

Facultad de Ciencias, UdelaR

TESINA DE GRADUACIÓN

Determinación del efecto en el fenotipo migratorio e invasivo de un ncRNA desregulado en cáncer de próstata

LICENCIATURA EN BIOQUÍMICA

MERCEDES LANDEIRA ESCAMES

TUTORA: Dra. María Ana Duhagon

CO-TUTORES: Dra. Cecilia Mathó y Lic. Rafael Fort

Noviembre, 2018

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
ABREVIATURAS	4
RESUMEN.....	5
INTRODUCCIÓN.....	7
Cáncer	7
Cáncer de Próstata	9
<i>Etiología</i>	9
<i>Detección del PCa</i>	11
Metástasis	15
<i>Generalidades</i>	15
<i>Modelos de estudio de metástasis in vitro</i>	20
<i>Modelos de estudio de metástasis in vivo</i>	23
MicroARNs	27
<i>Generalidades</i>	27
<i>Biogénesis</i>	28
<i>miRs en Cáncer</i>	29
<i>miRs Biomarcadores</i>	30
<i>miRs y Motilidad Celular</i>	32
ANTECEDENTES.....	35
OBJETIVOS	37
Objetivos generales	37
Objetivos específicos	37
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Líneas Celulares	38
Cultivos Celulares	42
<i>Descomplementación del Suero Fetal Bovino</i>	42
<i>Medio de cultivo</i>	42
<i>Descongelado de crioviales</i>	42
<i>Mantenimiento de los Cultivos</i>	43
<i>Propagación</i>	43
<i>Congelado de células</i>	43
<i>Recuento en cámara de Neubauer</i>	44
Cuantificación de nc886 y hsa-miR-886-3p	44
<i>Extracción de ARN</i>	44

<i>Síntesis de cDNA y PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR)</i>	44
Ensayo de Migración	46
Ensayo de invasión	48
Análisis de Microarreglos Affymetrix	50
Análisis estadísticos	52
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	53
<i>Cuantificación de nc886 y hsa-miR-886-3p</i>	53
<i>Ensayo de Migración Celular – “Wound Healing Assay”</i>	54
<i>Puesta a punto</i>	54
<i>Ensayo de invasión</i>	59
<i>Puesta a punto</i>	59
<i>Análisis in silico de los posibles blancos moleculares de hsa-miR-886-3p.</i>	60
<i>FASN</i>	73
<i>PTMA</i>	75
CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS	77
BIBLIOGRAFÍA	78

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a María Ana Duhagon por permitirme trabajar en su laboratorio, por su dedicación y por su confianza. Por ser una excelente profesora y generar un entorno de trabajo super agradable.

A Rafael Fort y Cecilia Mathó, por ensuciarse las manos conmigo en cada experimento y por estar siempre disponibles y dispuestos a ayudarme en todas las instancias de esta etapa.

A todos los compañeros del LIM, por alegrar las horas en el laboratorio, por acompañar y aconsejar en todo momento.

A mi familia, por estar siempre presentes, por apoyar incondicionalmente en todos mis proyectos y mis metas. Por la motivación día a día en el transcurso de cada año de mi carrera universitaria.

A mi novio, por compartir conmigo esta etapa y por demostrarme que siempre podré contar con él.

A mis amigos, los de siempre y los que me dejó la Fcien. Especialmente a las Silenciosas, sin ellas este camino hubiera sido la mitad de divertido y el doble de largo. A las chicas de Skating Show y a mi profe Helga, que siempre comprendieron mis ausencias e hicieron posible que siga entrenando.

Finalmente, a la querida Fcien, por ser mi segunda casa a lo largo de estos años.

ABREVIATURAS

ADN – Ácido Desoxiribonucleico	PCR – Reacción en cadena de la polimerasa
ADNc – ADN copia	piwiARN – ARN asociado a Piwi
ARN – Ácido Ribonucleico	PSA – Antígeno Específico de Próstata
ARNm – ARN mensajero	qRT-PCR – PCR cuantitativa en tiempo real
CSCs – Células madre de cáncer	snoARN – ARN pequeño nucleolar
EMT – Transición Epitelio-Mesenquimal	ST – Supresor Tumoral
FC – Cambio de expresión relativo	TCGA – The Cancer Genome Atlas
FBS – Suero Fetal Bovino	U - Unidades
HPB – Hiperplasia prostática benigna	UTR – Región no traducida de ARNm
hs – Horas	vtARN – ARNs de bóveda
IARC – Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer	μL - microlitro
MET – Transición Mesenquima-Epitelial	μm - micra
miARN – micro ARN	°C – Grados centígrados
min - Minutos	
mL – mililitro	
mM - miliMolar	
MMPs – Metaloproteinasas de matriz extracelular	
miR – microARN	
nc886 – vtRNA2-1/pre-miR-886/nc886	
nt – Nucleótidos	
OMS – Organización mundial de la Salud	
ONC – Oncogén	
ORF – Marco abierto de lectura	
Pb – pares de bases	
PCa – Cáncer de Próstata	

