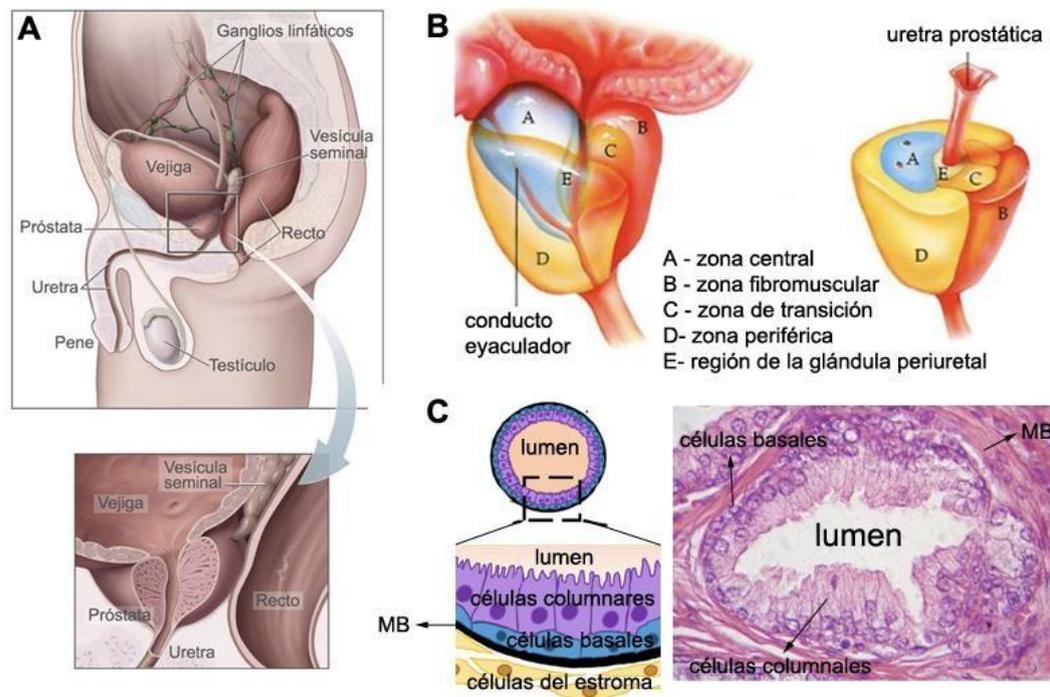


Figura 2- Glándula prostática.

A, Localización en el cuerpo humano. **B**, Esquematización de las diferentes regiones de la próstata: zona central, de transición y periférica. **C**, Interpretación esquemática de un acino glandular prostático donde se muestra la organización del acino. Se observa que las células columnares son las que forman el lumen y a éstas las rodean las células epiteliales basales, que son las que interaccionan con la MB. Modificado de Rybak y colaboradores²⁵. A la derecha: un acino glandular prostático obtenida del sitio web de la Universidad de Valencia, Departamento de Patología, Practicas Histología Médica (<https://www.uv.es/histomed>); objetivo 40X.

Para la progresión del cáncer de próstata y el desarrollo de una metástasis, la célula epitelial debe cambiar sus patrones de adhesión celular, atravesar la MB que rodea al acino y poder interaccionar con el estroma circundante y adquirir un fenotipo invasivo pro-migratorio (tipo mesenquimal) (Figura 3).

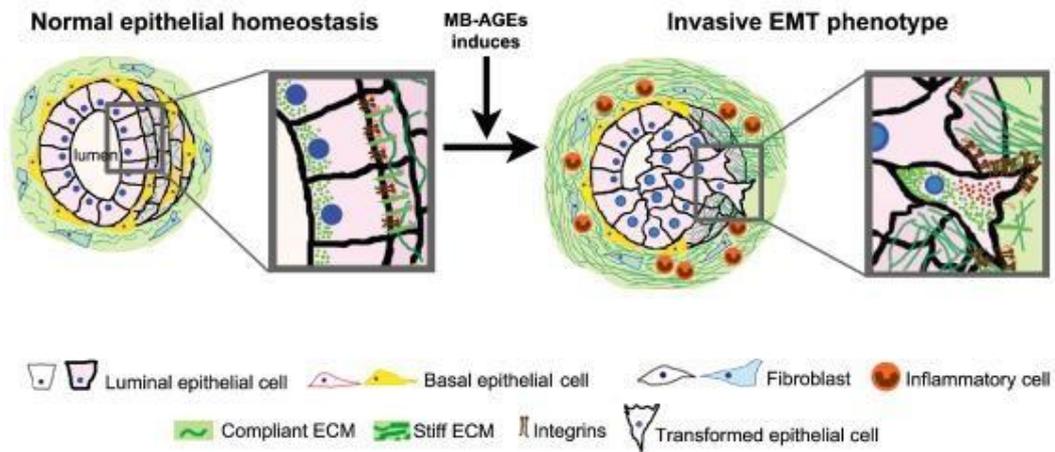


Figura 3- Esquema del proceso de desarrollo de una metástasis en cáncer de próstata.

A la izquierda se puede ver como en el acino se mantiene un fenotipo normal, con un lumen y una polaridad en las células en condiciones nativas, pero luego de una acumulación de AGEs en la MB este fenotipo se pierde. En la figura de la derecha se observa que hay una rigidez de la matriz extracelular, un cambio en el ambiente que rodea al acino y las células epiteliales ya no presentan un fenotipo característico. Tomado de Rodríguez-Teja y colaboradores²⁶.

1.3. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata es una enfermedad predominantemente de hombres adultos mayores (> 65 años)²⁷, de gran incidencia y distribución mundial, por lo que entender las bases moleculares de esta patología es fundamental para la clínica y tratamiento de la enfermedad. A esta enfermedad se le asocian factores de riesgo tanto endógenos como exógenos. Dentro del primer grupo podemos encontrar, el envejecimiento, alteraciones genéticas, predisposición familiar y la etnia²⁷. Se ha visto que hombres afroamericanos tienen una mayor incidencia de este cáncer²⁸. En los factores exógenos, encontramos la dieta, el ambiente de trabajo, el entorno, alcohol y cigarro^{27,29}. Un aumento en el riesgo de incidencia en hombres japoneses que han migrado a otras partes del mundo es un

indicador de que la dieta y el ambiente influyen en el desarrollo de esta enfermedad ²⁹.

Según la Comisión de Lucha Contra el Cáncer, en Uruguay el cáncer de próstata presenta la mayor tasa de incidencia en el hombre (59,93 %, tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000, 2009-2013) y la segunda tasa de mortalidad 19,89 % (tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000; 2009-2013) (Figura 4)

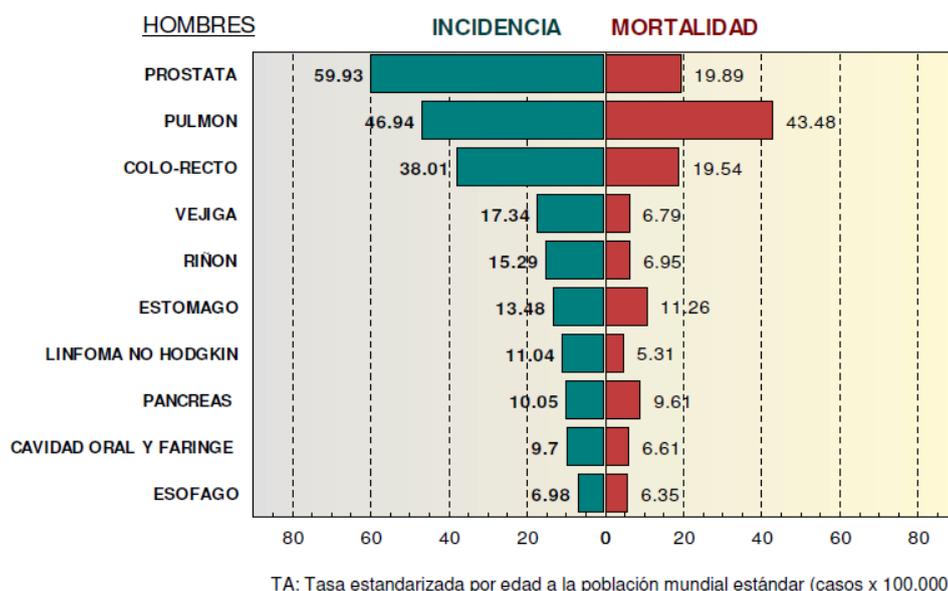


Figura 4-Tasa de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en Uruguay (2009-2013).

Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer. Atlas de mortalidad por cáncer en Uruguay [Internet]. [citado noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.comisioncancer.org.uy>.

El hecho de que el cáncer de próstata se relaciona con la edad avanzada del paciente se puede apreciar en los datos obtenidos de la Comisión de Lucha contra el cáncer (Tabla 1), donde la incidencia comienza a aumentar a partir de los 50 años. Con el pasaje de los años el tejido prostático sufre variaciones en sus propiedades visco-elásticas generando el progresivo crecimiento y endurecimiento del tejido glandular^{30,31}. De hecho es el aumento en la rigidez del tejido glandular prostático que, conjuntamente con los valores en sangre del antígeno prostático específico (PSA), se utiliza como screening para la identificación de pacientes con cáncer de próstata³².

Tabla 1- Tasas de incidencia y mortalidad específica por edad.

Comisión Honoraria de Lucha contra el cáncer. Atlas de mortalidad por cáncer en Uruguay [Internet]. [citado noviembre de 2017]. Disponible en: <http://www.comisioncancer.org.uy>.

Mortalidad 2009-2013 -Tasa específica por edad	
Edad del paciente	Cáncer de Próstata
0-4	0
5-9	0
10-14	0
15-19	0
20-24	0
25-29	0
30-34	0
35-39	0,18
40-44	0,41
45-49	0,21
50-54	5,15
55-59	11,73
60-64	35,21
65-69	99,71
70-74	185,72
75-79	349,40
80-84	590,88
85 y más	911,31
Incidencia 2009-2013 -Tasa específica por edad	
Edad del paciente	Cáncer de Próstata
0-4	0
5-9	0
10-14	0
15-19	0
20-24	0
25-29	0,18
30-34	0
35-39	0,74
40-44	2,64
45-49	10,65
50-54	47,65
55-59	126,85
60-64	283,98
65-69	486,31
70-74	630,96
75-79	653,70
80-84	586,06
85 y más	716,03

1.4. Productos finales de glicación avanzada (AGEs)

Los AGEs como lo dice su nombre se forman luego de una glicación no enzimática entre una azúcar reducida y un grupo amino de proteínas, lípidos o ácidos nucleicos. La formación de los mismos es un proceso molecular que involucra varias reacciones, a las que se les puede conocer como reacción de Maillard³³ (Figura 5).

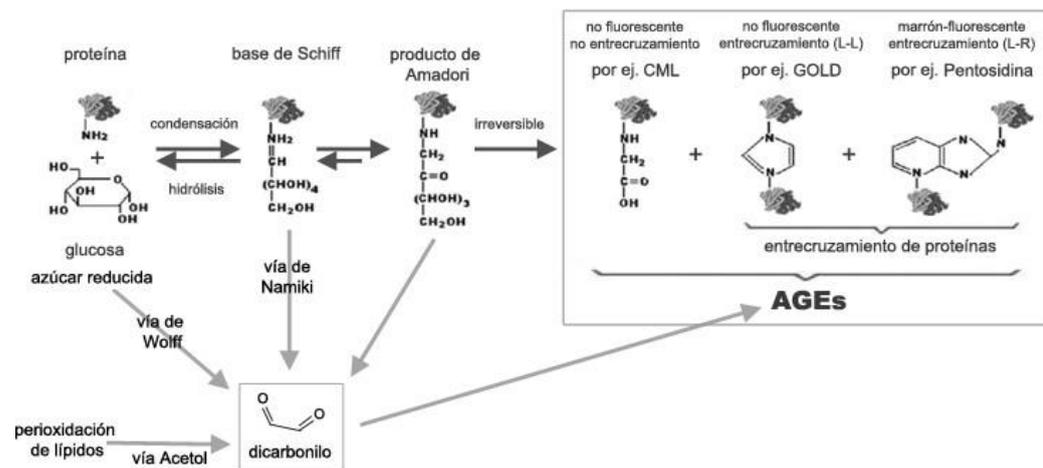


Figura 5- Vías de formación de AGEs.

Reacción de Maillard; en un primer paso un azúcar reducida reacciona con el grupo amino de un aminoácido libre para formar una base de Schiff; luego en una segunda etapa el producto de Schiff sufre rearrreglos que dan origen a los productos de Amadori; los cuales, por último, sufren rearrreglos irreversibles que derivan en la producción de AGEs y posible entrecruzamiento de las moléculas involucradas en la reacción de Maillard. Los AGEs también pueden formarse debido a la degradación de lípidos y aminoácidos, y ruptura de compuesto dicarbonilos siguiendo las vías Acetol, de Wolff y Namiki.

La reacción comienza cuando el grupo carbonilo de una azúcar reducida, reacciona con un grupo amino libre nucleofílico de un aminoácido, formando la base reversible de Schiff.^{34,35} Esta primera reacción ocurre en unas horas y es dependiente de la concentración de glucosa. Si la concentración de esta disminuye entonces se revierte la reacción, por el contrario, si la concentración es la adecuada la base de

Schiff sufre ciertos rearrreglos y se forma el producto de Amadori. Estos son compuestos más estables, pero a su vez reversibles y si ocurre la acumulación de los mismos estos sufrirán rearrreglos químicos complejos obteniendo como producto final los AGEs. Esta reacción es irreversible y ocurre en semanas o meses, generando un producto más estable y que puede ser acumulable dentro o fuera de la célula³⁵. Esta no es la única manera en que se forman los AGEs, la formación de estrés dicarbonilo puede llevar a la formación de estos productos siguiendo diferentes vías. Una de ellas es la vía de Namiki, donde las bases de Schiff pueden sufrir fragmentación oxidativa para formar intermediarios dicarbonilos que generarán AGEs. Otra vía es la de Wolff, donde la autooxidación de monosacáridos genera compuestos carbonilos pudiendo derivar en la producción de AGEs. La peroxidación de los lípidos (vía Acetol) es otra manera alternativa de obtener AGEs³⁶. Debido a la cantidad de precursores que presentan son un grupo complejo y heterogéneo de compuestos³⁶ (Tabla 2).

La reacción de Maillard ocurre lentamente a lo largo de la vida, llevando a la acumulación de AGEs en el organismo y a la alteración de la estructura y función de las biomoléculas, contribuyendo con el proceso de envejecimiento de un individuo. Este proceso acumulativo tiene implicancias en la patogenia de neuropatías, retinopatías y nefropatías, así como el progreso de enfermedades cardiovasculares y diferentes tipos de cáncer, en particular el cáncer de próstata^{37,38}.

Tabla 2- Clasificación de los distintos tipos de AGEs.

Existen al menos 20 tipos diferentes de AGEs, esta tabla presenta los AGEs con función biológica importante identificados hasta la fecha.³⁹

No fluorescentes y no generan entrecruzamiento (<i>crosslinking</i>) entre las moléculas
N ^ε -Carboxi metil-lisina (CML)
N ^ε carboxi etil-lisina (CEL)
Pirralina
No-fluorescentes y generan entrecruzamiento (<i>crosslinking</i>) entre las moléculas
Dímero de lisina derivado de glioxal (GOLD)*
Dímero de lisina derivado de metil glioxal (MOLD)*
Dímero de lisina derivado de 3-deoxiglucosona (DOLD)*
Hidroimidazolones
Hidroimidazolone derivado del Glioxal (G-M)
Hidroimidazolone derivado del Metil glioxal (MG-H)
Otros AGEs que generan entrecruzamiento (<i>crosslinking</i>) entre las moléculas
Pentosidina**
*Forma entrecruzamiento entre proteínas que contienen lisina-lisina, **Forma entrecruzamiento entre proteínas que contienen arginina-lisina

Además de los AGEs formados endógenamente, existen importantes fuentes exógenas de estas glicotoxinas, generadas durante los procesos de gratinado, asado y frito de los alimentos, añadiendo color y sabor a las comidas^{35,40}. Alrededor del 10% de los AGEs ingeridos son transportados en la circulación, de los cuales 2/3 son incorporados a los tejidos y sólo 1/3 es eliminado vía renal³⁵.

Cualquier proteína podría ser blanco de sufrir modificaciones glicoxidativas *in vivo*. Las proteínas que tienen una vida media larga con poco recambio, como ser proteínas estructurales o de la matriz extracelular, son más susceptibles de ser partícipes de la reacción de Maillard y ser modificadas por la acumulación de AGEs. En particular, cuando la reacción de Maillard produce AGEs capaces de entrecruzar los componentes de la MB (laminina, colágeno tipo IV, enactina, heparán sulfatos y proteoglicanos) cambia las propiedades estructurales y mecánicas de la misma, generando una estructura filamentosa más rígida

y resistente a su degradación^{41,42}. Se ha visto que el colágeno glicado aparece alrededor de los 20 años y la glicación del mismo aumenta 3.7% por año, llegando a tener del 30 al 50% glicado a la edad de 80³³. A nivel molecular, las fuerzas tensionales ejercidas por la membrana basal rigidizada debido a la acumulación de AGEs son transmitidas al ambiente intracelular por mecano-receptores situados en la superficie de la célula epitelial. Estos receptores activan cascadas de señalización molecular que modulan la adhesión célula-célula y célula-membrana basal, la contractilidad celular y la capacidad migratoria de la célula epitelial²⁶.

Para estudiar como las fuerzas tensionales provenientes de una matriz envejecida contribuyen con el comienzo de la transformación maligna en el cáncer de próstata, se emplea en el laboratorio un modelo de cultivo en 3D de acinos prostáticos³⁸. Los acinos prostáticos se generan sobre una MB reconstituida sometida a la reacción de Maillard, donde variaciones en el tiempo de reacción generan matrices con distintos grados de acumulación de AGEs y entramados con diferente grados de entrecruzamiento entre sus componentes, produciendo así cultivos en 3D sobre MBs con distintas propiedades elásticas^{26,38}. Cabe destacar que luego de 14 horas de extensión de reacción de Maillard es posible obtener una MB con un aumento en la rigidez ($3,2 \pm 2,0$ más rígida) que reproduce fielmente el aumento descrito en un tejido maligno versus el epitelio prostático normal^{43,44,45,46}, haciendo posible mimetizar en cultivo las fuerzas tensionales que son ejercidas sobre la célula epitelial *in vivo*

durante el proceso de tumorigenesis. Al comparar los acinos prostáticos generados sobre una MB nativa versus los generados sobre una MB rígida (rica en AGEs) se pudo corroborar que las fuerzas ejercidas por la MB rigidizada inducen cambios en el fenotipo celular epitelial, y por ende cambios en la arquitectura acinar que recuerdan a una lesión premaligna²⁶. En cuanto a la morfología acinar prostática, los acinos cultivados sobre una MB rica en AGEs son más pequeños y presentan una forma poligonal en vez de la esferoide observada en los cultivos con MB nativa. Estos cambios en la arquitectura del acino van acompañados por una disminución significativa del área luminal del mismo y un aumento de células con capacidades migratorias que protruyen de la estructura e invaden la matriz celular. Además, se observa un engrosamiento de la MB rígida que rodea al acino con rupturas puntuales en zonas donde células que adquirieron un fenotipo pro-invasivo escapan de la estructura acinar²⁶.

Entre los cambios en el fenotipo celular se destaca la pérdida de las adhesiones célula-célula en cultivos sobre una MB rica en AGEs, observándose en imágenes de microscopía confocal una apertura de las adhesiones laterales y por western blot una disminución de los niveles de la proteína de adhesión epitelial E-cadherina²⁶. Conjuntamente con este cambio se registró una pérdida en la polaridad apico-basal de la célula epitelial prostática en cultivos con MB rígida, con una alteración de la localización de los marcadores apicales (GM130 y EEA1). Cabe destacar

que las fuerzas tensionales provenientes de la MB rígida activan la cascada molecular RhoA-ROCK-actinmiosina que regula el aparato contráctil de la célula y por ende la capacidad migratoria de la misma. El análisis de los extractos celulares de cultivos de acinos prostáticos crecidos sobre una MB rica en AGEs muestra niveles más elevados de fosforilación de MLC2 cuando se comparan con los obtenidos a partir de cultivos crecidos en MB nativas, indicando así una activación del aparato contráctil celular en los cultivos con MB rígida. Estos cambios moleculares sugieren el comienzo de la transición desde un fenotipo epitelial a uno mesenquimal pro-invasivo en los cultivos sobre una MB rigidizada mediante la acumulación de AGEs. Sin embargo, aún resta por conocer si un microambiente envejecido rico en AGEs induce una disminución de la expresión de marcadores epiteliales (como ser Ecaderina) y un aumento en la expresión de marcadores mesenquimales (como ser: Ncaderina, MLC2, β 1integrina, SNA11 y 2)

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Un ambiente enriquecido en AGEs, modula la actividad de moléculas efectoras que median la interacción célula-célula, célula-membrana basal, aparato contráctil celular, como también de moléculas del tipo mesenquimal, contribuyendo con la transición epitelio – mesenquimal de la célula y la consecuente adquisición de un fenotipo pro-migratorio.