RESUMEN

Dentro de los tumores sólidos, el cáncer de próstata (PCa) es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo. A pesar de que gran parte de los pacientes son tratados exitosamente, una pequeña porción desarrolla tumores agresivos, que actualmente no tienen cura. Los microARNs son pequeñas moléculas de 20 pb aproximadamente, que cumplen funciones de regulación génica y que se encuentran desregulados en todos los tipos de cáncer. Al igual que los clásicos genes, se dividen funcionalmente en oncomiRs y miRs supresores tumorales. Estas moléculas prometen una buena aproximación para el desarrollo de biomarcadores estables y específicos, ya que tienen tamaño pequeño, están presentes en los fluidos corporales, son muy estables y es posible correlacionar con gran precisión la presencia o ausencia de algunos de ellos con ciertas patologías. Específicamente, es de gran utilidad contar con buenos biomarcadores en cáncer, que sean capaces de discernir entre tipos diferentes de tumores, así como también correlacionar con su grado de avance.

Trabajos anteriores han mostrado la desregulación de hsa-miR-886-3p en PCa, y se ha propuesto su rol de supresor tumoral para esta patología. En este trabajo se postula a hsa-miR-886-3p como candidato en la regulación de la migración y de la invasión celular, ambos procesos estrechamente relacionados con el desarrollo de metástasis.

Para cumplir con este objetivo se realizaron ensayos de migración de “wound healing”, ensayos de invasión celular con *transwells* cubiertos con matriz extracelular y se analizaron bioinformáticamente datos de expresión génica global de la línea celular LNCaP sobreexpresando el precursor nc886. Para todos los experimentos fue utilizada la línea LNCaP transfectada de modo que exprese establemente a nc886.

Los resultados de este trabajo muestran que hsa-miR-886/nc886 no afecta a los procesos de migración bidimensional, pero sí afecta notoriamente a los procesos de invasión celular, mostrando un 77% de disminución en la cantidad de células invasivas en la línea celular que sobre-expresa a nc886 respecto a la línea control. Por otra parte,

se propone que hsa-miR-886-3p podría afectar procesos celulares como el metabolismo lipídico, así como también de diferenciación celular.

Como conclusión, en este trabajo se expone un primer acercamiento a la elucidación de los procesos celulares que controla hsa-miR-886-3p en cáncer de próstata, brindando apoyo a la hipótesis de la función supresor tumoral de este miR.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER

En las personas adultas, el crecimiento celular se encuentra muy regulado y ocupa funciones de mantenimiento de la homeostasis del organismo. Muchos tejidos necesitan un recambio constante, como por ejemplo los epitelios de mucosas, donde las células se dañan o mueren rápidamente. Existen allí un conjunto de células especializadas con capacidades replicativas que se encargan de reestablecer la integridad del tejido. Cuando este sistema de reposición se descontrola, las células dañadas que deberían morir sobreviven, poniendo en compromiso la función normal del tejido y por lo tanto del organismo. Como consecuencia, estas células adquieren una sucesión de capacidades y características que permiten formar masas celulares tumorales, que luego se malignizan.¹

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), se define Cáncer como “término genérico para un gran grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. (...) creación rápida de células anormales que crecen más allá de sus límites habituales y que luego pueden invadir partes adyacentes del cuerpo y diseminarse a otros órganos”². En general causa la muerte del paciente si no recibe tratamiento adecuado y se trata de la segunda causa de muerte a nivel mundial.

El término *carcinogénesis* hace referencia al proceso por el cual una célula normal pasa a adquirir características tumorales. Las causas que conducen a contraer cáncer son diferentes, variadas y multifactoriales. Es difícil determinar el origen de su progresión, pero gracias a estudios poblacionales de correlación de diferentes factores con tipos de cáncer específicos, se manejan varias causas que pueden favorecer su avance. La frecuencia de cada tipo de cáncer varía según el sexo, etnia y región geográfica.³

Se ha descrito al cáncer como una enfermedad genética, donde se exponen genes responsables en diferentes procesos celulares y con funciones diversas. A diferencia de otras enfermedades genéticas, no se responsabiliza la mutación de un gen

en particular como el causante, sino que es necesario el conjunto de un grupo de genes desregulados para el inicio de la carcinogénesis ^{4,5}.