2.2. Objetivo general

Con este trabajo se propone establecer si la MB rica en AGEs (rígida) inhibe la expresión de marcadores del fenotipo epitelial y aumenta la de marcadores del fenotipo mesenquimal.

2.3. Objetivos Específicos

- Diseño y selección de *primers* específicos para el ARNm del marcador epitelial Ecaderina y para los ARNm de los marcadores mesenquimales (Ncaderina, β 1integrina, MLC2, SNAI1 y 2) que serán utilizados en la PCR en tiempo real.
- Modificar la MB reconstituida produciendo la reacción de Maillard *in vitro* y obtener matrices rígidas con elevada concentración de AGEs.
- Generar cultivos en 3D de células epiteliales prostáticas, RWPE-1, sobre MBs nativas y ricas en AGEs.

- Una vez obtenidos los cultivos, estudiar los cambios relativos en la expresión génica de marcadores epiteliales y mesenquimales mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Las soluciones empleadas y los proveedores de los materiales utilizados se describen en detalle en los anexos I y II, respectivamente.

3.1. Línea celular

Se empleó la línea celular epitelial prostática RWPE-1 (Tabla 3)⁴⁷ proveniente de un hombre caucásico de 54 años. Las mismas fueron cultivadas siguiendo las sugerencias de la *American Type Culture Collection* (ATCC); resumidamente, las células se crecieron en medio de para queratinocitos sin suero (*keratinocyte serum free medium*, KFSM) el cual fue suplementado con factor de crecimiento epidérmico 1-53 (EGF 1-53 5 ng/ml), extracto bovino pituitario (BPE, 0,05 ng/ml), penicilina (100 µg/ml) y estreptomomicina (100 µg/mL). Las células se mantuvieron a 37°C en una atmósfera con 5% CO₂ y el medio se cambió cada 48 horas debido a la baja estabilidad de los factores EGF y BPE a 37°C.

Una vez que la placa estuvo confluyente, se procedió a levantar las células. Para ello se quitó el medio de cultivo y se lavó con 5 ml de buffer fosfato salino (PBS), se removió el PBS, se agregaron 3 ml de tripsina-EDTA (0,05 %, v/v) y se dejó actuar durante 5 minutos para que las células pudieran desprenderse de la placa; la reacción de la tripsina se paró agregando 5 ml de PBS suplementado con 2 % suero bovino fetal (v/v, FBS). Se tomó el medio con células, se colocó en un tubo de 15 ml y

se centrifugó durante 5 minutos a 125-150 g y a temperatura ambiente (TA). Una vez obtenido el *pellet*, se re-suspendieron las células en 5 ml de medio de cultivo a fin de obtener una solución de una sola célula, y se contaron en una cámara de Neubauer para sembrar el número deseado de células. Para el mantenimiento de las células a largo plazo se le agregó a la suspensión de células 10 % v/v de dimetilsulfóxido (DMSO) y se conservaron en nitrógeno líquido.

Tabla 3- Características de células RWPE-1 (ATCC® # CRL-11609™)

Características	RWPE-1
Organismo	<i>Homo sapiens</i> , humano
Tejido	Próstata
Tipo celular	Epitelial – transformado con HPV-18
Edad	Adulto de 54 años
Género	Masculino
Morfología	Epitelial
Propiedades de cultivo	Adherente
Enfermedad	Normal
Condiciones de almacenamiento	Nitrógeno líquido en fase gaseosa

3.2. Producción de membrana basal rica en AGEs y cultivo celular en 3D.

Para llevar a cabo los cultivos en 3D de acinos glandulares próstáticos primero se cubrieron los pocillos de cultivo con membrana basal (MB) y se realizó la reacción de Maillard siguiendo el protocolo propuesto por Rodríguez-Teja y colaboradores^{48,38}. Para ello se utilizó una MB reconstituida (*3D Culture Matrix reduced growth factor*). La misma es una forma soluble de MB purificada de un tumor Engelbreth-Holm-Swarm a la

cual se le han depletado los factores de crecimiento. Los componentes principales de esta membrana incluyen laminina, colágeno IV, enactina y proteoglicanos de heparan sulfato, con una concentración proteica de aproximadamente 15 mg/ml. Previo a su uso, la membrana debe incubarse en hielo a 4°C durante toda la noche para que pueda entrar en solución. Una vez obtenida la membrana líquida, se mantuvo en hielo una cámara de 8 pocillos y se cubrió cada pocillo con 40 µl de membrana procurando no dejar burbujas. Luego se mantuvo a 37°C durante 30 minutos para polimerizar la MB (de aquí nombrada como MB reconstituida, MBr).

Para llevar a cabo la reacción de Maillard, se incubó la MBr a 37°C por 14 horas con 300 µl de 50mM glicolaldeído para inducir la formación de AGEs. Como control negativo se incubó la MBr con 300 µl de PBS, quedando la MBr en su estado nativo. Se quitó el glicolaldeído y se detuvo la reacción con 300 µl de glicina etil ester 1M durante una hora a 37°C. Se quitó la glicina etil ester y se lavó un mínimo de 5 veces con 300 µl de PBS, para eliminar residuos de glicolaldeído y glicina de la MBr. Por último, se dejó toda la noche con 300 µl PBS a 37°C y a la mañana siguiente se lavó nuevamente con 300 µl PBS por lo menos dos veces y luego con 300 µl de medio KSFM, obteniendo así la MBr rígida (rica en AGEs) y en su estado nativo pronta para sembrar 8000 células RWPE-1 por pocillo en 300 µl de medio KSFM. El proceso de generación de los cultivos en 3D de los acinos prostáticos glandulares se puede ver

esquemático en la (Figura 6)

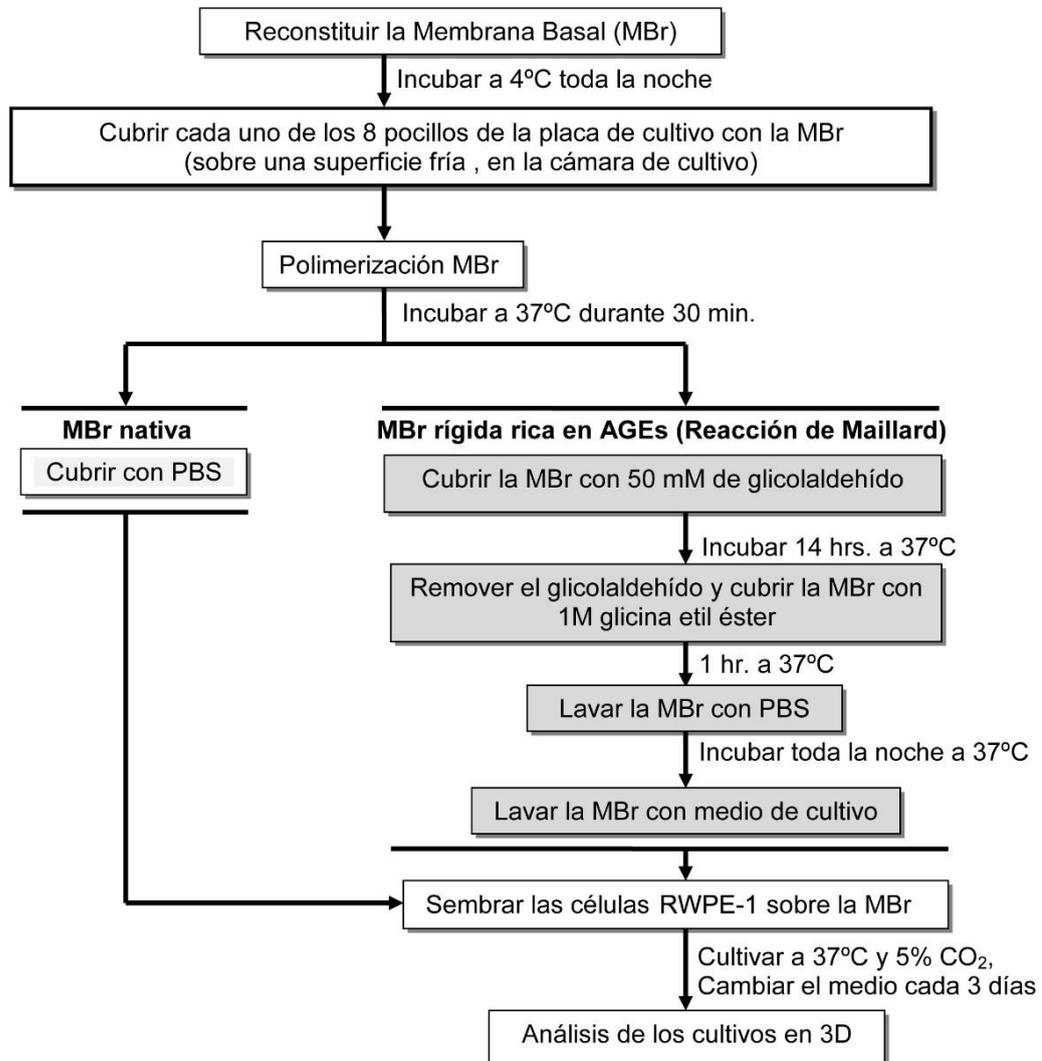


Figura 6-Generación de cultivos en 3D.

Esquema representativo de la generación de la membrana rígida por la formación de AGEs debido a la reacción de Maillard generada en la MBr.

3.3. Extracción de ARNm total

Luego de 6 días de cultivo en 3D se observaron acinos glandulares prostáticos con un tamaño adecuado ($> 50 \mu\text{m}$) y se procedió a la extracción del ARN total. Para ello se utilizó el kit comercial PureLink®

RNA Mini Kit y tips con filtro, de manera de no perder ARN por contaminación con ribonucleasas. Se quitó el medio y se agregaron 250-300 μl de TRIzol® se pipeteó arriba y abajo varias veces de manera de que las células adheridas a la MBr se lisaran. Se tomó el lisado y se incubó 5 minutos a TA. Transcurrido el tiempo, se añadieron 0,2 mL de cloroformo por mL de TRIzol®, se mezcló vigorosamente por 15 segundos. Se incubó a TA por 2-3 minutos y luego se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C. Se transfirió la fase superior que contiene el ARN total (aproximadamente 400 μl) a un tubo nuevo libre de ARNasas. Se agregó un volumen de etanol 70 %, se vortexeó para mezclar bien y luego se invirtió un par de veces para dispersar cualquier precipitado que se pueda haber formado luego de agregado el alcohol. Se transfirió el volumen de la muestra a la columna de afinidad (*spin cartridge*, capacidad máxima: volumen \leq 700 μl), se centrifugó a 12000 g por 15 segundos a TA. Se descartó el líquido que atravesó la columna y se volvió a colocar el *spin cartridge* en el mismo tubo colector. En los casos de que el volumen de la muestra superaba los 700 μl , se repitieron los pasos de cargar en la columna, centrifugado y descarte hasta que toda la muestra se retuviese en la misma. Luego, se añadieron 700 μl de buffer de lavado I, se centrifugó a 12000 g por 15 segundos a TA y se descartó el tubo colector. Se colocó un nuevo tubo colector y se agregaron 500 μl de buffer de lavado II, se centrifugó a 12000 g por 15 segundos a TA, se descartó el líquido y se volvió a utilizar

el mismo tubo colector. Se agregó nuevamente 500 µl de buffer de lavado II y se centrifugó, se descartó el líquido que atravesó la columna de afinidad y se utilizó el mismo tubo colector. Se centrifugó a 12000 g por 15 segundos a TA, se descartó ese tubo colector y se colocó un tubo de recuperación libre de ribonucleasas. Se añadieron 40 µl de agua libre de RNAsas en el centro de la columna de afinidad y se incubó a TA por 1 minuto, finalmente se centrifugó por 2 minutos a 12000 g a TA y se cuantificó la concentración de ARN en la muestra obtenida utilizando un NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific).

Una vez conocida la concentración de ARN en la muestra, se realizó un tratamiento con DNAsa I para descartar todo tipo de contaminación de la muestra con ADN. Por 1 µg de ARN total se utilizó una unidad de enzima (1 µl), se agregó 1 µl del buffer 10X y se completó, en caso de ser necesario, hasta un volumen final de 10 µl utilizando agua libre de RNAsa. Se incubó por 30 minutos a 37°C y se agregó 1 µl de EDTA 50 mM y se volvió a incubar por 10 minutos a 65°C. El ARN que no fue tratado con DNAsa I se guardó a -80°C, en caso de que fuera necesario usarlo nuevamente. Los ARN tratados se utilizaron para la reacción de retro-transcripción (RT) y se conservó a -20°C.

3.4. Retro-Transcripción

La reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) emplea ADN como molde, por lo cual se realizó una RT de todo el ARN purificado de los cultivos en 3D. Esta consiste en generar ADN copia (ADNc) simple cadena a partir de ARN extraído utilizando una transcriptasa reversa. Antes de comenzar con la RT, se cuantificó nuevamente en el NanoDrop™ 1000 (Thermo Fisher Scientific) la concentración de ARN total y la calidad del mismo en la muestra tratada con DNAsa I. Para la RT se empleó la transcriptasa reversa SuperScript™ II, la cual proviene del virus de Leucemia murina de Moloney (MMLV) y fue genéticamente modificada en su dominio RNasa H de modo de disminuir su actividad ribonucleasa. Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante; resumiendo, en un tubo para PCR se agregó: 1 µl de Oligo dT₁₅₋₁₈, 1 µl de dNTPs (10mM cada uno), un máximo de 5 µg de ARN (máximo volumen 10 µl) y agua libre de RNAsa para llegar a un volumen final de 12 µl. Utilizando el termociclador (T-Professional, Biometra), se incubó la reacción a 65°C durante 5 minutos, se colocaron las muestras rápidamente en hielo y se hizo una rápida centrifugación. Luego, se añadieron a la reacción 4 µl de Buffer *first Strand* 5X, 2 µl de ditioneitol (DTT) y 1 µl de agua para RT-PCR; se mezcló gentilmente y se incubó a 42°C por 2 minutos. Posteriormente, se agregó 1 µl de SuperScript™ II mezclando suavemente pipeteando hacia arriba y hacia abajo, y se incubó a 42°C por 50 minutos. Pasado el tiempo de incubación se inactivó

la reacción calentando a 70°C por 15 minutos y se conservó la muestra a -20°C hasta establecer el cambio en la expresión génica de las muestras obtenidas a partir de cultivos en 3D de acinos glandulares prostáticos generados sobre una MBr rica en AGEs versus los generados sobre una MBr nativa.

3.5. Diseño de cebadores

Para el diseño de los cebadores (*primers*) se siguió la guía presentada por Thornton, B. y Basu⁴⁹, y se utilizó el software Primer3 (versión 0.4.0) disponible online (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>), usándose como referencia los parámetros representados en la Tabla 4 .

Tabla 4- Descripción de las condiciones utilizadas para el diseño de los cebadores.

Características	Valores
Tamaño del producto de qPCR	80-150 pb 100-200 pb
Tamaño de los cebadores	Mínimo: 20 pb Óptima: 23 pb Máximo: 26 pb
Temperatura de disociación (T _m) de los cebadores	Mínimo: 60°C Óptima: 64°C Máximo: 70°C
Tabla de los parámetros termodinámicos	SantaLucia1998
Porcentaje de GC en los cebadores	Mínimo: 40 % Óptima: 60 % Máximo: 80 %
Complementariedad máxima de los cebadores	4
Máximo número de mononucleótidos repetidos en los cebadores	3
Fórmula de la corrección de sales	SantaLucia1998
Concentración de cationes divalentes	3.5 Mm
Concentración de dNTPs	0.20 Mm
<ul style="list-style-type: none"> • pb, pares de bases • Para los otros valores necesarios descritos en la Thornton, B. y Basu⁴⁹, se utilizaron los valores que están por defecto en la página web: http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/. 	

Debido a la utilización de Oligo dT₁₅₋₁₈ en la RT es posible que los ARNm purificados presentaran su extremo 5' parcialmente degradado, de modo que se diseñaron cebadores complementarios a regiones cercanas

al extremo 3' de las secuencias blanco (Figuras 17 y 18 del Anexo III), evitando así la pérdida de ARNm de fracción purificada. Además, las parejas de los cebadores fueron diseñadas para amplificar regiones entre dos exones, imposibilitando la amplificación de ADN genómico en caso de contaminación. El primer paso en la generación de los cebadores fue obtener las secuencias de los marcadores a estudiar: β 1integrina, Cadena Liviana de Miosina 2 (MLC2), Ecaderina, N-caderina, SNAI 1 y 2, y la secuencia de los genes de referencia contra los cuales normalizamos los resultados obtenidos: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y β 1actina (Tabla 5). Se utilizó la página web Ensembl genome (<http://www.ensembl.org/index.html>) para descargar todas las isoformas posibles de cada ADNc blanco (Tabla 5), luego se compararon las secuencias de las diferentes isoformas para identificar los exones que compartían y emplear estos para el diseño de varios pares de cebadores para cada ADNc.

Luego de diseñados los cebadores fueron analizados con el software *Beacon Designer*TM (disponible online en: <http://www.premierbiosoft.com>) para descartar la posible formación de estructuras secundarias (*hairpin*) o dímeros de *primers*. El software calcula la cantidad de energía necesaria para romper las posibles estructuras secundarias que se forman en cada oligonucleótido o entre homo y hetero-dímeros. Se eligieron cebadores cuyos ΔG fueran cercanos a cero, descartando aquellos que presentaran un ΔG menor a -3,5 kcal mol. Además, se analizó la capacidad de

formación de estructuras secundarias de los amplicones mediante el software IDT UNAFold (Integrated DNA Technologies, disponible en: <https://www.idtdna.com/UNAFold>). En este caso a la hora de la elección, se debía tener en cuenta que la temperatura de *melting* fuera menor que la temperatura de apareamiento de los cebadores en la qPCR.

Tabla 5- Número de acceso de los genes de referencia y blancos estudiados y las isoformas de los ADNc correspondientes.

Base de datos empleada NCBI (National Center for Biotechnology Information), taxón *Homo sapiens*

Genes Referencia	# gene	# isoformas
β 1ctina	ACTB (ENSG00000075624)	ACTB_201(ENST00000331789.6) ACTB_204(ENST00000425660.5)
GAPDH	GAPDH (ENSG00000111640)	GAPDH_201(ENST00000229239.9) GAPDH_202(ENST00000396856.5) GAPDH_203(ENST00000396858.5) GAPDH_204(ENST00000396859.5) GAPDH_205(ENST00000396861.5) GAPDH_211(ENST00000619601.1)
Genes Blanco	# gene	# isoformas
Ecaderina	CDH1 (ENSG00000039068)	CDH1_201(ENST00000261769.9) CDH1_202(ENST00000422392.6) CDH1_212(ENST00000611625.4)
MLC2	MYL2 (ENSG00000111245)	MYL2_201(ENST00000228841.12) MYL2_203(ENST00000548438.1)
β 1integrina	ITGB1 (ENSG00000150093)	ITGB1_201 (ENST00000302278.7) ITGB1_202 (ENST00000396033.6) ITGB1_205 (ENST00000423113.5)
N-caderina	CDH2 (ENSG00000170558)	CDH2_201(ENST00000269141.7) CDH2_202(ENST00000399380.7)
SNAI1	SNAI1 (ENSG00000124216)	SNAI1_201 (ENST00000244050.2)
SNAI2	SNAI2 (ENSG0000019549)	SNAI2_201(ENST0000020945.3)

Aparte de las parejas de *primers* diseñadas en nuestro laboratorio, se incluyó un set de cebadores para cada ADNc blanco tomado de la base de datos PrimerBank del CCIB de Harvard Medical School (The Center for Computational and Integrative Biology, disponible en: <https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank/index.html>). Los *primers* descritos en PrimerBank fueron diseñados siguiendo los criterios

publicados en Wang, X. et al. 2012⁵⁰, y se garantiza que los mismos fueron testeados. De esta manera se mandaron sintetizar a MacroGen 2 o 3 pares de *primers* para cada ADNc blanco: 1 par cebadores ya testeados y 1-2 par (es) cebador(es) diseñados *de novo*.

3.6. Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

La cuantificación de los niveles de expresión génica de los diferentes marcadores se realizó mediante qPCR, permitiendo cuantificar el producto generado a medida que transcurrían los ciclos de amplificación. Esto se hace gracias a la incorporación a la reacción de una molécula fluorescente, SYBR Green I, que se une preferencialmente al ADN doble cadena intercalándose entre sus bases. El complejo SYBR Green I-ADN absorbe luz a $\lambda_{\text{máx}} = 497 \text{ nm}$ y emite a $\lambda_{\text{máx}} = 520 \text{ nm}$, de modo que al final de cada ciclo de amplificación la fluorescencia emitida puede ser determinada, proporcionando una medida indirecta y proporcional a la cantidad de producto de ADN doble cadena sintetizado^{49,51}. Para esto se utilizó el kit comercial QuantiNova SYBR Green PCR Kit y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. La cuantificación de los niveles de expresión de genes blanco y de referencia de las muestras crecidas sobre una MBr nativa (no tratada) o una MBr rígida rica en AGEs (tratada) se realizaron el mismo día de manera de disminuir errores de laboratorio. Las reacciones se realizaron por triplicado, incluyendo tres reacciones más con agua (control negativo), por lo que se realizó un mix para 10

reacciones, ya que se incluyó en cada mix una reacción extra por posibles errores de pipeteo. El mix de cada gen contuvo: 50 μ l de 2X SYBR Green PCR Master Mix, 5 μ l del cebador directo, 5 μ l del cebador reverso, 0,5 μ l del colorante ROX normalizador interno de la corrida y 29,5 μ l de agua, dando un volumen final de 90 μ l. La mezcla se realizó sobre hielo para conservar todos los componentes de la reacción. Una vez terminada la mezcla, se colocó 9 μ l de la misma en 9 pocillos de la placa para qPCR, y se agregó 1 μ l de ADNc obtenido de los cultivos nativos (no tratados) a 3 pocillos, 1 μ l de ADNc adquirido de los cultivos rígidos (tratados) a otros 3 pocillos y 1 μ l de agua a los 3 pocillos restantes. De esta forma cada pocillo tenía un volumen final de 10 μ l. La qPCR se realizó en el EcoTM Real-Time PCR System (Illumina) con el siguiente programa: activación de la enzima a 95 °C por 2 minutos, seguido por un ciclo de dos pasos, el de desnaturalización, y el de *annealing* y extensión combinados. El primer paso del ciclo es de 5 segundos a 95 °C, seguido por 10 segundos a 60 °C. Este ciclo se repite 40 veces. Una vez terminada la qPCR se corrieron los productos obtenidos en un gel de agarosa 2%.

Cada experimento fue repetido 3 veces, obteniendo resultados de 3 réplicas biológicas, cada una con 3 réplicas experimentales. Con los datos obtenidos se calculó el cambio en la expresión génica utilizando el método $\Delta\Delta Cq$ ⁵², el de Pfaffl⁵³ y el software REST 2009⁵⁴ (Relative Expression Software Tool 2009) explicados en las siguientes secciones.

3.7. Cálculo de la expresión relativa mediante el algoritmo $\Delta\Delta Cq$

Uno de los métodos utilizados para la interpretación de los datos fue el método $\Delta\Delta Ct$. El mismo nos permite cuantificar la expresión relativa de los genes blanco con respecto a la expresión de un gen normalizador (Tabla 5), de manera independiente de la eficiencia de los cebadores utilizados. En las siguientes ecuaciones se muestra el algoritmo empleado:

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}, \text{ siendo } \Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{nativo}} - \Delta Ct_{\text{rígido}}.$$

$$\Delta Ct_{\text{nativo}} = Ct_{\text{promedio}_{\text{gen en estudio nativo}}} - Ct_{\text{promedio}_{\text{gen referencia nativo}}}$$

$$\Delta Ct_{\text{rígido}} = Ct_{\text{promedio}_{\text{gen en estudio rígido}}} - Ct_{\text{promedio}_{\text{gen referencia rígido}}}$$

donde Ct (*cycle threshold*) es el ciclo en la cual la fluorescencia generada en la reacción pasa el *background* (umbral) de fluorescencia y la cantidad de amplicón comienza a ser detectable.

3.8. Cálculo de la expresión relativa mediante el algoritmo de Pfaffl

El otro método elegido para calcular el cambio en la expresión génica fue el de Pfaffl⁵³. Este depende de la eficiencia de los cebadores y se sugiere que para poder comparar los resultados obtenidos de la cuantificación por qPCR, la eficiencia de los cebadores que amplifican el gen blanco debe ser similar a la de los que amplifican el gen de referencia. Se utiliza la siguiente ecuación

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Eficiencia primer}_{gen\ en\ estudio}^{\Delta Ct_{gen\ en\ estudio}}}{\text{Eficiencia primer}_{gen\ referencia}^{\Delta Ct_{gen\ referencia}}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{nativo} - Ct_{rígido}$$

ya sea para el gen de referencia o el gen en estudio.

3.9. Cálculo de la expresión relativa utilizando el software REST

El programa REST (Relative Expression Software Tool, REST 2009) fue diseñado por Pfaffl y colaboradores⁵⁴, basándose en algoritmo previamente publicado por el grupo⁵³. El mismo permite calcular la expresión relativa de los genes blanco usando dos genes de referencia; siguiendo la ecuación:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Eficiencia primer}_{gen\ en\ estudio}^{\Delta Ct_{gen\ en\ estudio}}}{\text{Media geométrica (concentración del gen referencia 1, concentración del gen referencia 2)}}$$

donde $\Delta Ct = Ct_{nativo} - Ct_{rígido}$

Además, el software realiza el test de significancia de los resultados obtenidos, empleando un test estadístico mediante la aleatoriedad (o permutación) de valores obtenidos, de modo que no está restringido al tipo de distribución de los datos. El test se basa en la hipótesis nula (H_0) de que el tratamiento no tiene efecto sobre la expresión génica del gen blanco; de ser cierta, la H_0 a rechazar sería que los valores obtenidos con el gen blanco son similares a los obtenidos con los genes de referencia,

permitiendo así relocalizar los datos entre los grupos repetidamente (>2000 iteraciones) y contar el número de veces en que la expresión relativa de los grupos formados aleatoriamente es mayor a la expresión relativa real, proporcionando un buen valor estimativo de p .

3.10. Análisis estadístico

Para determinar si los valores de ΔCt obtenidos de los genes blanco eran significativamente diferentes a los obtenidos con las muestras no tratadas se llevó a cabo el test no-paramétrico de Mann–Whitney U test (2 colas, $\alpha = 0,05$), el cual no requiere el supuesto de que los datos presentan una distribución normal. Para el análisis estadístico y la realización de las gráficas se empleó el programa GraphPad Prism versión 6.01 (Graph Pad Software, Inc.; www.graphpad.com).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Selección de cebadores para los genes blanco y de referencia

Para estudiar cómo la acumulación de AGEs en el microambiente induce una transición epitelio-mesenquimal de las células epiteliales prostáticas en los cultivos en 3D, se analizaron los cambios en la expresión del gen de adhesión epitelial E-caderina y de los genes marcadores del fenotipo mesenquimal β 1-integrina, N-caderina, SNAI 1 y 2; así como cambios en la expresión del gen de la cadena liviana de miosina 2 (MLC2) responsable del aparato contráctil celular. Debido a la sensibilidad y especificidad de la técnica de RT-qPCR, la misma se ha convertido en una de las favoritas para la cuantificación de ADNc; sin embargo, una consecuencia de su elevada sensibilidad es que pequeñas variaciones de ARNm extraído, o ADNc producido, generan grandes diferencias en los valores finales de los productos del qPCR. Para determinar si las diferencias observadas en la expresión de los genes blanco son debidas a cambios en la expresión del ARNm por el tratamiento, y no por variaciones generadas por la técnica, se realiza una normalización interna⁵⁵ de los resultados mediante la amplificación de ADNc de genes de referencia (*housekeeping*)^{56,57, 58}. Para la selección de los genes *housekeeping* la expresión de los mismos debe mantenerse constante y no verse afectada por el tratamiento realizado⁵⁹. Tampoco deben expresarse poco, teniendo un Ct muy elevado (Ct>30) o

expresarse mucho ($Ct < 15$).⁶⁰ La utilización de más de un gen de referencia se ha demostrado que ayuda a la correcta medición en cambios de expresión de los genes blanco^{61,62}. Por este motivo partimos de tres posibles candidatos: β actina, GAPDH (*Glyceraldehyde 3- phosphate dehydrogenase*) y TBP (*TATA binding protein gene*), genes que normalmente se emplean como referencia y que se ha visto que la expresión de los mismos se mantiene constante en diferentes tejidos.⁶¹

Para cada gen blanco y de referencia fueron diseñados más de un par de cebadores esquematizados en las Figura 19 y Figura 20 del Anexo III y listados en las Tabla 6 y Tabla 7, respectivamente. Estos fueron diseñados teniendo en cuenta varias consideraciones. Una de ellas fue que los mismos quedaran entre dos exones de manera de poder distinguir una contaminación con ADN genómico. Otra consideración muy importante fue que el par de cebadores no formaran hetero-dímeros por complementariedad de bases. De hacerlo, las moléculas de SYBR Green I en la reacción de PCR podrían unirse a los dímeros formados y emitir señal imposible de diferenciar a la generada por la producción del amplicon⁶³. Por esa misma razón, se analizó además si cada cebador es capaz de generar estructuras secundarias en forma de horquilla u homo-dímeros. En los pocos casos donde se observó la posibilidad de formación de estructuras secundarias las mismas presentaron un ΔG mayor a $-3,5$ kcal mol, necesitándose muy poca energía para romper las mismas. Además, se analizó la posibilidad de que los amplicones

formaran estructuras secundarias; en este caso se consideró que los amplicones no formaran estructuras secundarias con una T_m mayor a la del apareamiento de los *primers*. Como se ve en las Tabla 6 y Tabla 7, algunos pares de cebadores amplifican una región que es capaz de formar estructuras secundarias con la misma T_m o con una T_m un poco superior a la de los cebadores. Luego, nos aseguramos que los *primers* diseñados presentaran un tamaño, porcentaje de GC y T_m semejante, además de que los mismos pudieran amplificar las diferentes isoformas de los ARNm a levantar y que los tamaños de los amplicones fueran similares. Sin embargo, esto no es suficiente para asegurar el éxito del par de cebadores, por lo que previamente al análisis de las muestras se testearon las distintas parejas para demostrar su especificidad.

Tabla 6- Cebadores diseñados para los genes blanco.

Las características de los mismos y de sus productos de amplificación. Resaltados se indican los pares de cebadores elegidos para determinar los cambios en la expresión relativa debido a la acumulación de AGEs en la MBr.

Gen	Cebadores							Amplificación	
	Nombre	Direc.	Secuencia	pb	Tm	% GC	Región de hibridización	pb	Estruct. Secund.
Ecaderina	Ecad_1	D	ATTTTCCCTCGACACCCGAT	21	59,4	47,62	CDH1_201:3/3	109	No
	Ecad_2	R	TCCAGGCGTAGACCAAGA	19	59,5	57,89	CDH1_202:3/3 CDH1_212:3/3		
	Ecad_3	D	CCATCTTTGTGCCTCCTGAA	20	58,4	50,0	CDH1_201	140	Si
	Ecad_4	R	GGCAGTGTCTCTCCAATCC	20	60,5	55,0	CDH1_202 CDH1_212:11/12		
	Ecad_5	D	ATCACATCCTACACTGCCCA	20	58,4	50,0	CDH1_201	148	No
	Ecad_6	R	CAAAATCCTCCCTGTCCAGC	20	60,5	55,0	CDH1_202 CDH1_212:11/12		
N-caderina	Ncad_1	D	GTGCTGATGTTTGTGGTATGG	21	59,4	47,62	CDH2_201	150	No
	Ncad_2	R	GCTCAAGTCATAGTCTGGTC	21	61,3	52,38	CDH2_202:14/15		
	Ncad_3	D	AGCCAACCTTAAGTGGAGGAGT	21	59,4	47,62	CDH2_201	136	Si
	Ncad_4	R	GGCAAGTTGATTGGAGGGATG	21	61,3	52,38	CDH2_204 CDH2_202 CDH2_205:3/4		
	Ncad_5	D	GGAGACATTGGGGACTTCATT	21	59,4	47,62	CDH2_201	90	No
	Ncad_6	R	GTCAAACACTAACAGGGAGTC	21	59,4	47,62	CDH2_202: 15/16		
$\beta 1$ Integrina	int_1	D	CCTACTTCTGCACGATGTGATG	22	62,1	50,0	ITGB1_201:4/4	128	Si
	int_2	R	CCTTTGCTACGGTTGGTTACATT	23	61,1	43,48	ITGB1_202:4/4 ITGB1_205:3/3		
	int_3	D	GGATGTTGACGACTGTTGGT	20	58,4	50,0	ITGB1_201	139	No
	int_4	R	AATTCCAGCAACCACACCAG	20	58,4	50,0	ITGB1_202:14/15 ITGB1_205: 13/14		
	int_5	R	AATTCCAGCAACCACACCAG	20	58,4	50,0	ITGB1_201	112	Si
	int_6	D	GCATCCCTGAAAGTCCCAAG	20	60,5	55,0	ITGB1_202:11/12 ITGB1_205: 10/11		
MLC2	MLC2_1	D	AAACCATTCTCAACGCATTCA	21	55,5	38,1	MYL2_201	110	No
	MLC2_2	R	CTCCTTGGAAAACCTCTCCG	20	60,5	55,0	MYL2_203:5/6		
SNAI1	SNAI1_1	D	ATGCACATCCGAAGCCACA	19	57,3	52,63	SNAI1_201:2/3	128	Si
	SNAI1_2	R	CAGTGGGGACAGGAGAAGG	19	61,7	63,16			
	SNAI1_3	D	CCTGGGTGCCCTCAAGATG	19	61,7	63,16	SNAI1_201:2/3	144	No
	SNAI1_4	R	CAGTGGGGACAGGAGAAGG	19	61,7	63,16			
SNAI2	SNAI2_1	D	GCCTCCAAAAGCCAAACTAC	21	59,4	47,62	SNAI2_201:1/2	103	No
	SNAI2_2	R	TCTCTGGTTGTGGTATGACAG	21	59,4	47,62			
	SNAI2_3	D	ACACATTAGAACTCACACGGG	21	59,4	47,62	SNAI2_201:2/3	148	No
	SNAI2_4	R	GGAGAAGGTTTTGGAGCAGTT	21	59,4	47,62			

- Ninguno de los cebadores son capaces de formar dímeros (homo- o hetero-dímero) o estructuras de hebillas (*hairpin*) cuyo $\Delta G < -3.5$ kcal mol, considerándose aceptables.
- D = primer directo, R = primer reverso; Tm = temperatura de disociación (*melting temperature*) expresada en C°; Estruct. Secun. = estructuras secundarias del amplificación; Región de hibridización (región de *annealing*): nombre de gen/ n° isoforma/ exón al que se une, ejemplo CDH1_201:11/12= gen de Ecaderina, isoforma 201, primer se une en exones 11 y 12.

Tabla 7- Cebadores diseñados para los genes de referencia.

Las características de los mismos y de sus productos de amplificación. Resaltados se indican los pares de cebadores elegidos para amplificar al gen de referencia en cuestión.

Gen	Cebadores							Amplicón	
	Nombre	Direc.	Secuencia	pb	Tm	% GC	Región de hibridización	pb	Estruct. Secund.
Actina	Act_1	D	CACCCAGCACAAATGAAGATCA	21	59,4	47,62	ACTB_204, ACTB_201:6/7ACT B_201:5/6	131	No
	Act_2	R	CTCGTCATACTCCTGCTTGC	20	60,5	55,0			
	Act_3	D	CGACAGGATGCAGAAGGAGA	20	60,5	55,0	ACTB_204, ACTB_201:6/7	150	No
	Act_4	R	TGCTTGCTGATCCACATCTG	20	58,4	50,0			
GAPDH	GAPDH_1	D	TGTGGGCATCAATGGATTTGG	21	59,4	47,62	Para células espermáticas	116	
	GAPDH_2	R	ACACCATGTATTCCGGGTCAAT	22	60,3	45,45			
	GAPDH_3	D	TGGTATCGTGAAGGACTCA	20	58,4	50,0	GAPDH_201, GAPDH_205, GAPDH_204, GAPDH_202, GAPDH_203, GAPDH_211: 7/8	123	Si
	GAPDH_4	R	GCAGGGATGATGTTCTGGAG	20	60,5	55,0			
	GAPDH_5	D	TGACAACAGCCTCAAGATCA	20	56,4	45,0			
	GAPDH_6	R	GATGATGTTCTGGAGAGCCC	20	60,5	55,0			
TBP	TBP_1	D	CCACTCACAGACTCTCACAAC	21	61,3	52,38	TBP_207:3/3	127	No
	TBP_2	R	CTGCGGTACAATCCCAGAACT	21	61,3	52,38			
	TBP_3	D	TGAGCCAGAGTTATTTCTGG	21	59,4	47,62	TBP_201TBP_202 :7/8 TBP_205 TBP_206 TBP_207 TBP_208: 8/9	142	No
	TBP_4	R	AGGGTAGATGTTTTCAAATGCTT	23	57,5	34,78			
	TBP_5	D	AATATGGTGGGAGCTGTGA	20	58,4	50			
	TBP_6	R	CCAGGAAATAACTCTGGCTCA	21	59,4	47,62			
						TBP_201 TBP_202 TBP_205 TBP_206 TBP_207 TBP_208: 7/8	101	No	

- Ninguno de los cebadores son capaces de formar dímeros (homo- o hetero-dímero) o estructuras de hebillas (*hairpin*) cuyo $\Delta G < -3.5$ kcal mol, considerándose aceptables
- D = primer directo, R = primer reverso; Tm = Temperatura de disociación (*melting temperature*) expresada en C°; Estruct. Secun. = estructuras secundarias del amplicón
- Región de hibridización (región de *annealing*): nombre de gen/ n° isoforma/ exón al que se une, ejemplo ACTB_204:6/7= gen de β 1actina, isoforma 204, primer se une en exones 6 y 7.

Para la selección de los cebadores de β 1actina, GAPDH, β 1integrina, MLC2 y Ecaderina, se realizó un análisis de disociación de alta resolución (*High Resolution Melting*, HRM) usando como molde ADNc obtenido de

cultivos en 2D (diluciones seriadas). El HRM nos brindó información del ciclo umbral (Ct, *Cycle threshold*) de cada reacción y de la cantidad de productos generados. Esto se ve en dos gráficos diferentes obtenidos en este estudio: la curva de amplificación y la curva de disociación. La curva de amplificación nos indica el Ct de cada reacción, es decir el ciclo en el cual la cantidad de ADN amplificada es el suficiente para emitir una fluorescencia que supere el valor base. Este Ct nos da una idea de la cantidad de muestra inicial de la cual partimos; a mayor cantidad de ADN al inicio de la reacción menor será el valor Ct observado⁵¹. La segunda curva, curva de disociación, es la que nos brinda información acerca de los productos obtenidos, nos informa de la especificidad de la reacción. En la gráfica de disociación se espera ver un solo pico, el cual correspondería al producto esperado. Si otro pico apareciese en la gráfica podría deberse a la baja especificidad de los cebadores, ya que serían capaces de unirse a otra región de la secuencia y amplificarla. El pico también podría ser por la formación de dímeros de cebadores, los cuales aparecen a una temperatura menor, debido a su tamaño⁵⁷. Para la selección de nuestros cebadores tuvimos en cuenta la información de estas gráficas, buscamos pares de cebadores que tuvieran un bajo Ct y que presentaran solo un pico de amplificación.