La clasificación clásica de estos genes consta de oncogenes y supresores tumorales. En esta división, los oncogenes presentan mutaciones que los activan por encima de los niveles normales, o donde un gen adquiere nuevas funciones que contribuyen de forma que permiten el avance de la carcinogénesis. Los oncogenes pueden surgir de diversas maneras, entre ellas por la amplificación de su expresión, por la mutación en sitios clave de su ORF o translocaciones cromosómicas. Por otra parte, los genes supresores de tumor cumplen una función opuesta en el organismo, se encuentran inactivados en los tumores dado que su expresión es contraproducente al desarrollo del cáncer. Existen diferentes formas de bloquear la acción de los genes supresores de tumor, entre ellas se encuentran mutaciones puntuales que reducen su actividad o que producen una proteína truncada, silenciamiento epigenético e inserciones o deleciones de tamaños variables ^{4,5,6}.

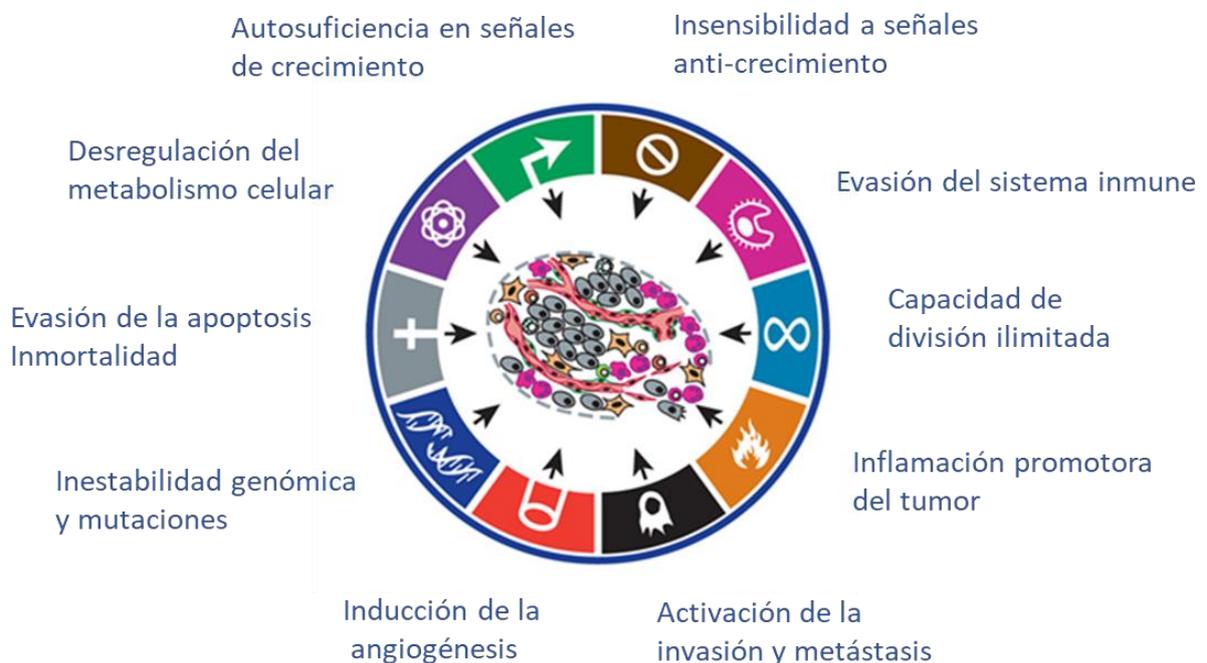


Figura 1. Sellos distintivos del cáncer. Esquema que resume las diferentes capacidades o alteraciones que debe experimentar una célula normal en el proceso de carcinogénesis. Modificado de Hanahan y Weinberg 2011 ¹.

Durante el proceso de desarrollo del tumor se producen determinadas alteraciones fenotípicas que han sido descritas como “sellos distintivos” del cáncer (**Fig.1**). La descripción de estas características proporciona un marco fundamental para el entendimiento y el constante estudio de este abanico de neoplasias ¹. Estas firmas están siendo continuamente revisadas y ampliadas, en particular integrando la relevancia del medio ambiente tumoral en el desarrollo del cáncer ^{7,8}.

A pesar de los avances en el conocimiento de los cambios moleculares y celulares involucrados en el inicio y progresión del cáncer, se ha reportado la disminución solamente del 25% de la muerte a causa de cáncer en los Estados Unidos. Según la IARC (International Agency for Research on Cancer) en 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos y 8,2 millones de muertes, y el 90% de estas muertes pueden ser atribuidas a enfermedades metastásicas que, por su heterogeneidad y complejidad, difícilmente responden a terapias convencionales como cirugía, radiación y quimioterapia ⁹. Según el instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos, se estima que en 2018 se diagnosticarán 1.735.350 nuevos casos en el país, y que 609.640 personas morirán a causa de este. Otros datos sugieren que el 38,4% de personas es diagnosticada de cáncer en algún momento de su vida ¹⁰.