Todos los pares de cebadores diseñados para los genes de referencia, β 1actina y GAPDH, fueron analizados por HRM. En la Figura 7 se muestran las gráficas obtenidas con este análisis para los pares de

cebadores seleccionados para continuar con el estudio, denominados β 1actina primer 1 y 2 (β 1actina 1/2), y GAPDH cebadores 3 y 4 (GAPDH 3/4). En ambos casos la curva de disociación presenta un único pico a 83,4°C para el par β 1actina 1/2 y 84,1 °C para el set GAPDH 3/4 (Figura 7A y D, respectivamente). Además, las curvas de amplificación mostraron un valor de Ct bajo, de 21,16 y 18,74 para el par β 1actina1/2 y GAPDH 3/4, respectivamente (Figura 7B y E). Para verificar que el único pico observado en la curva de amplificación corresponde al tamaño del amplicón deseado, se corrió el producto del qPCR en un gel de agarosa 2% (Figura 7C y F). De acuerdo a lo esperado, se observó una única banda de amplificación del tamaño deseado, 131 pb para β 1actina (Figura 7C) y 123pb para GAPDH (Figura 7F), confirmando el resultado obtenido con la curva de disociación.

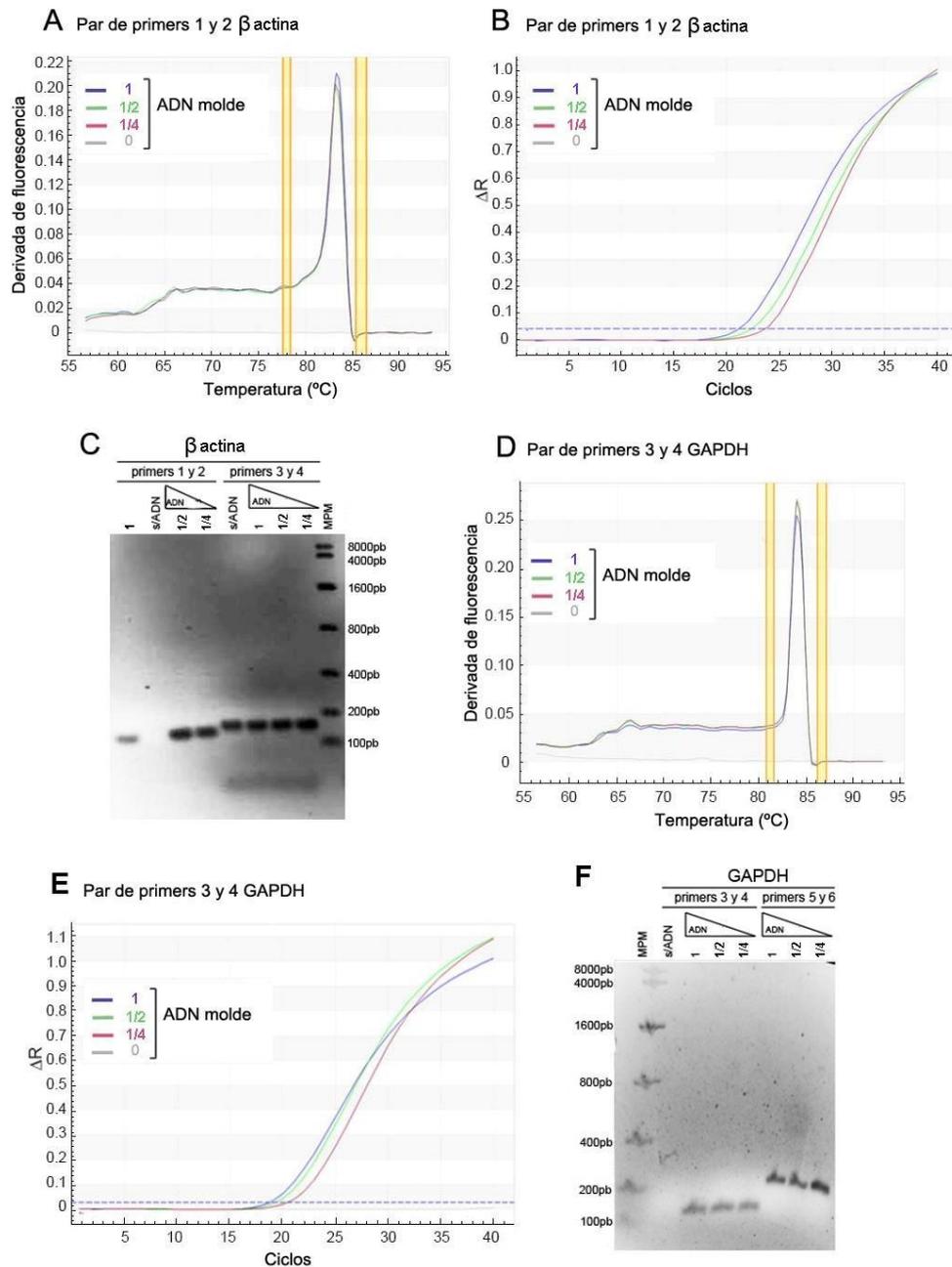


Figura 7- Par de cebadores seleccionados para los genes de referencia GAPDH y β 1actina.

Se muestra solamente el par de cebadores seleccionado para continuar con el estudio: para el gen de referencia β 1actina los cebadores 1 y 2, para GAPDH los cebadores 3 y 4. **A**, Curva de disociación obtenida con el set 1 y 2 para β 1actina. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura ($-dRFU/dT$). **B**, Curva de amplificación con los cebadores 1 y 2 del gen de β 1actina. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)- fluorescencia de background. **C**, Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los pares de primers 1/2 (131 pb) y 3/4 (150pb) de β 1actina. Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular. Paneles **D** y **E**, igual que los paneles **A** y **B** pero para el par de primers 3 y 4 del gen GAPDH. **F**, Resolución de los amplicones obtenidos con los pares de cebadores 3/4 (123 pb) y 5/6 (120 pb) para el gen GAPDH. Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

Aunque las curvas de disociación obtenidas con las otras parejas de cebadores para β 1actina y GAPDH presentaban un único pico, (Figura 15, Anexo III), estas no fueron seleccionadas ya que presentaban un Ct más elevado que las parejas elegidas ($Ct_{\beta 1actina}$ primer 3 y 4 = 21,22; Ct_{GAPDH} 5 y 6 = 19,39). Otro motivo por el cual se excluyó a la pareja 3 y 4 de β 1actina es que se observaba en el gel otra banda de menor tamaño, posiblemente de dímeros de *primers*. En el caso del par de cebadores 1 y 2 de GAPDH, este no se utilizó ya que era específico para células espermáticas. Por último, el tercer gen de referencia propuesto fue la proteína de unión a TATA (*TATA Binding Protein*, TBP), esta fue descartada ya que en todos los casos el Ct era elevado, siendo de 33, 30, 31 para los pares 1 y 2, 3 y 4, 5 y 6 respectivamente, ($Ct \geq 30$), como se muestran en la Figura 16 mostrada en el Anexo III.

Para el caso de los genes en estudio, Ecaderina, β 1integrina y MLC2 se tuvieron en cuenta las mismas consideraciones: la presencia de un pico único en la gráfica de disociación y un amplicón del tamaño esperado. En el caso de Ecaderina la pareja de cebadores elegida fue la 5 y 6, presentando un pico en la curva de disociación ($T_m = 81,2^\circ\text{C}$, Figura 8A) y un valor de Ct de 34 asociado a la curva de amplificación (Figura 8B); además la corrida electroforética de los productos de PCR mostró una única banda del tamaño esperado (148 pb, Figura 8C). Al igual que con Ecaderina, la pareja de *primers* elegida para β 1integrina fue 5 y 6, presentando un valor de $T_m = 81^\circ\text{C}$ (Figura 8D), un Ct de la

reacción de 31,8 (Figura 8E) y una única banda en el gel de 112 pb (Figura 8F). Para el caso de MLC2 solo se pudo diseñar una pareja de cebadores, 1 y 2, la cual presenta un valor de $T_m = 81,4^\circ\text{C}$ (Figura 8G) y en la reacción mostró un valor de Ct de 31,7 (Figura 8H), observándose una banda específica de 110pb (Figura 8I).

Los otros pares de cebadores para Ecaderina no fueron seleccionados debido a que presentaban un Ct mayor a 34, o bien aparecía un segundo pico en la curva de disociación como en el caso del par 3 y 4, como se observa en la Figura 17 de Anexos III. Para el caso de $\beta 1$ integrina, los otros pares de cebadores fueron descartados debido a que el Ct del par 1 y 2 era cercano a los 36, y el del par 3 y 4 de 31. En ambos casos las curvas de disociación presentaban un segundo pico, aunque en el gel de agarosa fuera poco visible el producto de este segundo pico (Figura 18, en el Anexo III).

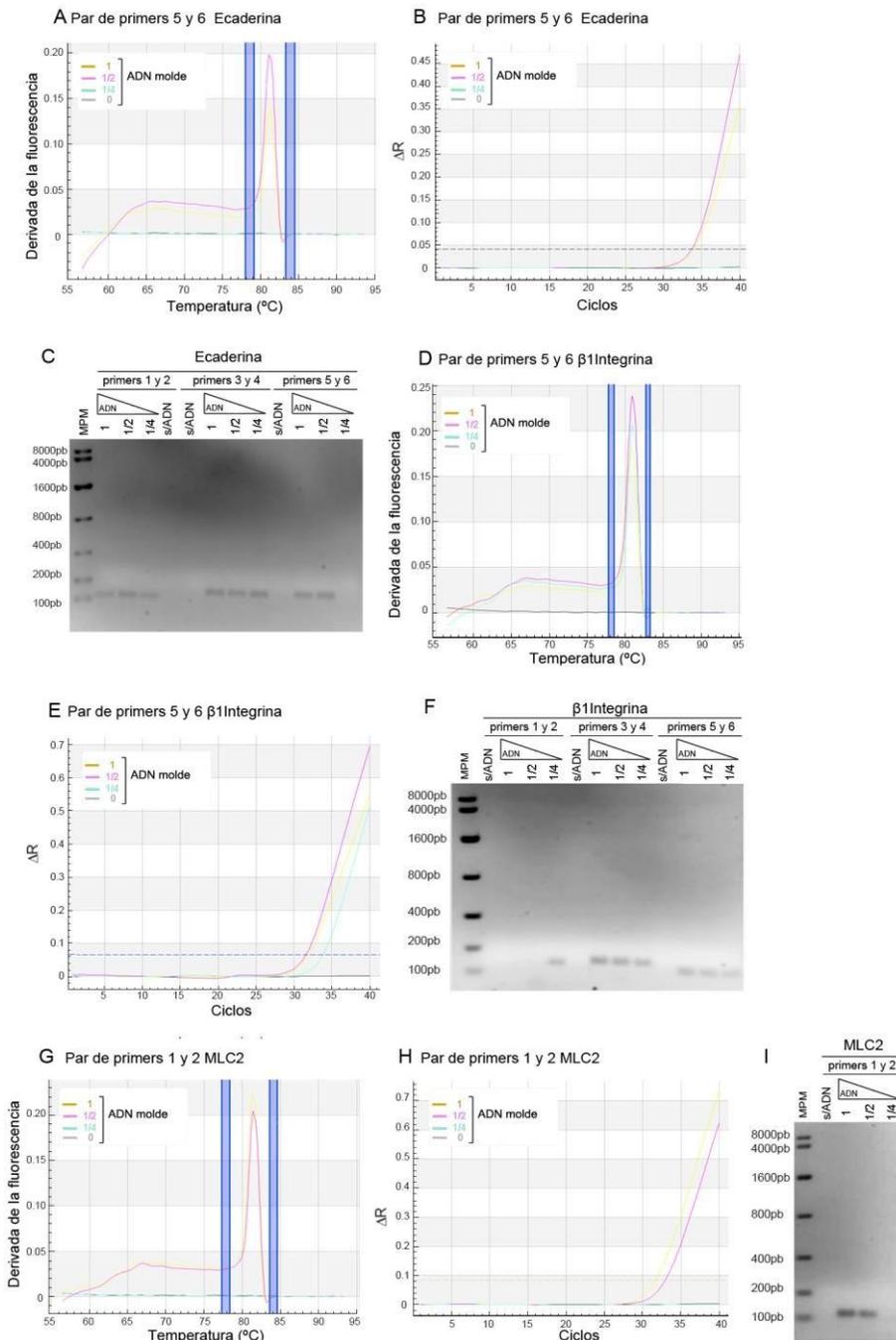


Figura 8- Parejas de cebadores seleccionadas para amplificar Ecaderina, β 1Integrina y MLC2.

La imagen muestra solamente las curvas de disociación y amplificación de las parejas de *primers* seleccionadas para los genes Ecaderina y β 1Integrina. **A**, Curva de disociación obtenida para el par de *primers* seleccionado 5 y 6 de Ecaderina. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura (-dRFU/dT). **B**, Curva de amplificación para los cebadores 5 y 6 de Ecaderina. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)- fluorescencia de *background*. **C**, Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los pares de *primers* 1/2 (109 pb), 3/4 (140 pb) y 5/6 (148 pb) para el ADNc de Ecaderina. Paneles **D-E** y **G-H**, igual que los paneles **A** y **B** pero para el par de *primers* 5 y 6 para β 1Integrina y *primer* 1 y 2 para MLC2, respectivamente. **F**, Amplicones obtenidos con los pares de cebadores 1/2 (128 pb), 3/4 (139 pb) y 5/6 (112 pb) para β 1Integrina. **I**, Productos de qPCR con *primers* 1 y 2 (110 pb) MLC2. Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

Una vez seleccionadas las parejas para los cebadores de GAPDH, β actina, Ecaderina, β 1integrina y MLC2, se realizó la cuantificación relativa con diluciones seriadas de muestras de ADNc obtenidas de cultivos en 3D de acinos protáticos sobre una MBr nativa o rígida. De esta manera, se pudo determinar que la cantidad de ADN necesaria para obtener valores de Ct menores de 30 sin inhibidores de la reacción se adquiere mediante la dilución 1/4 del ADNc concentrado.

Los pares de cebadores para amplificar los genes marcadores mesenquimales (Ncaderina, SNAI 1 y 2) fueron diseñados en etapas más avanzadas de la pasantía, dónde ya teníamos muestras de ADNc obtenidas de los cultivos en 3D de acinos crecidos en MBr nativo y MBr rígida. De modo que para la selección del par de cebadores para amplificar el ADNc de Ncaderina y SNAI 1 y 2 se realizaron cuantificaciones relativas con diluciones seriadas de las muestras. Luego de probar diferentes diluciones, se observaron valores de Ct por encima del umbral (y menores a Ct = 30) en las reacciones con diluciones seriadas de la muestra desde concentrada hasta 1/8, determinándose que los pares de cebadores que presentaban un solo pico y un valor de Ct más bajo fueron: 1 y 2 para N-caderina, 3 y 4 para SNAI 1 y para SNAI 2. Para confirmar que las parejas de *primers* seleccionadas eran adecuadas, se realizó la cuantificación relativa con las tres parejas empleando la muestra concentrada para obtener mejores valores de Ct (Figura 9). En los tres casos los resultados revelaron un único pico de amplificación,

observándose para el par 1 y 2 Ncaderina una $T_m = 77,8$ °C (Figura 9A), para el par 3 y 4 SNAI 1 una $T_m = 85,9$ °C (Figura 9C) y por último, para el par 3 y 4 SNAI 2 una $T_m = 80,8$ °C (Figura 9 E). Las curvas de amplificación que se obtuvieron con la muestra concentrada mostraron unos valores de Ct de 23,82 (Figura 9B), 28,11 (Figura 9D), 18,22 (Figura 9F) para las reacciones de amplificación de los ADNc de Ncaderina, SNAI1 y 2, respectivamente. Además, como se puede ver en la Figura 9G, con las tres parejas de cebadores se obtuvieron un único producto de amplificación del tamaño esperado (150 pb para Ncaderina, 144 pb para SNAI 1 y 148 pb para SNAI 2), sugiriendo especificidad en la reacción de amplificación. La Figura 21 en el Anexo III muestra un esquema de las parejas de *primers* elegidas para realizar la cuantificación relativa de los genes blanco y los de referencia. Cabe destacar que las reacciones de cuantificación con las parejas de cebadores para amplificar el ADNc de GAPDH, β 1actina, Ecaderina, β 1integrina y MLC2 se realizaron de aquí en más con la muestra diluida al cuarto, mientras que las reacciones de qPCR con los *primers* para amplificar Ncaderina, SNAI1 y SNAI2 se llevaron a cabo con la muestra concentrada, debido a que con estas concentraciones se tenía una diferencia de un ciclo comparada con la dilución anterior y posterior respectivamente.

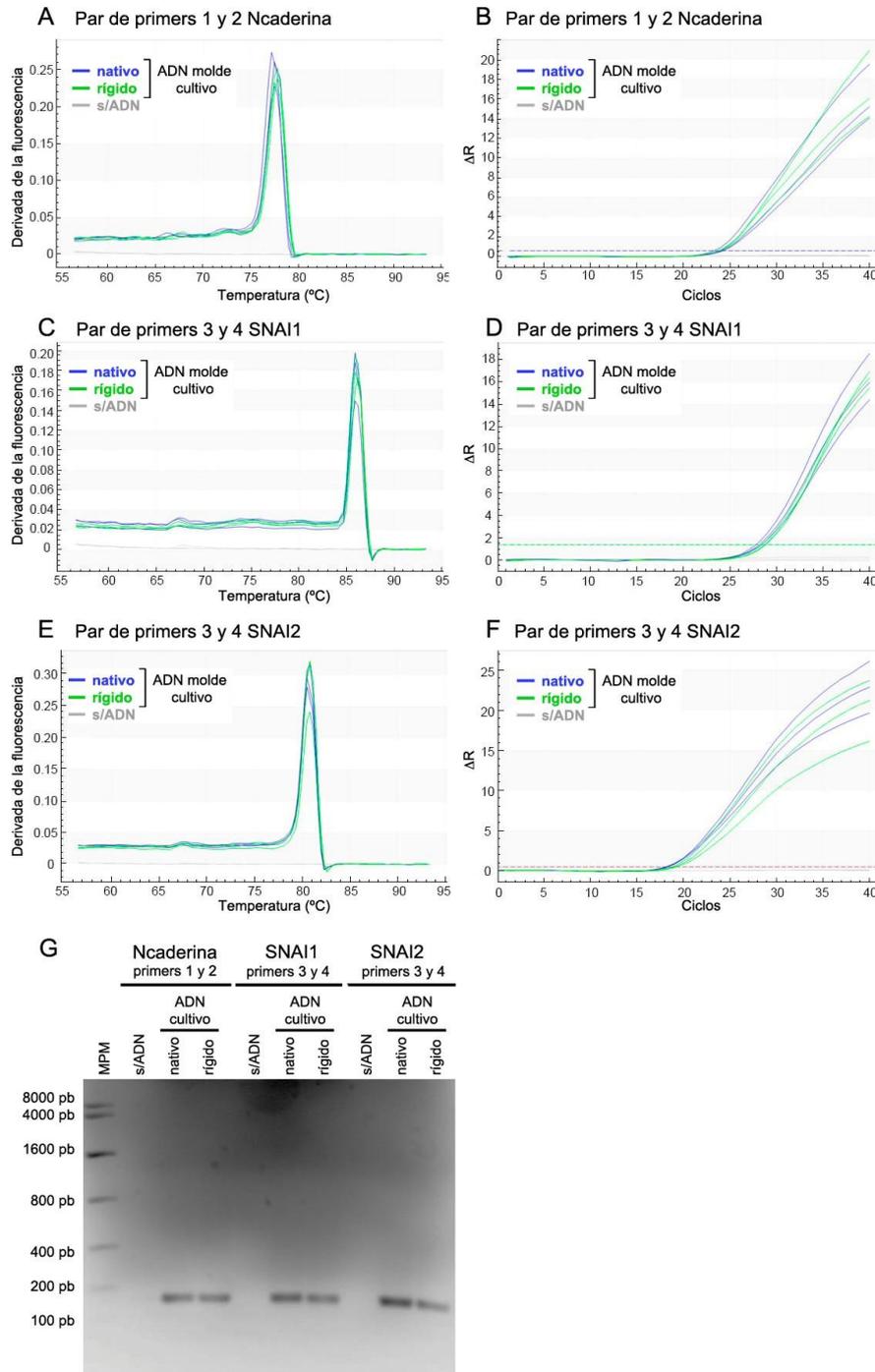


Figura 9-Parejas de cebadores seleccionadas para amplificar Ncaderina, SNAI 1 y SNAI 2.

A, C y E, Curva de disociación para las parejas de cebadores seleccionadas: 1 y 2 para Ncaderina, 3 y 4 para SNAI1 y SNAI 2. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura (-dRFU/dT). **B, D y F,** Curva de amplificación para los pares de cebadores elegidos. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)-fluorescencia de background. **G,** Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los ADNc producidos a partir de los cultivos sobre MBr nativa o rica en AGEs y los pares de primers 1/2 de Ncaderina (150 pb), 3/4 de SNAI 1 (144 pb) y 3/4 para SNAI 2(148 pb). Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

4.2. Cálculo del cambio en la expresión génica mediante el método $\Delta\Delta C_q$.

Para poder determinar los cambios en la expresión génica de los marcadores tanto epiteliales como mesenquimales, se realizaron tres replicas biológicas de los cultivos en 3D de los acinos prostáticos sobre MBr nativa o rígida. Además, se realizaron tres réplicas experimentales para la cuantificación relativa de cada gen en cada tratamiento, disminuyendo la probabilidad de obtener inferencias equivocadas por errores de manipulación. Debido a que la técnica de qPCR es muy sensible se incluyó en cada reacción el colorante ROX para normalizar los valores obtenidos con el equipo Eco™ Real-Time PCR System (Illumina). El colorante viene incluido en el Kit (SYBR Green PCR) empleado para realizar la reacción y su función es la de normalizar las variaciones del camino óptico entre los pocillos de la placa⁵⁷. ROX es un normalizador pasivo que no afecta la reacción de qPCR, emitiendo una señal de fluorescencia constante e independiente de la cantidad de ADN doble cadena producida en el pocillo durante los ciclos de amplificación, siendo una manera de normalización interna entre los pocillos⁶⁴.

Otro tipo de normalización es utilizar genes de referencia, los cuales deben cumplir con ciertas características. Una de ellas es que la expresión de los mismos no varíe con el tratamiento, de modo que en una primera instancia se verificó que la expresión de los genes de referencia

seleccionados, β 1actina y GAPDH, no cambiara con la acumulación de glicotoxinas en el microambiente celular. Para ello se compararon los valores de Ct obtenido luego de procesar 1 μ g de ARNm total obtenidos de los cultivados sobre la MBr nativa versus los obtenidos sobre la MBr rígida (Figura 10). No se observaron diferencias significativas entre los valores de Ct obtenidos para GAPDH y β 1actina a partir de las muestras de los cultivos nativos versus ricos en AGEs ($p = 0,976$ para GAPDH y $p = 0,347$ para β 1actina, (Figura 10A). Para el gen de referencia GAPDH los valores promedio de Ct con sus desvíos estándar fueron: $15,20 \pm 0,84$ en condiciones nativas y $15,17 \pm 0,38$ en cultivos rígidos (Figura 10B). Del mismo modo, los valores promedio de Ct para el gen de referencia β 1actina fueron $15,95 \pm 1,18$ y $15,52 \pm 1,29$ en condiciones nativas y rígidas, respectivamente (Figura 10B). Los resultados obtenidos mostraron un cambio en el valor de Ct menor a un ciclo de amplificación entre las reacciones generadas a partir de los cultivos tratados y no tratado, por lo que concluimos que el tratamiento no afecta ni la expresión de β 1actina, ni la de GAPDH, y los genes pueden ser utilizados como referencia.

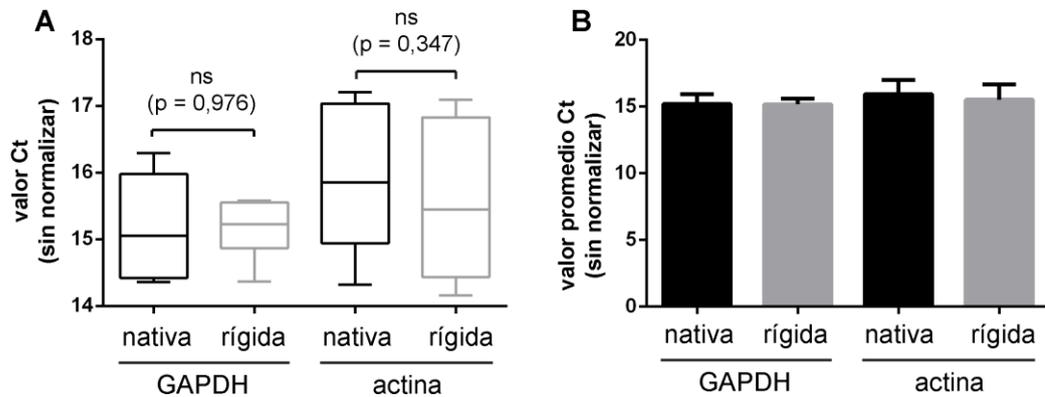


Figura 10 – El tratamiento de la MBr con glicolaldehído no afecta la expresión de los de los genes de referencia GAPDH y β actina.

A, Diagrama de cajas y bigotes (box-whisker plot) de los valores de Ct obtenidos con los cebadores para GAPDH y β 1actina en condiciones de cultivos sobre una MBr nativa o rica en AGEs. Percentiles 25, 50 y 75; ns, no significativo. **B**, Gráfico de barras del valor promedio de Ct \pm desvío estándar. Los datos fueron obtenidos a partir de tres réplicas biológicas, cada una con tres réplicas experimentales. Test no-paramétrico de Mann-Whitney U test (2 colas, $\alpha = 0,05$).

Una vez que se generaron los dos cultivos diferentes, nativo y rívido, por triplicado, se realizó la extracción de ARN y el mismo fue cuantificado de manera de comprobar que su calidad era buena y no presentaba inhibidores provenientes de la extracción. Este es un paso fundamental a la hora de la amplificación ya que un ARN degradado no es buen molde y la unión de los *primers* tal vez no ocurra. Se considera ARN puro a aquel cuya relación 260/280 es cercana a 2, de ser menor implica que hay contaminación de proteínas u otros contaminantes que absorben cerca de los 280nm⁶⁵. Otro control de pureza del ARN es la relación 260/230, que indica contaminaciones con fenoles o componentes que absorben a 230 nm si la misma es menor a 2. Las relaciones 260/280, 260/230 que obtuvimos para las tres réplicas se describen en la Tabla 8.

Tabla 8- Información de la calidad del ARN de los diferentes cultivos.

	Relación 260/280	Relación 260/230
1 cultivo 3D MBr nativa (no tratada)	2.02	2.22
1 cultivo 3D MBr rígida (tratada)	2.02	1.77
2 cultivo 3D MBr nativa (no tratada)	2.01	1.85
2 cultivo 3D MBr rígida (tratada)	1.96	1.86
3 cultivo 3D MBr nativa (no tratada)	2.01	1.81
3 cultivo 3D MBr rígida (tratada)	2.02	1.89

Una vez comprobado que el ARN era de buena calidad y de realizados los RT-qPCR por triplicado con las parejas de *primers* seleccionadas, el siguiente paso fue el análisis de datos obtenidos. El primer método empleado para calcular la expresión relativa de los genes blanco fue el desarrollado por Livak⁵² y colaboradores, también conocido como el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. A diferencia de los otros algoritmos que veremos más adelante, este método no tiene en cuenta la eficiencia de amplificación de las parejas de cebadores para el cálculo de la expresión relativa. El mismo supone que los *primers*, tanto como para los ADNc de referencia como los *primers* de los ADNc blancos, tienen una eficiencia de amplificación similar; es decir que el incremento de producto obtenido después de cada ciclo sea similar. Un porcentaje de amplificación de 100%⁵¹, o factor de amplificación igual a 2, implica que en cada ciclo de amplificación el 100% de las moléculas de ADNc molde se copia. Se considera un buen porcentaje amplificación de una pareja de *primers* aquel que varía entre un 90-110% (factor de amplificación entre 1,9-2,1)⁴⁹. Para verificar si las parejas de los cebadores presentaban eficiencias adecuadas se realizó una curva de calibración para los

diferentes genes empleando diluciones seriadas de la muestra 3D nativa para los genes de referencia, Ecaderina, MLC2 y β 1integrina; mientras que para los genes Ncaderina, SNAI1 y SNAI2 se utilizó la muestra obtenida del cultivo rígido, partiendo desde una muestra concentrada hasta una dilución de 1/8. Cada dilución de la curva se hizo por duplicado para obtener un valor más exacto. Una vez hechas las curvas de calibración para cada pareja, con el logaritmo de la concentración de la muestra en el eje de las abscisas y los valores de Ct obtenidos en el eje de las ordenadas⁵⁵; se calcula la pendiente de las gráficas (constante de amplificación) para luego determinar la eficiencia de los cebadores utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\text{Factor Amplificación} = E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

$$\text{Porcentaje de amplificación} = (E - 1) \times 100$$

Los valores obtenidos (Tabla 9) mostraron que tan sólo las parejas de *primers* para amplificar el ADNc de β 1integrina, MLC2 y Ncaderina presentaron una eficiencia de amplificación en el rango esperado ($1,9 < E < 2,1$), donde el factor de amplificación fue igual a 2,07, 1,98 y 1,95, respectivamente. Por otro lado, los cebadores empleados para los genes de referencia presentaron diferencias importantes en sus eficiencias de amplificación ($E_{\text{GAPDH}}=2,45$ y $E_{\beta\text{lactina}}=1,85$) que, aunque no se encontraron entre los valores deseados, podrían elegirse diferencialmente

para normalizar los datos obtenidos para los genes blanco con eficiencia de amplificación semejante. Es decir, GAPDH podría ser mejor gen de referencia para los genes Ecaderina ($E_{Ecad}=2,85$), SNAI 1 ($E_{SNAI1}=2,66$) y SNAI 2 ($E_{SNAI2}=2,40$), cuyos *primers* presentaron una eficiencia de amplificación semejante a los de GAPDH ($E_{GAPDH}=2,45$); mientras que los resultados obtenidos para β 1integrina ($E_{\beta 1Integrina}=2,07$), MLC2 ($E_{MLC2}=1,98$) y Ncaderina ($E_{Ncad}=1,95$) podrían ser preferiblemente normalizados con β 1actina ($E_{\beta 1actina}=1,85$), ya que su eficiencia de amplificación los hace más comparables.

Tabla 9- Eficiencias de amplificación de las parejas de cebadores seleccionadas

Parejas de cebadores	Curva de amplificación		Eficiencia de amplificación	Porcentaje amplificación
	Pendiente	R2		
3 y 4 para GAPDH	-2,5662	0,9	2,45	145,29
1 y 2 para β 1actina	-3,7338	0,93	1,85	85,28
5 y 6 para Ecaderina	-2,2008	0,98	2,85	187,69
1 y 2 para MLC2	-3,3601	1,00	1,98	98,43
5 y 6 para β 1integrina	-3,1641	0,99	2,07	107,04
1 y 2 para Ncaderina	-3,4482	0,99	1,95	94,99
3 y 4 para SNAI1	-2,351	0,98	2,66	166,29
3 y 4 para SNAI2	-2,6293	0,95	2,40	140,06

Los problemas observados en las eficiencias de los *primers* podrían deberse a inhibidores presentes en la muestra que pueden provenir de reactivos utilizados en la extracción de ARN o del tratamiento con DNAsa I. Diseñar *primers* que se unan entre dos exones es útil para evidenciar contaminación con ADN genómico, por lo que el tratamiento con DNAsa I no sería necesario, evitando así un posible contaminante. Dado que a la hora de diseñar los *primers* esto se tuvo en cuenta, se podría obviar el

paso del tratamiento con DNAsa I, y aun así conseguir una amplificación específica. Otra manera de deshacerse de ellos es a la hora de extraer el ARN ser más cuidadosos, o también realizar una segunda extracción para sacar de la muestra los inhibidores presentes, aunque se corre el riesgo de perder material.

A pesar de las eficiencias de amplificación obtenidas, se compararon los valores de Ct promedio obtenidos de los tres experimentos y se normalizaron con los valores de Ct promedio de cada gen de referencia, luego se llevó a cabo el test no-paramétrico de Mann–Whitney U test (2 colas, $\alpha=0,05$) para determinar la significancia de las diferencias observadas (Figura 11). Independientemente de la normalización realizada, no se observaron diferencias significativas entre los valores de Ct de ninguno de los genes blanco de las muestras provenientes de los cultivos nativos y enriquecidos en glicotoxinas.

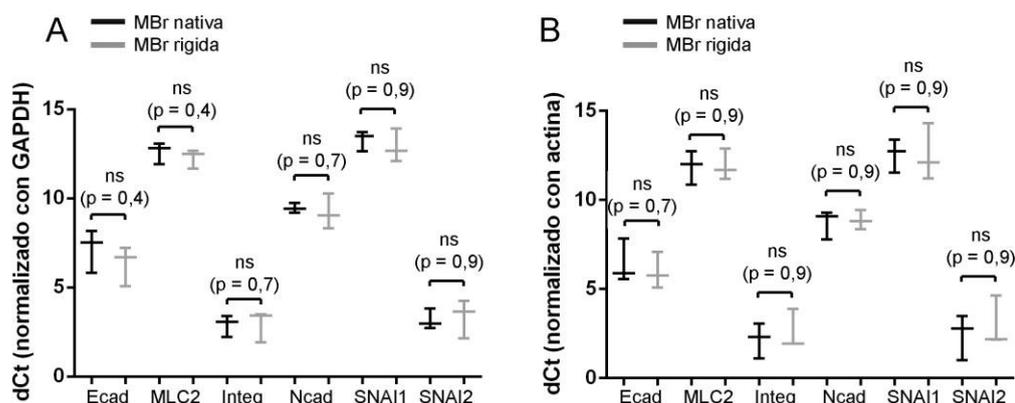


Figura 11– Comparación de los valores de Ct promedio de las réplicas experimentales obtenidas en cada cultivo.

A, Gráfico de de los Ct promedios normalizados con el gen de GAPDH. Se muestra los tres valores del promedio de los Ct obtenidos en cada uno de los tres experimentos; ns, no significativo; Test no-paramétrico de Mann–Whitney U test (2 colas, $\alpha = 0,05$). **B,** Idem que A pero normalizado con β 1actina.

Finalmente, la expresión relativa (ER) de los genes blanco se calculó siguiendo el algoritmo del método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ explicado en materiales y métodos.

Para esto se utilizó el Ct promedio de las réplicas experimentales para cada pareja de *primers* analizado anteriormente (Figura 11), el cual fue obtenido a partir de tres cultivos en 3D de acinos prostáticos crecidos sobre MBr nativa o MBr rica en AGEs. Luego de aplicar el algoritmo de Livak⁵² y colaboradores, se obtuvieron las expresiones relativas de los genes en cada experimento y se calculó la expresión relativa promedio de cada gen blanco y el desvío estándar de los resultados (Tabla 10). Los cambios en la expresión de los genes blanco debido al ambiente rico en AGEs mostraron que, independientemente del gen de referencia utilizado para normalizar, la expresión del gen de adhesión celular epitelial Ecaderina disminuye en cultivos con MBr rígida ($ER_{GAPDH} = 0,58 \pm 0,22$ y $ER_{\beta actina} = 0,76 \pm 0,32$; Tabla 10), por el contrario, se pudo apreciar un aumento leve de la expresión del factor de transcripción mesenquimal SNAI2 en los cultivos con acumulación de AGEs ($ER_{GAPDH} = 1,2 \pm 0,47$ y $ER_{\beta actina} = 1,7 \pm 0,91$; Tabla 10).

Tabla 10- Cambios en la expresión de los genes blanco en cultivos de 3D de acinos protáticos sobre una MBr rica en AGEs versus nativa.

La expresión de los genes blanco se normalizó con la de los dos genes de referencia GAPDH y β lactina.

Genes blanco	Expresión relativa promedio \pm desvío estándar	
	Normalizado con GAPDH	Normalizado con β actina
Ecaderina	0,58 \pm 0,22	0,76 \pm 0,32
MLC2	0,81 \pm 0,12	1,06 \pm 0,23
β1integrina	1,04 \pm 0,24	1,44 \pm 0,58
Ncaderina	0,92 \pm 0,47	1,27 \pm 0,75
SNAI1	0,8 \pm 0,31	1,12 \pm 0,69
SNAI2	1,2 \pm 0,47	1,7 \pm 0,91

En las gráficas observadas en la Figura 12 se presenta la expresión relativa promedio de los tres cultivos independientes (Figura 12A y C) y las tres expresiones relativas de los tres experimentos por separado (Figura 12B y D), además se delimita con una línea gris el aumento (por arriba) o disminución (por debajo) de la expresión de los genes blanco en los acinos crecidos sobre una MBr rígida tratada con glicolaldehído. En términos generales, se pudo observar una leve disminución del marcador epitelial Ecaderina, con una muy leve tendencia al aumento de la expresión de los genes marcadores del fenotipo mesenquimal (β 1integrina, Ncaderina, SNAI1 y 2) en cultivos en 3D crecidos sobre una MBr rica en AGEs (Figura 12A y C).

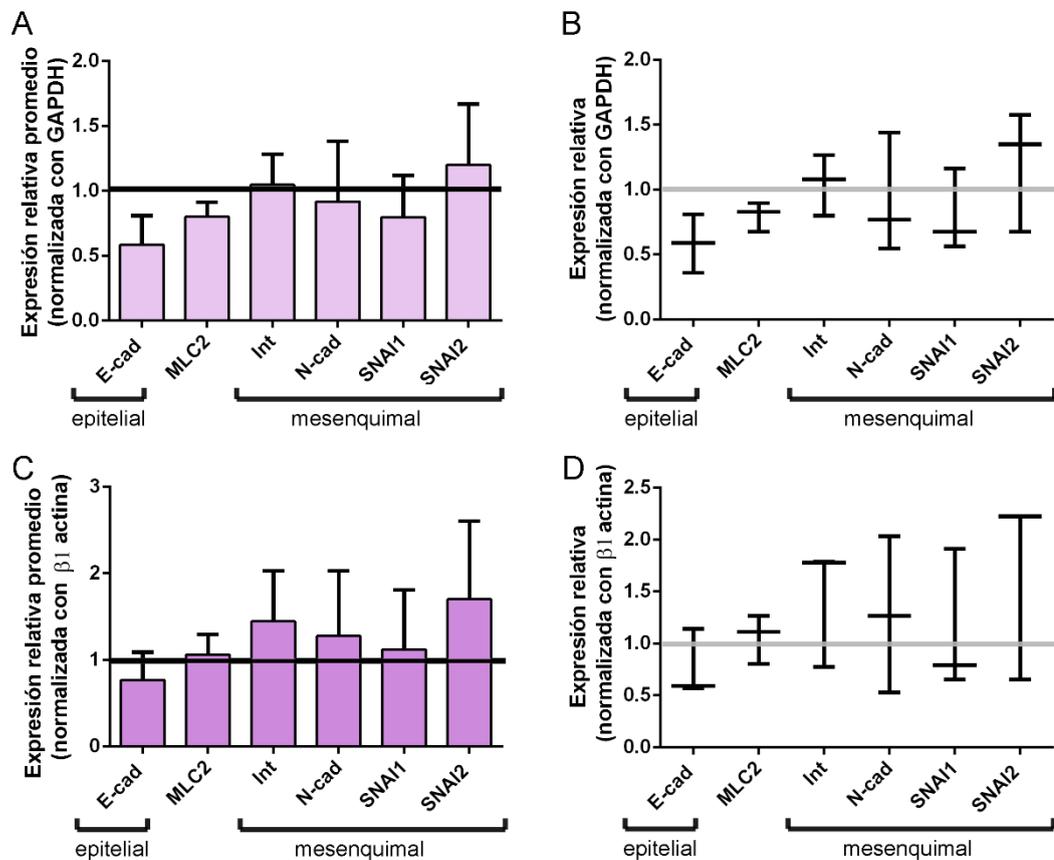


Figura 12- Expresión relativa de los genes blanco en cultivos ricos en AGEs versus nativos (método $2^{-\Delta\Delta C_t}$).

A, Expresión relativa promedio de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado; normalizada con los valores obtenidos del gen de referencia GAPDH. **B**, Gráfico de los tres valores obtenidos en los tres experimentos de expresión relativa (promedio de los triplicados de cada reacción de qPCR realizada por cultivo); normalizada con los valores obtenidos del gen de referencia GAPDH. **C** y **D**, igual que en A y B pero normalizando los valores con el gen de referencia $\beta 1$ actina. Ecad: Ecaderina, MLC2: cadena liviana de miosina 2, Integr: $\beta 1$ integrina, Ncad: Ncaderina.