CÁNCER DE PRÓSTATA

ETIOLOGÍA

Dentro de los tumores sólidos, el cáncer de próstata (PCa) es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia y representa el 6,7% de muertes por cáncer en hombres en el mundo (**Fig.2**). Aproximadamente 1,4 millones de hombres fueron diagnosticados con cáncer de próstata en 2013 a nivel mundial, y es la causa principal de muerte por cáncer en hombres en 24 países ¹¹. Específicamente en Uruguay, el PCa constituye el primer cáncer con mayor incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, habiendo sido estimado un promedio de 7.223 casos entre 2010 y 2014, según datos del Registro Nacional de Cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer. Datos más recientes del mismo registro indican que entre el período

2004-2016 existe una tendencia leve pero significativa del descenso de la mortalidad en Uruguay, la cual podría deberse a la introducción del cribado por PSA, como se ha visto en otros países.

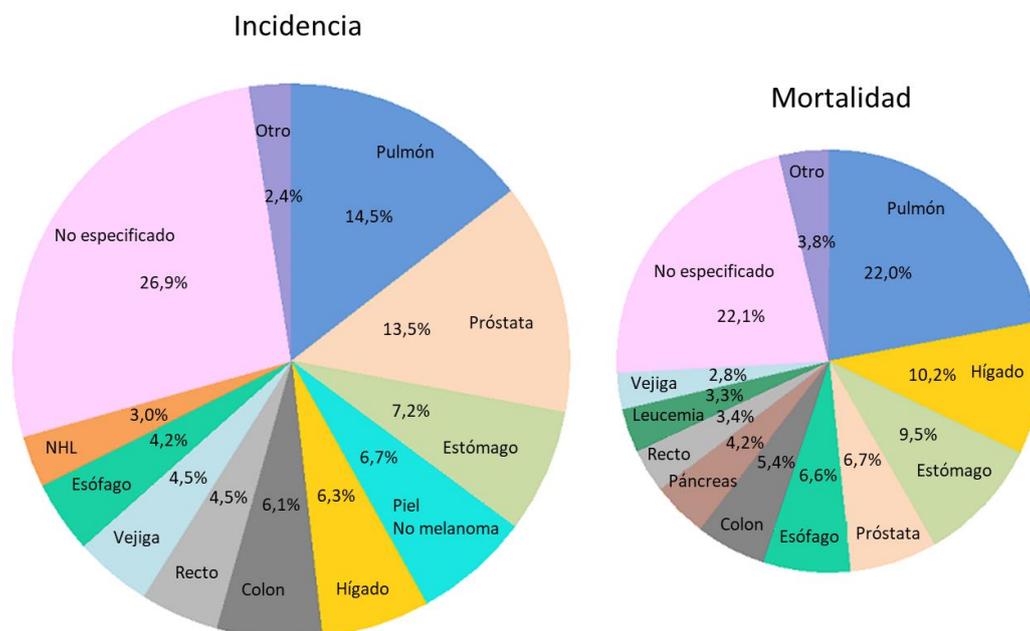


Figura 2. Cáncer en el mundo. Incidencia y mortalidad de cáncer en Hombres a nivel mundial. Modificado de Ferlay, J. et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods.¹²

La incidencia del cáncer de próstata aumenta vertiginosamente con la edad, siendo éste el mayor factor de riesgo. Los hombres con una edad promedio de 65 años que además cuentan con antecedentes familiares de cáncer tanto prostáticos como de mama se encuentran entre los más vulnerables¹³. El riesgo aumentado en pacientes con antecedentes familiares está influenciado por la edad de aparición y número de familiares afectados. Se ha estimado que cerca del 15% de quienes reciben un diagnóstico de cáncer de próstata tienen un pariente de primer grado con esta enfermedad¹³.

Por otro lado, si consideramos las distintas etnias, los hombres de origen afroamericano presentan mayor riesgo de desarrollar PCa y presentan sintomatologías más severas, con una tasa de mortalidad dos veces superior en comparación con la de hombres de origen caucásico¹⁴. Se ha asociado esta diferencia a factores genéticos

como también a factores socio-económicos, así como a la disponibilidad o acceso a servicios de salud ^{15,16}. La inflamación crónica también es causa de PCa y se da con mayor frecuencia en individuos afroamericanos. Adicionalmente, se han asociado factores de riesgo aspectos como la actividad sexual, la ingesta de grasa animal y de alcohol, el tabaquismo, la obesidad, la ingesta de minerales como calcio, selenio, zinc, y vitaminas D y E ¹⁷.

DETECCIÓN DEL PCA

Los métodos que se utilizan actualmente para la detección temprana del cáncer de próstata se basan en el examen DRE (tacto rectal) y la identificación de biomarcadores específicos. Los biomarcadores comprenden moléculas biológicas que indican la presencia o ausencia de un proceso patológico y que pueden ser detectadas en fluidos corporales, como sangre y orina. Las características ideales que debe presentar un biomarcador comprenden una alta estabilidad, especificidad, sensibilidad y practicidad, capacidad de cuantificación, extracción poco invasiva y que exista una asociación directa con el estado y progreso de la enfermedad, así como también con la respuesta a la terapéutica.