Como se mencionó anteriormente, es preferible la normalización de los genes blanco con genes de referencia que presenten eficiencias de amplificación semejantes. Para el caso del marcador epitelial Ecaderina se vio una disminución de la expresión relativa promedio más marcada en los cultivos ricos en AGEs cuando se normaliza con GAPDH (Figura 12A); además, a diferencia de la normalización con $\beta 1$ actina, la expresión relativa de todos los experimentos fue menor que 1 cuando se utilizó

como normalizador GAPDH (Figura 12B), posiblemente debido a la semejanza en las eficiencias de la reacción de las parejas de *primers* para Ecaderina y GAPDH. De la misma manera, la expresión de los genes mesenquimales β 1integrina y Ncaderina aumentó en los microambientes rígidos cuando se utiliza como normalizador al gen β 1actina cuya eficiencia de amplificación es más semejante (Figura 12C y D). De acuerdo con la eficiencia de las parejas de cebadores empleadas, la mejor normalización de los datos obtenidos para factores de transcripción mesenquimales SNAI1 y SNAI2 es con el gen de referencia GAPDH; se pudo observar una tendencia al aumento de la expresión de SNAI2 en los acinos tratados, mientras que para SNAI1 una leve disminución.

En cuanto a la expresión del gen MLC2, no se observó un cambio en la expresión génica cuando se utiliza a β 1actina como normalizador, pero si se ve una leve disminución de la expresión si se utiliza GAPDH como gen de referencia, este cambio en la expresión se puede deber a la diferencia de las eficiencias de los cebadores. Por otro lado, podría ocurrir que la expresión de MLC2 no varíe con la acumulación de glicotoxinas en el microambiente, ya que la actividad de la proteína está determinada por su nivel de fosforilación y no por un aumento en su expresión génica.

4.3. Cálculo cambio en la expresión génica mediante el método de Pfaffl

Debido a que el cálculo de la expresión relativa de los genes blanco por método de Livak y colaboradores es válido cuando las eficiencias de amplificación de los *primers* de los genes blanco y los de referencia son similares, se analizaron nuevamente los datos obtenidos mediante el algoritmo presentado por Pfaffl y colaboradores⁵³. A diferencia del método de Livak y colaboradores, este método alternativo incluye en la ecuación el valor de la eficiencia de amplificación de los cebadores empleados, pudiéndose comparar pares de cebadores con distintas eficiencias:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Eficiencia primer}_{gen\ en\ estudio}^{\Delta Ct_{gen\ en\ estudio}}}{\text{Eficiencia primer}_{gen\ referencia}^{\Delta Ct_{gen\ referencia}}}$$

$$\Delta Ct = Ct_{nativo} - Ct_{rígido}$$

La eficiencia de los cebadores es aquella que se obtuvo con la curva de calibración y se calculó utilizando la ecuación

$$\text{Factor Amplificación} = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

Con los resultados de las eficiencias y los Ct de las cuantificaciones relativas obtenidas se prosiguió a calcular los cambios en la expresión de los genes blanco debido al ambiente rico en AGEs (Tabla 11).

Tabla 11: Resultados de la expresión relativa por el método Pfaffl según su normalizador.

Genes blanco	Expresión relativa promedio \pm desvío estándar	
	Normalizado con GAPDH	Normalizado con Actina
Ecaderina	2,75 \pm 1,58	2,22 \pm 1,19
MLC2	1,27 \pm 0,28	1,01 \pm 0,26
β1integrina	0,97 \pm 0,15	0,85 \pm 0,49
Ncaderina	1,21 \pm 0,4	1,08 \pm 0,74
SNAI1	1,61 \pm 0,73	1,43 \pm 0,95
SNAI2	0,96 \pm 0,57	0,95 \pm 0,95

La diferencia más importante que se observó al obtener los resultados de la expresión relativa por el método de Pfaffl y col. es que la actividad del gen de adhesión epitelial *Ecaderina* aumenta ($ER_{GAPDH} = 2,75 \pm 1,58$ y $ER_{\beta 1actina} = 2,22 \pm 1,19$; Tabla 11), en vez de disminuir en microambientes ricos en glicotoxinas como se observó cuando se empleó el algoritmo de Livak y col. ($ER_{GAPDH} = 0,58 \pm 0,22$ y $ER_{\beta 1actina} = 0,76 \pm 0,32$; Tabla 10). Se puede apreciar que el resultado de este análisis por el método de Pfaffl no concuerda con los antecedentes, ni con la hipótesis de este trabajo. La razón de obtener un aumento de la expresión tal vez se deba a la eficiencia falsa y sobreestimada de los cebadores, sumada a la gran variabilidad de los valores obtenidos, debido a la heterogeneidad de los cultivos 3D.

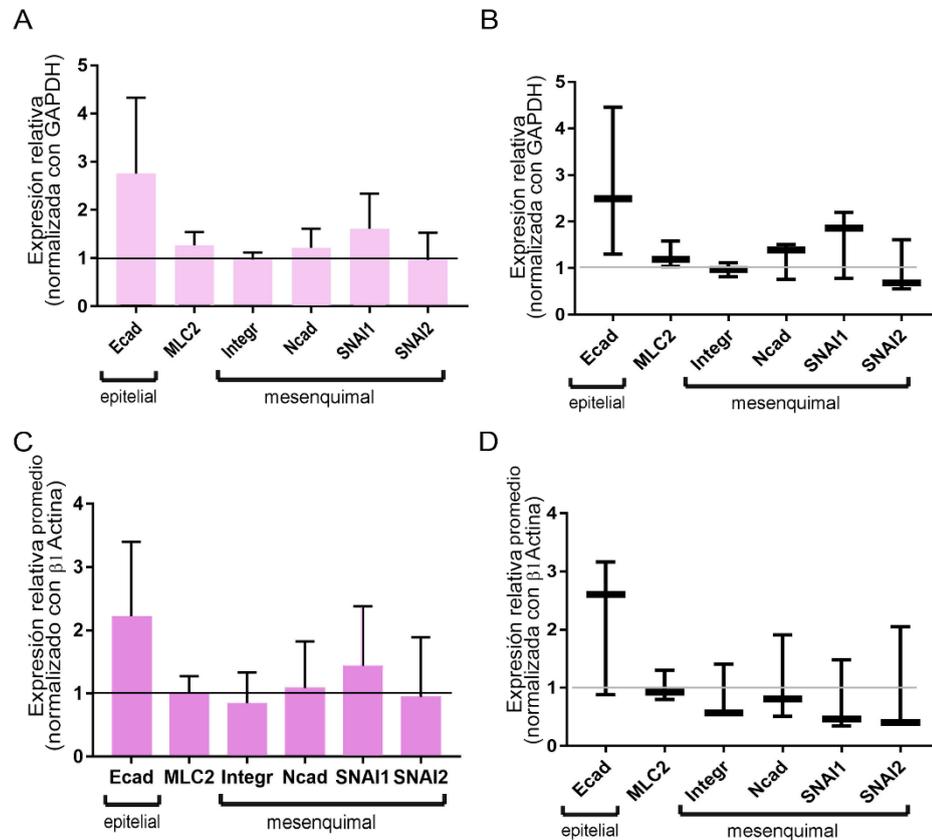


Figura 13- Expresión relativa de los genes blanco en cultivos ricos en AGEs versus nativos (método Pfaffl).

A, Expresión relativa promedio de tres experimentos independientes realizados cada uno por triplicado; normalizada con los valores obtenidos del gen de referencia GAPDH. **B**, Gráfico de los tres valores obtenidos en los tres experimentos de expresión relativa (promedio de los triplicados de cada reacción de qPCR realizada por cultivo); normalizada con los valores obtenidos del gen de referencia GAPDH. **C y D**, igual que en A y B pero normalizando los valores con el gen de referencia β 1actina. Ecad: Ecaderina, MLC2: cadena liviana de miosina 2, Integr: β 1 integrina, Ncad: Ncaderina.

De acuerdo con el algoritmo de Pfaffl y col., no se observó variaciones en la expresión relativa de β 1integrina debido a la acumulación de AGEs en la MB ($ER_{GAPDH} = 0,97 \pm 0,15$ y $ER_{\beta 1actina} = 0,85 \pm 0,49$; Tabla 11). Una posibilidad plausible es que efectivamente la expresión de β 1integrina no varía con el microambiente, sino que la MB rigidizada por la acumulación

de AGEs podría promover la formación de distintos heterodímeros de integrina y el cambio en la localización de la proteína $\beta 1$ integrina, desde la membrana celular basal a las adhesiones focales. En este sentido, en el caso de la glándula de mamaria el heterodímero $\alpha 2\beta 1$ integrina es esencial para la morfogénesis y funcionamiento del tejido mamario ⁶⁶, mientras que en el cáncer de mama la unión del heterodímero $\alpha 3\beta 1$ integrina con su ligando activa la quinasa de las adhesiones focales⁶⁷.

Al igual que la expresión de $\beta 1$ integrina, la expresión relativa de MLC2 parece no variar con la acumulación de glicotoxinas en el microambiente, solamente se pudo apreciar una tendencia al aumento en la expresión cuando se empleó el algoritmo de Pfaffl y col.⁵³ con GAPDH como gen de referencia ($ER_{GAPDH} = 1,27 \pm 0,28$) no siendo significativo. Como se mencionó en la sección anterior, podría deberse a que es el estado de fosforilación de la proteína MLC2 el que se asocia con la activación del aparato contráctil celular y el fenotipo pro-invasivo.

Si bien el cambio en la expresión relativa de la molécula de adhesión mesenquimal Ncaderina no es significativo y es muy leve, según lo esperado, se puede apreciar una tendencia al aumento de su expresión en los cultivos rígidos con el algoritmo de Pfaffl y el gen GAPDH como referencia ($ER_{GAPDH} = 1,21 \pm 0,4$; Tabla 11) y con el algoritmo de Livak y el gen de referencia actina ($ER_{\beta 1actina} = 1,27 \pm 0,75$; Tabla 10). Por último, a diferencia de los valores obtenidos por el método de Livak, y de acuerdo

a lo esperado, se aprecia una tendencia al aumento de la expresión relativa del factor de transcripción mesenquimal SNAI1 con este algoritmo independientemente del gen de referencia empleado ($ER_{GAPDH} = 1,61 \pm 0,73$ y $ER_{\beta_{actina}} = 1,43 \pm 0,95$; Tabla 11).

En términos generales, con los datos obtenidos luego de emplear cualquier de los algoritmos no se observó ningún cambio importante en la expresión de los genes blanco estudiados; sin embargo a excepción de Ecaderina, en las gráficas presentadas en la Figura 13 se puede apreciar una tendencia al aumento de la expresión relativa de los genes marcadores del fenotipo mesenquimal. Para determinar con certeza si un ambiente rico en AGEs induce un cambio en la expresión génicas de los marcadores seleccionados, resulta esencial mejorar las eficiencias de las parejas de *primer* empleadas en este estudio, obteniendo eficiencias de amplificación similares entre las parejas de cebadores para los genes blanco y los de referencia. Una diferencia de 0,03 entre la eficiencia de los *primer* del gen blanco y del gen de referencia puede dar un resultado sub o sobreestimado, dependiendo de cuál eficiencia sea mayor.⁵⁴ A mayor diferencia entre las eficiencias de los cebadores, el valor obtenido de las expresiones relativas resulta menos confiable. La diferencia entre una eficiencia aceptable y la que obtuvimos se puede deber a inhibidores en la reacción, de los cuales podríamos deshacernos al diluir aún más la muestra inicial, o no realizar el paso de digestión con DNAsa I en el proceso de producción del ADNc. Este paso podría ser obviado ya que los

cebadores fueron diseñados para distinguir una contaminación con ADN genómico.

4.4. Cálculo de la expresión relativa utilizando el software REST.

Los métodos utilizados previamente permitían la normalización con tan solo un gen de referencia, sin embargo, estudios anteriores han reportado que el uso de más de un gen de referencia mejora la exactitud de los resultados obtenidos^{61,62}. Es por esto que seleccionamos dos genes de referencia, pero las ecuaciones de los Métodos de Livak⁵² y Pfaffl⁵³, solo permiten utilizar un gen a la vez. Para poder calcular la expresión relativa de los diferentes genes blanco con más de un gen de referencia a la vez utilizamos la herramienta REST 2009⁵⁴, el algoritmo es una modificación del método de Pfaffl y colaboradores:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{\text{Eficiencia primer gen en estudio}^{\Delta Ct_{\text{gen en estudio}}}}{\text{Media geométrica (concentración del gen referencia 1, concentración del gen referencia 2)}}$$

donde $\Delta Ct = Ct_{\text{nativo}} - Ct_{\text{rígido}}$

Además, mediante el empleo de un test estadístico de aleatoriedad⁵⁴, este programa permite conocer la significancia de los resultados y refutar la hipótesis nula de que el tratamiento no afecta la expresión de los genes blancos. De ser cierta la hipótesis los valores de Ct obtenidos para los genes blanco serían significativamente semejantes a los valores obtenidos con los genes de referencia⁵⁴. Esto permite que se puedan

relocalizar los valores de Ct entre los dos grupos (genes blanco y de referencia) y anotar cuantas veces el valor de expresión relativa obtenido es mayor al real, luego de realizar más de 2000 iteraciones aleatorias de los datos se obtiene un valor p .⁵⁴

Los resultados obtenidos mediante este programa son mostrados en la Tabla 12. El valor de p fue calculado luego de realizar 5000 iteraciones, el mismo muestra que la expresión relativa de los gen blanco no varía significativamente con la acumulación de AGEs.

Tabla 12- Expresión relativa de los genes blancos obtenidos con REST 2009

Gen	Eficiencia*	Expresión relativa media	Error estándar	Intervalo de confianza (95%)	Valor p $\alpha = 0,05$
GAPDH	1,45	0,89			
β1actina	0,85	1,12			
Ecaderina	1,9	2,21	0,600 - 8,579	0,382 - 24,243	0,075
MLC2	0,98	1,11	0,654 - 1,887	0,413 - 3,116	0,594
β1integrina	1,09	0,86	0,373 - 1,741	0,288 - 3,207	0,545
Ncaderina	0,96	1,04	0,652 - 1,717	0,501 - 2,609	0,812
SNAI1	1,66	1,31	0,426 - 3,447	0,221 - 6,891	0,434
SNAI2	1,40	0,76	0,241 - 2,496	0,113 - 4,123	0,454

* Eficiencia calculada por el programa REST: $-1 = (10^{(1/\text{eficiencia})}) - 1$, es decir los valores representados en la Tabla 9 menos 1

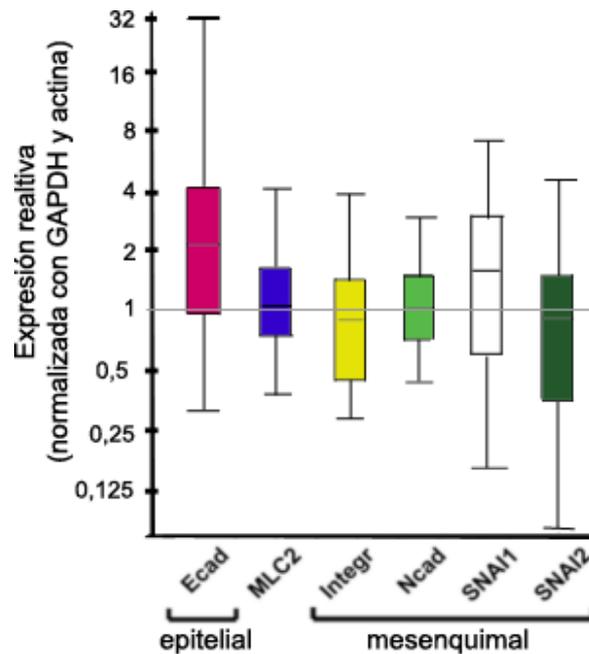


Figura 14- Expresión relativa de los genes blancos obtenida mediante el programa REST 2009.

Diagrama de cajas y bigotes (box-whisker plot) de la expresión realtiva \pm error estándar; la media de la expresión relativa se marca con una línea horizontal en cada caja; normalización con los datos obtenidos de los genes de referencia GAPDH y β 1actina.

Nuevamente la variación más importante se observa en la expresión relativa de Ecaderina, sugiriendo un leve aumento no significativo de la expresión de este gen debido al microambiente (ER=2,21). Este resultado no solamente va en contra de la hipótesis planteada en el estudio, sino también de los resultados obtenidos en trabajos publicados de nuestro laboratorio⁴⁸. Una vez más, se puede sugerir que las diferencias obtenidas en la eficiencia de las parejas de *primers* no es la adecuada y resulta en valores de expresión relativa sobreestimados. La eficiencia de los cebadores para Ecaderina es de 1,9, mientras que la eficiencia de los cebadores para GAPDH y para β 1actina es de 1,45 y 0,85, respectivamente. Debido a que la pareja de *primers* para Ecaderina

presenta diferencias mayores a 0,03 en su eficiencia con respecto a la de los genes de referencia, se genera una diferencia en el valor de expresión calculado de 209%, si la eficiencia del gen blanco es mayor que la de referencia⁵⁴. Por lo que es posible suponer que el valor obtenido para Ecaderina en realidad está siendo sobreestimado y no es el verdadero.

Por último, no se debe excluir la posibilidad de que la expresión de los genes blanco estudiados no varíe de manera substancial en los cultivos ricos en AGEs. Se ha planteado que durante el desarrollo del cáncer de próstata no se observa una EMT completa, y que probablemente se de en algunas ocasiones una transición parcial de un fenotipo a otro, manteniéndose en la célula tumoral la expresión de algunos marcadores epiteliales conjuntamente con algunos mesenquimales⁶⁸.

5. CONCLUSIONES

El propósito de este trabajo fue determinar si la MB rica en AGEs, que mimetiza un ambiente envejecido, promueve un cambio en la expresión génica de marcadores epiteliales y mesenquimales contribuyendo con el transcurso de EMT involucrado en el proceso de invasión tumoral. Para ello se diseñaron dos-tres parejas de *primers* para amplificar el ADNc del marcador de adhesión epitelial E-caderina y de los marcadores mesenquimales N-caderina, MLC2, β 1-integrina, SNAI1 y SNAI2. Además, se diseñaron cebadores para los genes *housekeeping* GAPDH, β -actina y TBP, de los cuales se utilizaron dos como genes de referencia. Luego del testeado de los *primers* se obtuvieron parejas de cebadores con un valor de Ct entre 15 y 30, específicos para nuestros ADNc blancos y de referencia. Sin embargo, se observaron variaciones mayores a 0,03 entre las eficiencias de los *primers*, que en un futuro nos proponemos mejorar mediante la exclusión del paso DNAsa I de la producción del ADNc.

En paralelo logramos generar cultivos en 3D de acinos glandulares próstáticos sobre una MB rica en AGEs y nativas como control; de los cuales se purificaron las muestras de ARNm total y a partir de él se obtuvo el ADNc. Durante el trabajo obtuvimos una de las replicas biológicas con un grado de heterogeneidad alto, observándose en el cultivo acinos próstáticos en conjunto con células en monocapa. En un

futuro nos proponemos repetir estos cultivos, para obtener más de un 80% de estructuras acinares; y a partir de ellas generar el ADNc.

En este estudio se emplearon tres algoritmos para el cálculo de la expresión relativa de los genes blanco: uno independiente de la eficiencia de los cebadores, otro que introduce el valor de la eficiencia en el algoritmo y, por último, uno que además de tener en cuenta el valor de la eficiencia utiliza más de un gen de referencia. Sin embargo, con ninguno de los algoritmos empleados observamos diferencias importantes en cultivos con acumulación de glicotoxinas versus los nativos, tanto en la expresión del marcador epitelial Ecaderina, como en la de los marcadores mesenquimales Ncaderina, MLC2, β 1integrina, SNAI1 y SNAI2 independientemente de la cantidad y gen de referencia empleado.

Para continuar con el estudio de la influencia de un ambiente enriquecido en AGEs y como este afecta al fenotipo de la célula epitelial y contribuye con el inicio del cáncer de próstata, nos proponemos realizar el análisis del transcriptoma (ARNm total secuenciado mediante la plataforma HiSeq 2000 Illumina) de los cultivos en 3D para determinar los genes de expresión diferencial. Luego de mejorar la eficiencia de las parejas de *primers* diseñadas en este trabajo de tesina, las mismas podrían ser empleadas para la verificación de los resultados del transcriptoma en el caso de que estos genes blancos sufran expresión diferencial. Tanto el análisis del transcriptoma como la validación de sus

resultados se llevarán a cabo en el marco del proyecto mi Tesis de Maestría (Pedeciba).

Continuar con la búsqueda de los genes activados o reprimidos luego de recibida la mecano-señal del ambiente rico en AGEs, nos permitirá identificar cuáles son las vías de señalización molecular que están siendo moduladas por este microambiente envejecido. Además, cuáles son las cascadas que intervienen en la modulación de los patrones de adhesión de la célula, la activación del aparato contráctil celular y la progresión de la EMT con la adquisición de un fenotipo celular tumoral invasivo, resulta importante para la búsqueda de posibles bio-marcadores y futuras terapias alternativas para el cáncer de próstata.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Lodish, H. F. *Molecular cell biology*. (W.H. Freeman, 2000).
2. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
3. Greenburg, G. & Hay, E. D. Epithelia suspended in collagen gels can lose polarity and express characteristics of migrating mesenchymal cells. *J. Cell Biol.* **95**, 333–9 (1982).
4. Kalluri, R. & Weinberg, R. A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J. Clin. Invest.* **119**, 1420–1428 (2009).
5. Angadi, P. & Kale, A. Epithelial-mesenchymal transition - A fundamental mechanism in cancer progression: An overview. *Indian J. Heal. Sci.* **8**, 77 (2015).
6. Cavallaro, U. & Christofori, G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 118–132 (2004).
7. Agiostratidou, G., Hult, J., Phillips, G. R. & Hazan, R. B. Differential Cadherin Expression: Potential Markers for Epithelial to Mesenchymal Transformation During Tumor Progression. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **12**, 127–133 (2007).
8. Tepass, U., Truong, K., Godt, D., Ikura, M. & Peifer, M. Cadherins in embryonic and neural morphogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 91–100 (2000).
9. Battle, E. *et al.* The transcription factor Snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat. Cell Biol.* **2**, 84–89 (2000).
10. Canel, M., Serrels, A., Frame, M. C. & Brunton, V. G. E-cadherin-integrin crosstalk in cancer invasion and metastasis. *J. Cell Sci.* **126**, 393–401 (2013).
11. Peinado, H., Portillo, F. & Cano, A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 365–375 (2004).
12. Tomita, K. *et al.* Cadherin switching in human prostate cancer progression. *Cancer Res.* **60**, 3650–4 (2000).
13. HAZAN, R. B., QIAO, R., KEREN, R., BADANO, I. & SUYAMA, K. Cadherin Switch in Tumor Progression. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1014**, 155–163 (2004).
14. van Roy, F. Beyond E-cadherin: roles of other cadherin superfamily members in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **14**, 121–134 (2014).
15. Derycke, L. D. M. & Bracke, M. E. N-cadherin in the spotlight of cell-cell adhesion, differentiation, embryogenesis, invasion and signalling. *Int. J. Dev. Biol.* **48**, 463–476 (2004).
16. Berx, G. & van Roy, F. Involvement of Members of the Cadherin Superfamily in

- Cancer. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, a003129–a003129 (2009).
17. Hazan, R. B., Kang, L., Whooley, B. P. & Borgen, P. I. N-cadherin promotes adhesion between invasive breast cancer cells and the stroma. *Cell Adhes. Commun.* **4**, 399–411 (1997).
 18. Kanchanawong, P. *et al.* Nanoscale architecture of integrin-based cell adhesions. *Nature* **468**, 580–584 (2010).
 19. Maschler, S. *et al.* Tumor cell invasiveness correlates with changes in integrin expression and localization. *Oncogene* **24**, 2032–2041 (2005).
 20. Koenig, A., Mueller, C., Hasel, C., Adler, G. & Menke, A. Collagen Type I Induces Disruption of E-Cadherin–Mediated Cell-Cell Contacts and Promotes Proliferation of Pancreatic Carcinoma Cells. *Cancer Res.* **66**, 4662–4671 (2006).
 21. Parsons, J. T., Horwitz, A. R. & Schwartz, M. A. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 633–643 (2010).
 22. Coakley, F. V & Hricak, H. Radiologic anatomy of the prostate gland: a clinical approach. *Radiol. Clin. North Am.* **38**, 15–30 (2000).
 23. Hayward, S. W. & Cunha, G. R. THE PROSTATE: DEVELOPMENT AND PHYSIOLOGY. *Radiol. Clin. North Am.* **38**, 1–14 (2000).
 24. McNeal, J. E. Normal histology of the prostate. *Am. J. Surg. Pathol.* **12**, 619–33 (1988).
 25. Rybak, A. P., Bristow, R. G. & Kapoor, A. Prostate cancer stem cells: deciphering the origins and pathways involved in prostate tumorigenesis and aggression. *Oncotarget* **6**, 1900–19 (2015).
 26. Rodriguez-Teja, M. *et al.* AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival. *J. Pathol.* **235**, 581–592 (2015).
 27. Esfahani, M., Ataei, N. & Panjehpour, M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**, 2601–11 (2015).
 28. Kral, M. *et al.* Genetic determinants of prostate cancer: a review. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc. Czech. Repub.* **155**, 3–9 (2011).
 29. Schaid, D. J. The complex genetic epidemiology of prostate cancer. *Hum. Mol. Genet.* **13**, 103R–121 (2004).
 30. Jiménez-Salazar, J. & González-Núñez, L. Estructura y función de las uniones estrechas en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama humano. *Rev. Educ.* (2012).
 31. Humphries, M. J. Integrin structure. *Biochem. Soc. Trans.* **28**, 311–39 (2000).

32. Heidenreich, A. *et al.* EAU guidelines on prostate cancer. Part 1: screening, diagnosis, and treatment of clinically localised disease. *Eur. Urol.* **59**, 61–71 (2011).
33. Gkogkolou, P. & Böhm, M. Advanced glycation end products: Key players in skin aging? *Dermatoendocrinol.* **4**, 259–70 (2012).
34. Ahmed, N. Advanced glycation endproducts—role in pathology of diabetic complications. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **67**, 3–21 (2005).
35. Luevano-Contreras, C. & Chapman-Novakofski, K. Dietary advanced glycation end products and aging. *Nutrients* **2**, 1247–65 (2010).
36. Ott, C. *et al.* Role of advanced glycation end products in cellular signaling. *Redox Biol.* **2**, 411–429 (2014).
37. Yang, S. *et al.* Impact of Oxidative Stress Biomarkers and Carboxymethyllysine (an Advanced Glycation End Product) on Prostate Cancer: A Prospective Study. *Clin. Genitourin. Cancer* **13**, e347–e351 (2015).
38. Rodriguez-Teja, M. *et al.* How to Study Basement Membrane Stiffness as a Biophysical Trigger in Prostate Cancer and Other Age-related Pathologies or Metabolic Diseases. *J. Vis. Exp.* 1–10 (2016). doi:10.3791/54230
39. Thornalley, P. J. *et al.* Quantitative screening of advanced glycation endproducts in cellular and extracellular proteins by tandem mass spectrometry. *Biochem. J.* **375**, 581–92 (2003).
40. Uribarri, J. *et al.* Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet. *J. Am. Diet. Assoc.* **110**, 911–16.e12 (2010).
41. Candiello, J., Cole, G. G. J. & Halfter, W. Age-dependent changes in the structure, composition and biophysical properties of a human basement membrane. *Matrix Biol.* **29**, 402–410 (2010).
42. Halfter, W., Candiello, J., Hu, H. & Zhang, P. Protein composition and biomechanical properties of in vivo-derived basement membranes. *Cell Adhes.* (2013).
43. Krouskop, T. A., Wheeler, T. M., Kallel, F., Garra, B. S. & Hall, T. Elastic Moduli of Breast and Prostate Tissues under Compression. *Ultrason. Imaging* **20**, 260–274 (1998).
44. Hoyt, K. *et al.* Tissue elasticity properties as biomarkers for prostate cancer. *Cancer Biomark.* **4**, 213–225 (2008).
45. Zhang, M. *et al.* Quantitative Characterization of Viscoelastic Properties of Human Prostate Correlated with Histology. *Ultrasound Med. Biol.* **34**, 1033–1042 (2008).
46. Carson, W. C. *et al.* Material characterization of ex vivo prostate tissue via spherical indentation in the clinic. *Med. Eng. Phys.* **33**, 302–309 (2011).

47. Bello, D., Webber, M. M., Kleinman, H. K., Wartinger, D. D. & Rhim, J. S. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* **18**, 1215–23 (1997).
48. Rodriguez-Teja, M. *et al.* AGE-modified basement membrane cooperates with Endo180 to promote epithelial cell invasiveness and decrease prostate cancer survival. *J. Pathol.* **235**, 581–592 (2015).
49. Thornton, B. & Basu, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **39**, 145–154 (2011).
50. Wang, X., Spandidos, A., Wang, H. & Seed, B. PrimerBank: a PCR primer database for quantitative gene expression analysis, 2012 update. *Nucleic Acids Res.* **40**, D1144–D1149 (2012).
51. BIO-RAD. Real-time PCR: Applications Guide. *Bio-Rad Lab.* 2–84 (2006).
52. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
53. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, 45e–45 (2001).
54. Pfaffl, M. W., Horgan, G. W. & Dempfle, L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* **30**, e36 (2002).
55. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).
56. Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. (2005). doi:10.1038/sj.gene.6364190
57. Bonab, M. M. *et al.* NIH Public Access. *Lab Chip* **4**, 189–200 (2015).
58. Derveaux, S., Vandesompele, J. & Hellemans, J. How to do successful gene expression analysis using real-time PCR. *Methods* **50**, 227–230 (2010).
59. VanGuilder Heather D., Vrana Kent E, F. W. M. Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Review* **44**, (2008).
60. Wan, H. *et al.* Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber. *Anal. Biochem.* **399**, 257–261 (2010).
61. Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, 34–1 (2002).
62. Kozera, B. & Rapacz, M. Reference genes in real-time PCR. *J. Appl. Genet.* **54**, 391–406 (2013).

63. Dieffenbach, C. W., Lowe, T. M. J. & Dveksler, G. S. General concepts for PCR primer design. General Concepts for PCR Primer Design PARAMETERS USED IN BASIC PCR PRIMER DESIGN.
64. Normalization of Real-Time PCR Fluorescence Data with ROX Passive Reference Dye | Aplicaciones y tecnologías | Bio-Rad. Available at: <http://www.bio-rad.com/es-uy/applications-technologies/normalization-real-time-pcr-fluorescence-data-with-rox-passive-reference-dye>. (Accessed: 24th June 2017)
65. Desjardins, P. & Conklin, D. NanoDrop microvolume quantitation of nucleic acids. *J. Vis. Exp.* (2010). doi:10.3791/2565
66. Keely, P. J., Wu, J. E. & Santoro, S. A. The spatial and temporal expression of the alpha2beta1 integrin and its ligands, collagen I, collagen IV, and laminin, suggest important roles in mouse mammary morphogenesis. *Differentiation* **59**, 1–13 (1995).
67. Cagnet, S. *et al.* Signaling events mediated by $\alpha3\beta1$ integrin are essential for mammary tumorigenesis. *Oncogene* **33**, 4286–4295 (2014).
68. Birchmeier, W. & Behrens, J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim. Biophys. Acta* **1198**, 11–26 (1994).

ANEXO I- SOLUCIONES

Soluciones para llevar a cabo la reacción de Maillard	
PBS	1 tableta cada 100 ml de H ₂ O _{dd}
	Autoclavar
Glicolaldehído 50 mM (volumen final: 50 ml)	Glicolaldehído 0,3 g
	Llevar a volumen final con Buffer fosfato 0,2 M, pH=7,8
	Esterilizar por filtración con filtro de 0,22 µm
Buffer fosfato (volumen final: 50 ml)	Na ₂ HPO ₄ 0,4 M 4,25 ml
	NaH ₂ PO ₄ 0,4 M 45,75 ml
Glicina etil éster 1 M (volumen final: 50 ml)	Glicina etil éster 6,98 g
	Llevar a volumen final con PBS autoclavado
	Esterilizar por filtración con filtro de 0,22 µm
Soluciones para llevar a cabo la retro-transcripción	
Oligo dT₁₅₋₁₈ (500µg/mL)	5µg de dT ₁₅ y 5µg de dT ₁₈ , 11.1µL y 9.24µL de solución stock respectivamente.
dNTPs (volumen final 10µL)	Concentración de cada dNTPs 10Mm, 1µL de cada uno y se completó hasta volumen final.

ANEXO II- REACTIVOS Y FUNGIBLES

	Nombre	Compañía	Número de catálogo	Comentarios
Cultivo en 2D	Células RWPE-1	ATCC®	CRL 11609™	
	Crioviales	Greiner Bio-one International	126263	
	DMSO	Sigma-Aldrich	D2438	
	FBS	ThermoFisher Scientific	10437-028	Mantener en alícuotas a -20°C
	KSFM kit	ThermoFisher Scientific	10724-011	No calentar a 37°C
	PBS (Dulbecco A) - tabletas	Oxoid	BR0014G	
	Penicilina – Estreptomicina	ThermoFisher Scientific	15140-148	Mantener a -20°C
	Placas de cultivo	Greiner bio-one International	664-160	
	Tripsina – EDTA (0,05%)	ThermoFisher Scientific	25300-054	Mantener en alícuotas a -20°C
Cultivo en 3D	Cámara de cultivo – 8 pocillos	Merck Millipore	PEZGS0816	
	Filtros de jeringa 0,22µm	Appleton Woods	BC680	
	Glicina etil éster	Sigma-Aldrich	50060	Irritante para los ojos.
	Glicolaldehído	Sigma-Aldrich	G6805	Mantener a 4°C
	HGF	ThermoFisher Scientific	PHG0254	Mantener en alícuotas entre -20°C y -80°C
	MB reconstituida	Trevigen	3445-005-01	Mantener: a largo plazo a -80°C, a corto plazo en alícuotas a -20°C
RT-qPCR	Tips con filtro (200 y 1000 µl)	Daslab	D249200 (200 µl) D249001 (1000 µl)	
	Agua libre de RNasa RT-PCR RT-PCR Grade Water	Thermo Fisher Scientific	AM9935	Mantener en alícuotas a -20°C
	DNase I, RNase-free	Thermo Fisher Scientific	EN0521	Mantener a -20°C
	TRIzol® Reagent	Invitrogen	#15596026	Mantener a 4°C
	Kit columna extracción ARN PureLink® RNA Mini Kit,	PureLink® Thermo Fisher Scientific	12183018A	Mantener en un lugar seco a TA
	Oligo dT ₁₅₋₁₈	Macrogen		Mantener a -20°C
	dNTPs	Thermo Fisher Scientific	R0181	Mantener a -20°C
	SuperScript™ II Reverse Transcriptase,	Invitrogen	18064-022	Mantener a -20°C
	SYBR Green PCR Master Mix SYBR Green PCR Kit	QuantiNova	208052	Mantener a -20°C

ANEXO III- FIGURAS SUPLEMENTARIAS

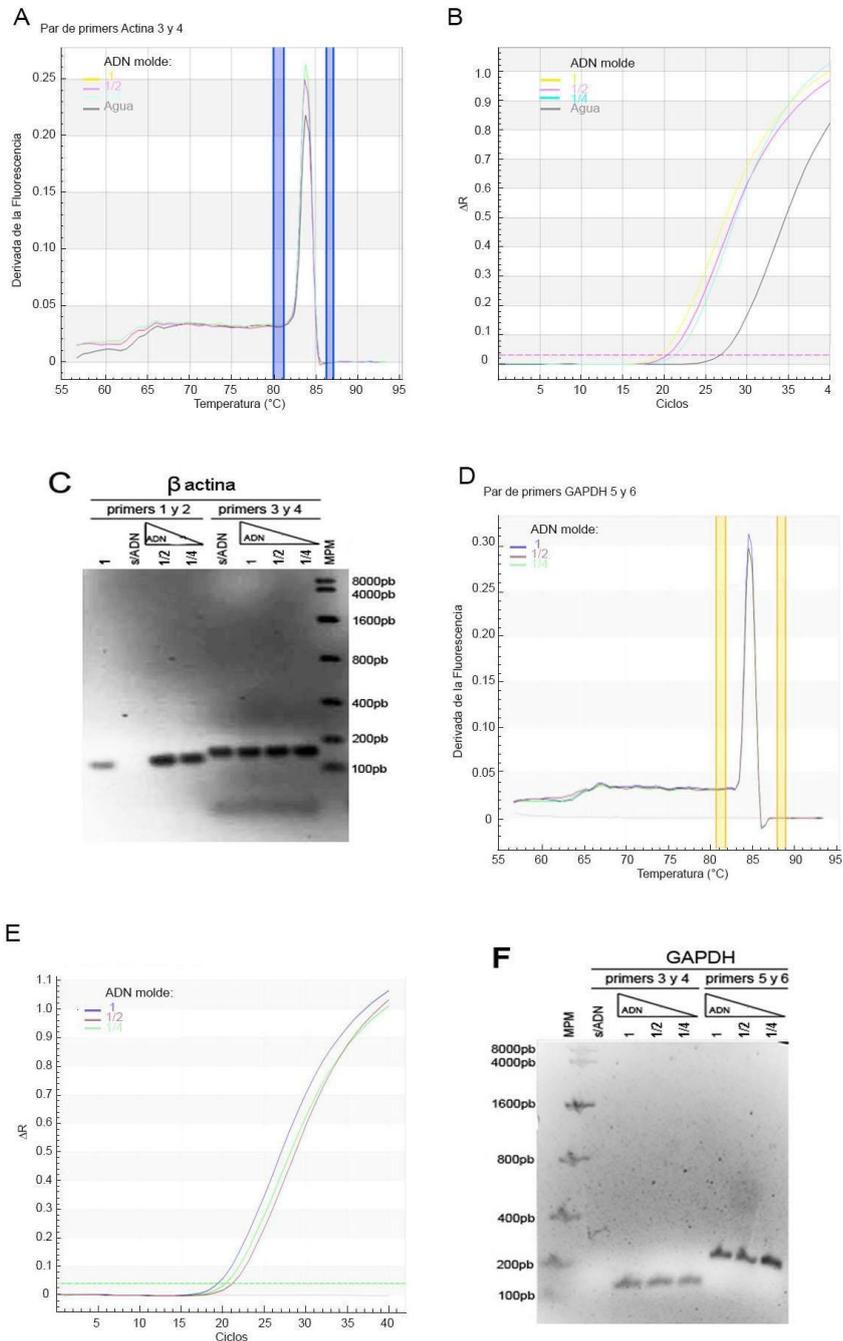


Figura 15- Parejas de cebadores no seleccionados para amplificar Actina y GAPDH.