Actualmente, el antígeno específico de próstata (PSA) es el único biomarcador que se utiliza clínicamente en forma generalizada para la detección del PCa. Se trata de una serín-proteasa regulada por andrógenos, que es secretada por el epitelio prostático de las glándulas periuretrales. Sin embargo, este biomarcador presenta algunos inconvenientes. El principal problema de la búsqueda de PSA es su falta de especificidad; el mismo puede verse incrementado en otros cánceres, así como también en hiperplasia prostática benigna (HPB) y la prostatitis ¹¹. Adicionalmente, se ha visto que los niveles de PSA pueden variar bajo ciertas condiciones: aumentan con la edad, por el uso de drogas específicas, como hormonas masculinas, y por realizar ejercicio vigoroso o mantener relaciones sexuales días previos al examen ¹⁸. Por otra parte, disminuyen con el uso de inhibidores de la 5- α reductasa, mezclas de hierbas, obesidad, aspirina, estatina y diuréticos tiazídicos ¹⁹. Consecuentemente, los falsos positivos son el principal problema de este test; de hecho, se ha estimado que solo el 25-30% de los hombres con altos niveles de PSA en sangre tienen efectivamente PCa. Esto conlleva frecuentemente

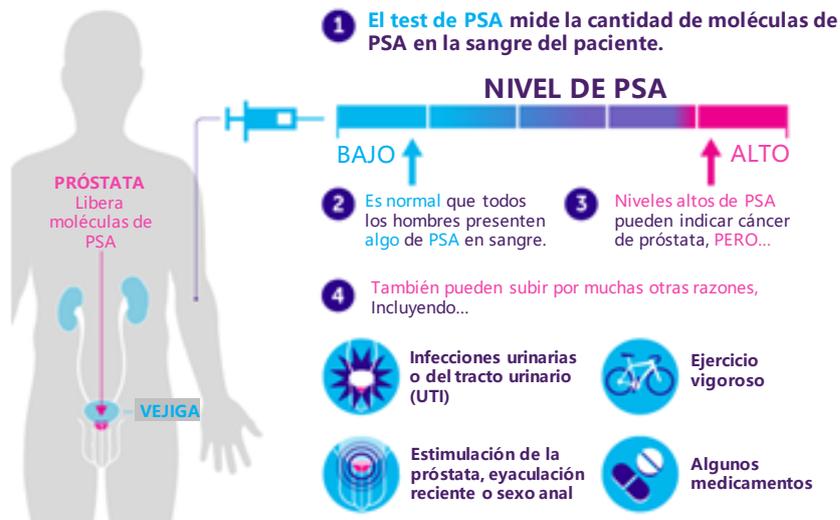
a un sobrediagnóstico que conduce a intervenciones innecesarias, produciendo alta morbilidad, además de costos de salud innecesarios ^{19,20}.

La baja sensibilidad y especificidad del PSA, así como la subjetividad del examen rectal para detectar un aumento o irregularidad en la morfología de la glándula prostática, hacen necesario la identificación de nuevos marcadores con el fin de predecir la severidad de la enfermedad, reducir la morbilidad y evitar tratamientos innecesarios²¹ **(Fig.3)**.

Teniendo en cuenta la problemática presente, en los últimos años se han descrito nuevos biomarcadores de PCa con el objetivo de mejorar los sistemas de detección utilizados actualmente, particularmente enfocados en aumentar la especificidad de diagnóstico y diferenciar entre los cánceres clínicamente agresivos de aquellos que son indolentes **(Fig.4)** ^{20,22}. Algunos de estos nuevos candidatos son derivados o isoformas del PSA. El Índice de Salud de la Próstata (en inglés, Prostate Health Index, PHI), es un test sanguíneo que toma en cuenta las concentraciones séricas de p2PSA, PSA total y PSA libre. Numerosos estudios han demostrado que el test PHI es más específico para la enfermedad clínicamente significativa en comparación con la evaluación de los componentes individuales.^{23,24} El test 4K Score (panel de cuatro calicreínas) combina en un algoritmo, el nivel de PSA total, PSA libre, PSA intacto y la calicreína humana 2 (hK2) conjuntamente con la edad, hallazgos del DRE (nódulo o no nódulo) y la historia de biopsia (si hay o no biopsia previa) ²⁰. Un puntaje más alto indica una mayor probabilidad de encontrar cáncer de próstata de alto grado en la biopsia. Al igual que PHI, esta prueba ha sido validada en grandes estudios de los EE.UU. y Europa, aunque aún no está aprobado por la FDA ^{25,26}.

El antígeno de cáncer de próstata 3 (en inglés, Prostate Cancer Antigen 3 o PCA3) ha sido aprobado en 2012 por la FDA como una prueba de diagnóstico del PCa en el marco de una biopsia de próstata negativa. Se trata de un ARN no codificante que se encuentra elevado en más del 90% de los hombres con PCa, no así en la glándula prostática normal o en la hipertrofia prostática benigna. Por lo tanto, se ha considerado muy útil en el momento de decidir realizar una re-biopsia y en el seguimiento de pacientes que requieren una vigilancia activa ^{27,28}.

EL TEST DE PSA Y POR QUE SUS RESULTADOS PUEDEN SER CONFUSOS



VENZAMOS AL CÁNCER ANTES
cruk.org



CRIBADO DE PSA EN HOMBRES

SI SE HICIERA CRIBADO DE PSA PARA DETECTAR CÁNCER DE PRÓSTATA

De 1.000 hombres entre 45-80 años, que no presentan síntomas...



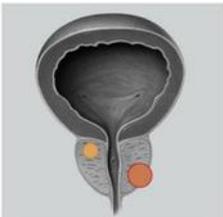
Referencia: Screening for Prostate Cancer (Review)
The Cochrane Library 2012



Figura 3. Problemas de PSA. Representación de la problemática que acarrea la detección de PCa por PSA. Modificado de la plataforma de Cancer Reaserch UK, “Why a one-off PSA test for prostate cancer is doing men more harm than good”, Marzo 2018.

Una mejor comprensión de las bases moleculares del proceso de carcinogénesis del PCa ha producido un aumento en el número de potenciales herramientas de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad ²⁹. Por ejemplo, la pérdida total o desregulación del gen PTEN se asocia con un mayor grado de Gleason, riesgo de progresión y la recurrencia después de la terapia. Además, se asocia con la enfermedad avanzada, tanto localizada como metastásica, y la muerte. El test para la detección de una deleción parcial o total del gen se realiza en hombres diagnosticados con PCa y puede ayudar a determinar la tasa de progresión de la enfermedad, así como también para determinar la terapia apropiada ^{27,20}.

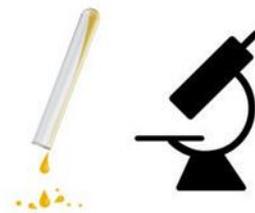
Biomarcadores para biopsia de próstata y estratificación de riesgo



Un solo umbral de PSA no puede excluir de manera confiable el cáncer de próstata. Los **biomarcadores** pueden estratificar el riesgo



El **índice de salud de la próstata** basado en PSA y la **puntuación de 4K** pueden aumentar la decisión de iniciar una biopsia o repetirla



La prueba de orina **PCA3** y la prueba de tejido **ConfirmMDx** pueden ayudar a decidir las repeticiones de biopsia

UROLOGY PRACTICE 

Loeb, S. *Urol Pract.* July 2017.

Copyright © 2017 American Urological Association Education and Research, Inc., Published by Elsevier

Figura 4. Nuevas opciones de diagnóstico. Resumen sobre las nuevas tendencias en el diagnóstico de PCa. Modificado de Loeb, S. Biomarkers for Prostate Biopsy and Risk Stratification of Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer. *Urol. Pract.* 4, 315–321 (2017) ²².

Debido a la naturaleza heterogénea del PCa, se hace difícil identificar un único biomarcador adecuado. Por este motivo, la evidencia actual muestra una tendencia al uso de paneles o series de marcadores (denominados en inglés: *Multiplexing*) para caracterizar los fenotipos heterogéneos del PCa en la población. Los recientes avances en las tecnologías de alta procesividad (en inglés: *high-throughput technologies*) permiten la rápida cuantificación y comparación de la expresión de diversas moléculas en un gran número de muestras. Esto impulsó la creación de varios paneles de genes

que ya están disponibles en el mercado, entre ellos, Prolaris, Oncotype DX Genomic Prostate Score y Decipher, que pueden ser utilizados para estimar evolución de la enfermedad, además de los parámetros clínicos ²⁹. ConfirmMDx es un test que detecta marcas epigenéticas características del proceso de carcinogénesis, que pueden estar presentes a pesar del fenotipo normal de las células. Se ha demostrado que ayuda a distinguir entre aquellos pacientes que presentan una biopsia negativa real y aquellos que podrían estar desarrollando la enfermedad ²¹. Adicionalmente, proporciona información útil para evitar que aquellos hombres que realmente no presentan PCa no se sometan a re-biopsias innecesarias. Estrategias futuras adicionales incluyen el uso de la información genética de las células tumorales circulantes en la sangre periférica para el diagnóstico inicial, así como también para la toma de decisiones en las etapas posteriores. ²⁹

METÁSTASIS

GENERALIDADES

Comprender la forma en la que las células cancerosas son capaces de abandonar el nicho del tumor primario, migrar por el cuerpo y residir en un órgano totalmente distinto al de su origen, es uno de los objetivos de mayor investigación en cáncer. El motivo: es la causante mayoritaria de la mortalidad por cáncer debido a su resistencia a las terapias actuales ^{30,31}.