A y D, Curva de disociación para las parejas de cebadores 3 y 4, 5 y 6 para Actina y GAPDH respectivamente. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura (-dRFU/dT). B y E, Curva de amplificación para los pares de cebadores. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)- fluorescencia de *background*. C y F, Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los ADNc producidos a partir de los cultivos 2D y los pares de *primers* 3/4 Actina (150 pb), 5/6 GAPDH (120 pb). Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

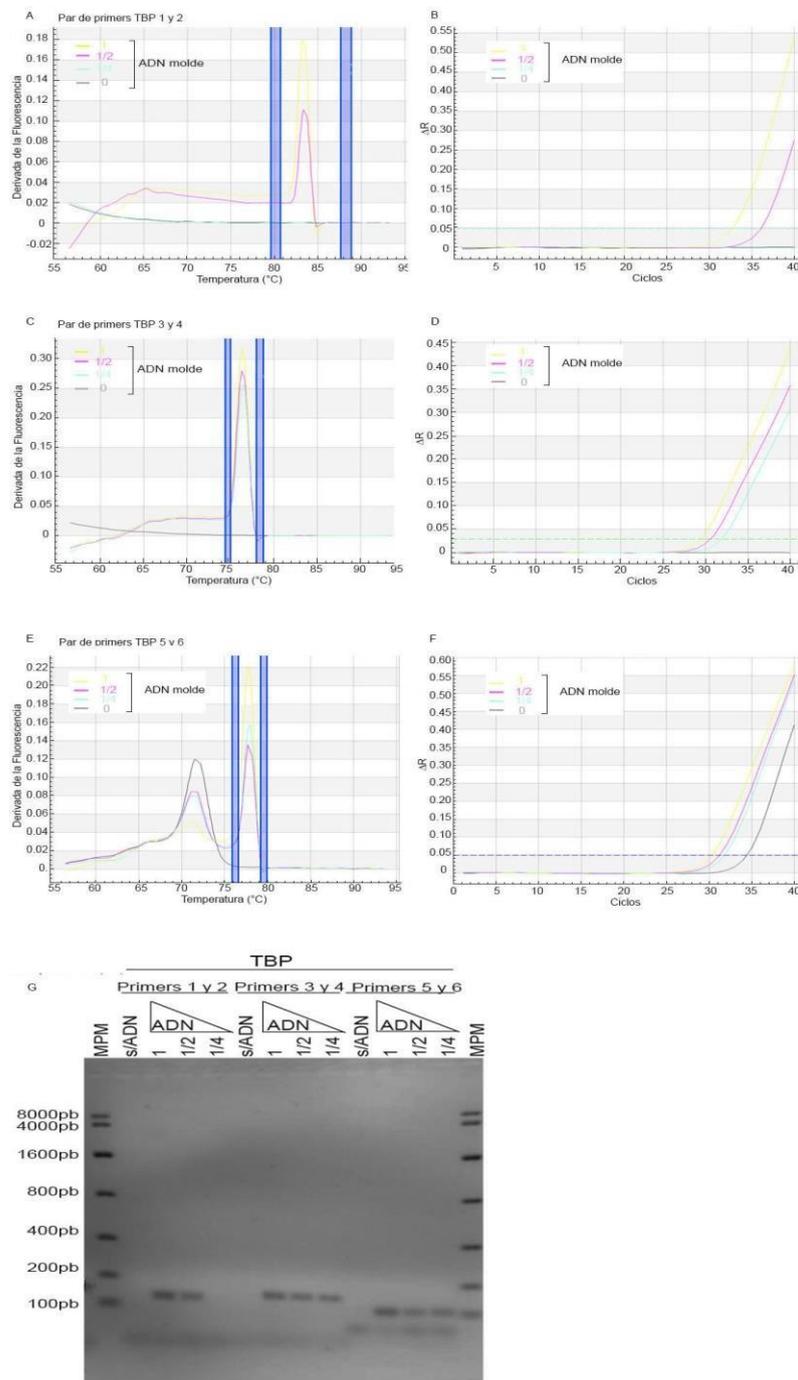


Figura 16- Parejas de cebadores para amplificar TBP.

A, C y E, Curva de disociación para las parejas de cebadores. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura ($-dRFU/dT$). **B, D y F,** Curva de amplificación para los pares de cebadores. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)- fluorescencia de *background*. **G,** Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los ADNc producidos a partir de los cultivos 2D y los pares de *primers* 1/2 (127 pb), 3/4 (142 pb) y 5/6 (101 pb). Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

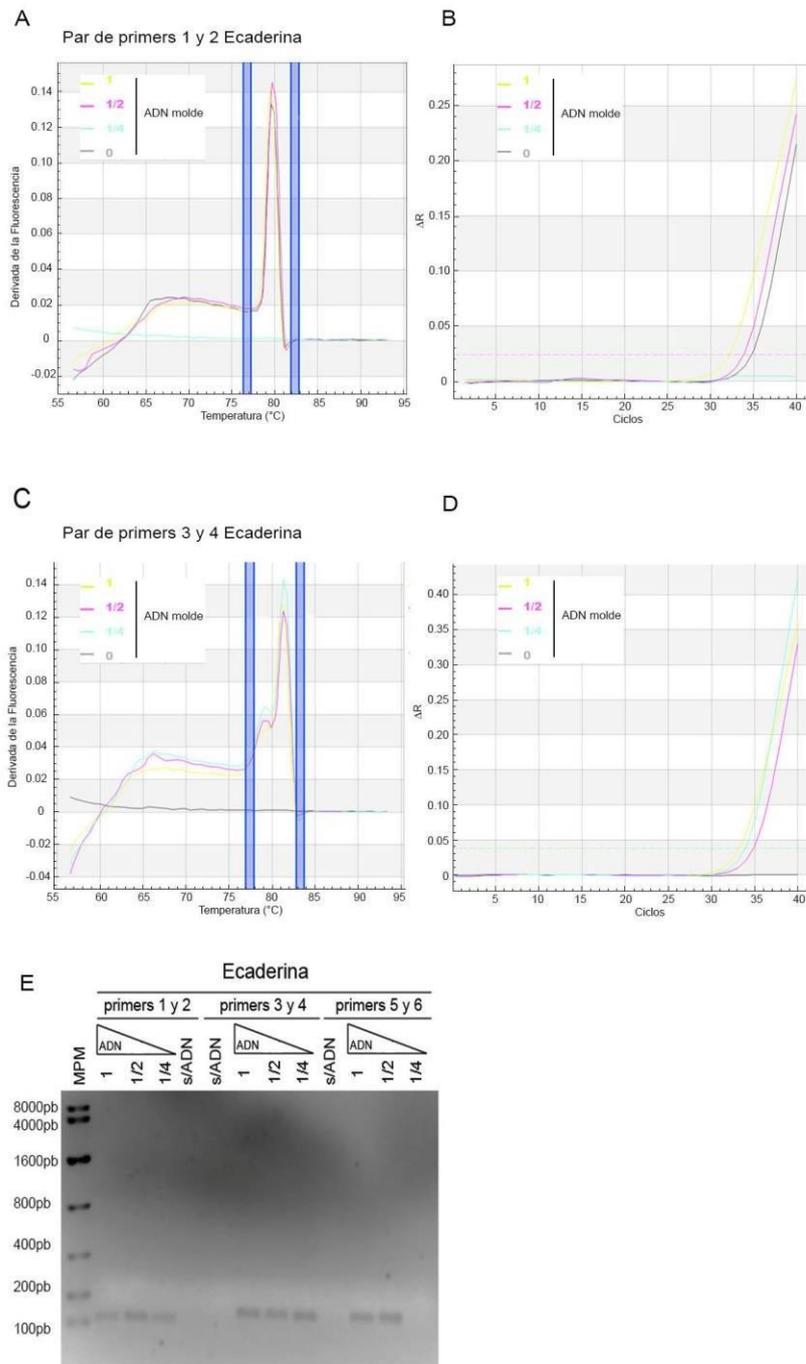


Figura 17- Parejas de cebadores no seleccionados para amplificar Ecaderina.

A y **C**, Curva de disociación para las parejas de cebadores 1/2 y 3/4 de Ecaderina. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura (-dRFU/dT). **B** y **D**, Curva de amplificación para los pares de cebadores. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)- fluorescencia de *background*. **E**, Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los ADNc producidos a partir de los cultivos 2D y los pares de *primers* para Ecaderina 1/2 (109 pb) y 3/4 (140 pb). Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

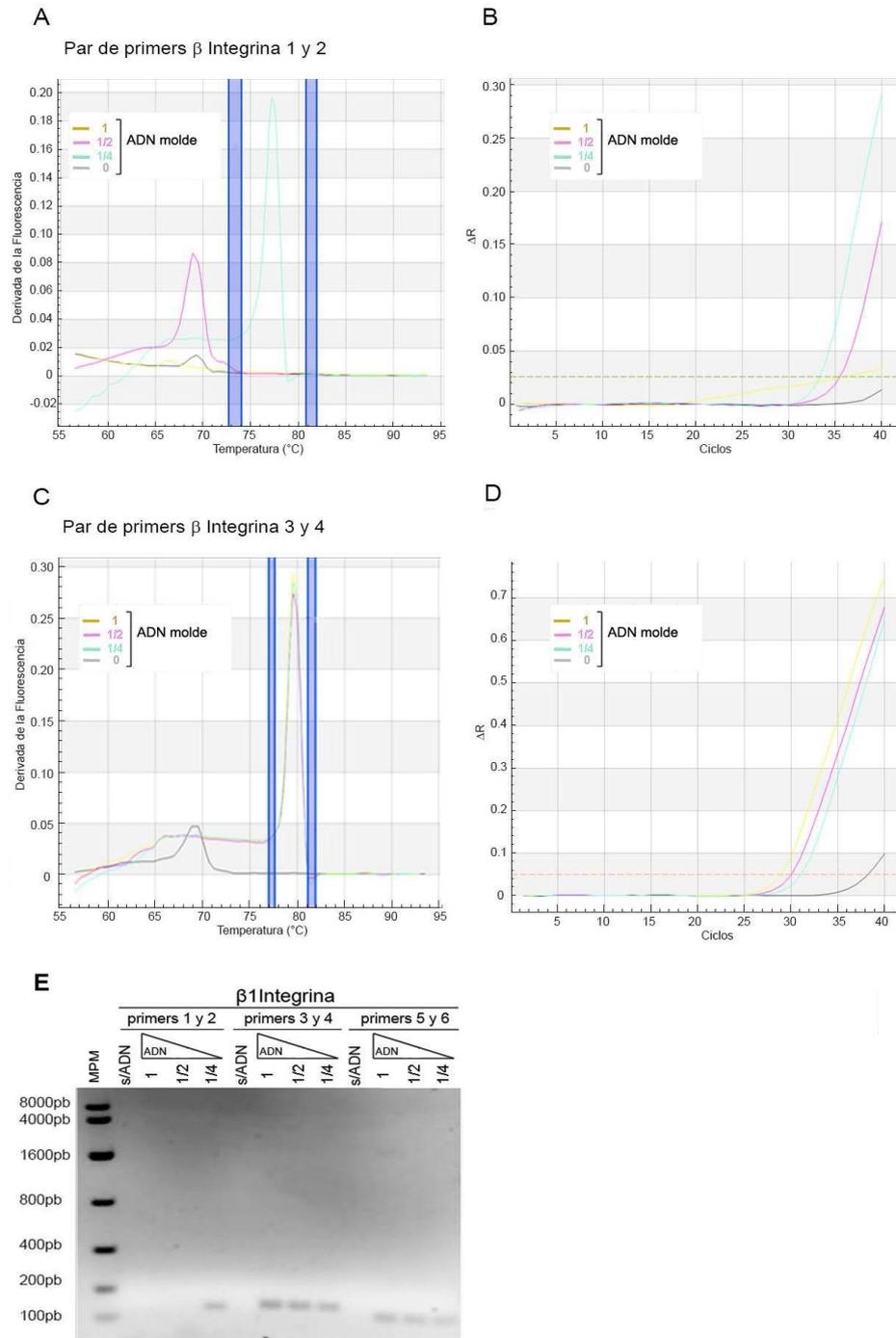
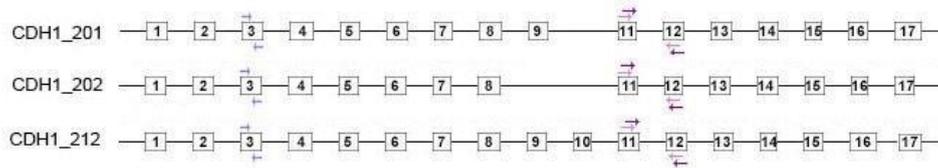


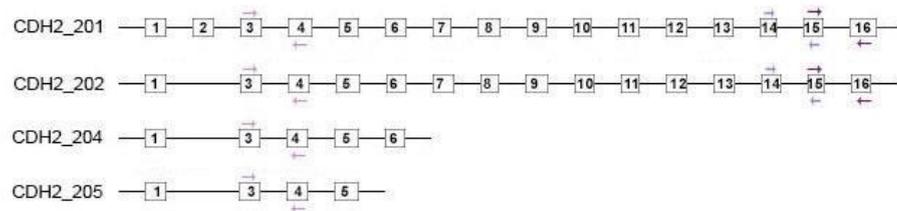
Figura 18 Parejas de cebadores no seleccionados para amplificar β Integrina 1.

A y **C**, Curva de disociación para las parejas de cebadores 1/2 y 3/4 de β Integrina 1. Derivada de las unidades relativas de fluorescencia versus temperatura (-dRFU/dT). **B** y **D**, Curva de amplificación para los pares de cebadores. ΔR , unidad relativa de fluorescencia (RFU)- fluorescencia de *background*. **E**, Visualización de los productos de qPCR obtenidos con los ADNc producidos a partir de los cultivos 2D y los pares de *primers* para β Integrina 1 1/2 (128 pb) y 3/4 (139 pb). Agarosa 2%, tinción con BrEt; MPM, Marcador de Peso Molecular.

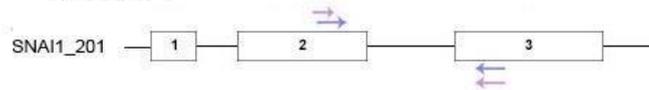
E caderina



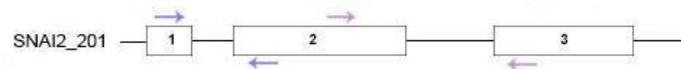
N caderina



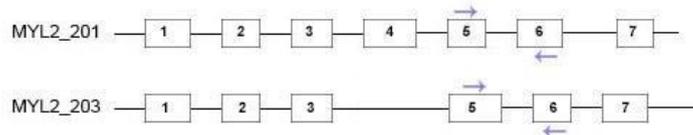
SNAI1



SNAI2



MLC2



β1 Integrina

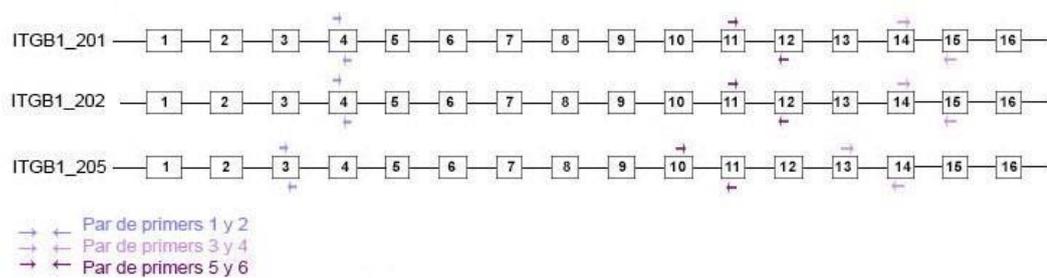
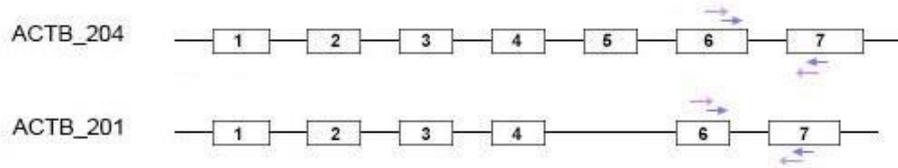
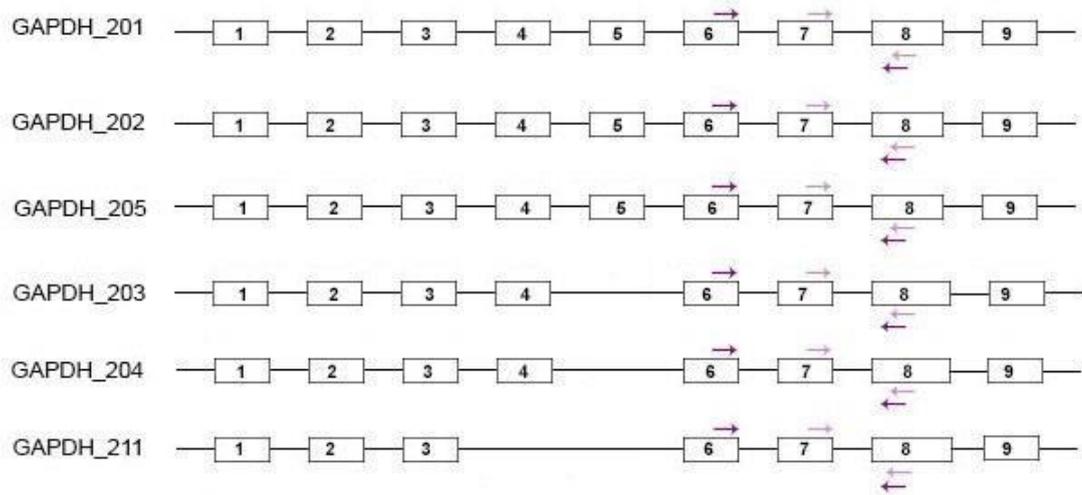


Figura 19- Esquematación de la unión de los sets de primers a las diferentes isoformas de los genes blanco, Ecaderina, Ncaderina, SNAI1, SNAI2, MLC2 y β1 Integrina.

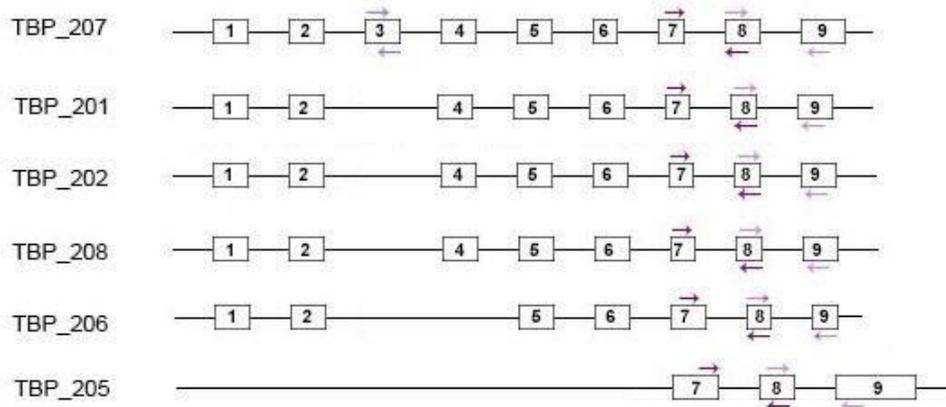
Actina



GAPDH



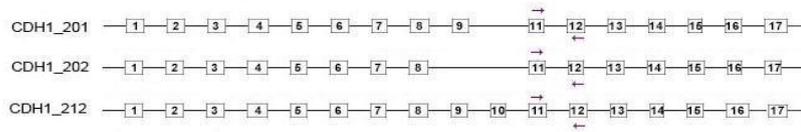
TBP



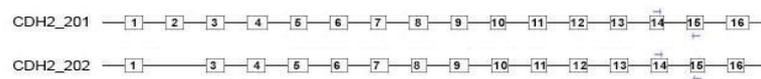
- ← Par de primers 1 y 2
- ← Par de primers 3 y 4
- ← Par de primers 5 y 6

Figura 20- Esquematización de la unión de los sets de *primers* a las diferentes isoformas de los posibles genes de referencia, β actina, GAPDH y TBP.

E caderina



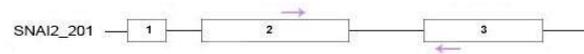
N caderina



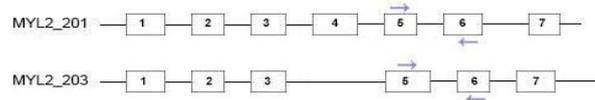
SNAI1



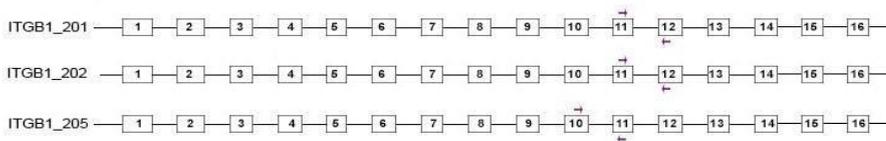
SNAI2



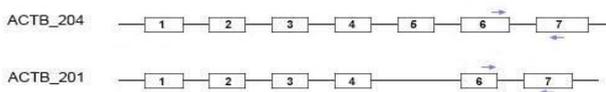
MLC2



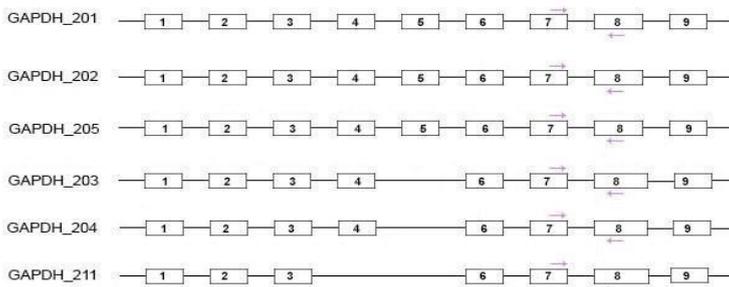
β1 Integrina



Actina



GAPDH



→ ← Par de primers 1 y 2
 → ← Par de primers 3 y 4
 → ← Par de primers 5 y 6

Figura 21- Esquematación de la unión de los *primers* seleccionados a las diferentes isoformas de los genes blanco y de referencia, Actina, GAPDH, Ecaderina, Ncaderina, SNAI1, SNAI2, MLC2 y β Integrina.