El término “metástasis” proviene del griego Μετάσταση y significa “mudarse de lugar” o “transferencia”. Esta es una propiedad que no es compartida por todas las células de un tumor, es decir, no todas tienen la capacidad para abandonar el tumor primario y diseminarse. Muchas veces el término “maligno” es utilizado como sinónimo de neoplasia o tumorigénico, sin embargo, es necesario diferenciar la transformación neoplásica de la capacidad de producir metástasis.

Un proceso celular muy importante para que esto suceda, y altamente descrito es la Transformación Epitelio-Mesenquimal (EMT). Se trata del proceso por el cual las células epiteliales pierden sus características y adoptan un fenotipo más mesenquimal e

invasivo. La EMT se caracteriza por la pérdida de la polaridad apico-basal y de adhesiones célula-célula, y la ganancia de una morfología celular tipo huso que le confiere una capacidad invasiva mayor para adentrarse en la matriz extracelular ^{32,33} **(Fig.5)**. Esto implica a nivel molecular la disminución en la expresión de ciertas moléculas como E-cadherina y citoqueratina, y la adquisición de marcadores celulares mesenquimales como vimentina. El proceso de EMT es importante en el desarrollo embrionario, particularmente en la gastrulación y la formación de la cresta neural, donde es fundamental que ciertos tipos celulares sean capaces de migrar a zonas diferentes para una correcta organogénesis. En el adulto, la EMT cumple funciones en la reparación de heridas, formación de la placenta, fibrosis de tejidos y en la formación de metástasis. Una vez que las células metastáticas han alcanzado el órgano blanco deben someterse al proceso inverso, la Transformación Mesenquimal-Epitelio (MET), para poder colonizar un nuevo lugar y dar origen a un nuevo tumor ^{34,35}.

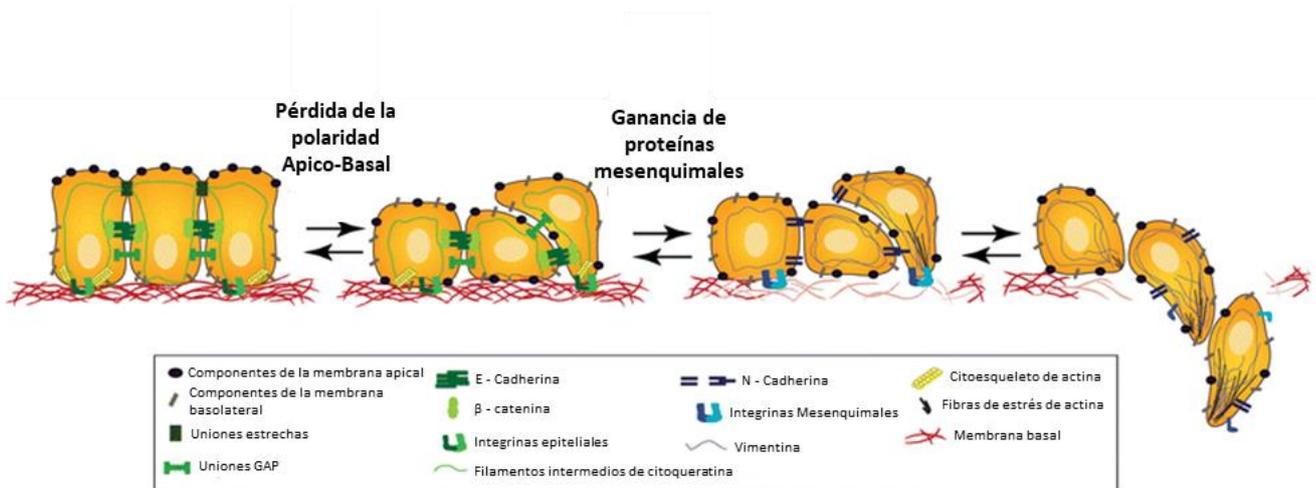


Figura 5. Transformación Epitelio-Mesenquimal (EMT). Moléculas implicadas en ambas transiciones. Modificado de “How Cancer Metastasis Works: EMT and MET” de everydaybiochemistry.wordpress.com³⁶

La forma más común e importante de la metástasis es la invasión y penetración de células malignas en venas o vasos linfáticos, con la siguiente diseminación a órganos distantes **(Fig.6)**. Las arterias y arteriolas no son frecuentemente invadidas, ya que ofrecen una resistencia mucho mayor por la presencia de múltiples capas celulares. Este no es el caso de vénulas o vasos linfáticos que están formados por paredes

relativamente finas y que facilitan de alguna manera el proceso de invasión e intravasación. Sin embargo, el hecho de invadir un vaso linfático o sanguíneo no garantiza la metástasis, ya que hacen falta aún la supervivencia dentro del vaso, la extravasación y el crecimiento en un nuevo sitio.

El desarrollo de metástasis es altamente selectivo. Las células malignas que son capaces de completar todo el proceso y que sobreviven las condiciones hostiles que se le presentan, son solamente una pequeña porción de las células del tumor primario. Se estima que la mayoría de las células malignas que completan la invasión nunca llegan a finalizar todos los pasos, por lo que se trata de un proceso bastante ineficiente ³⁷.

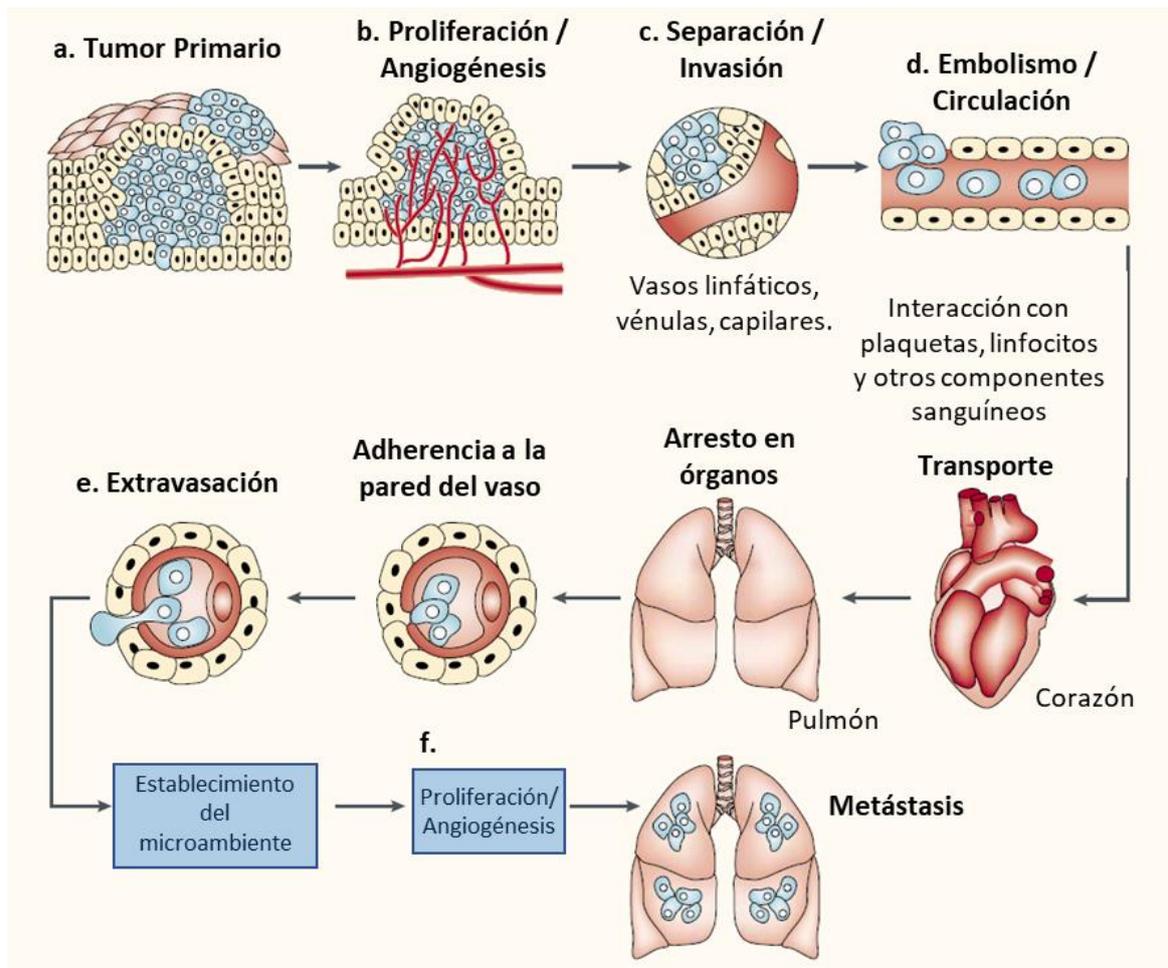


Figura 6. Modelo del proceso metastático. Modificado de Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: The 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003) ³⁸.

La extravasación típicamente ocurre unas pocas horas luego de la adherencia a la pared del vaso, se extienden protrusiones celulares y el núcleo se deforma para poder pasar por las ranuras estrechas del mismo, lo que indica la presencia de un proceso activo. En algunos tumores metastáticos las células pueden proliferar dentro de los vasos, y de esta manera, aumentar la masa celular dentro del capilar podría romper el endotelio, permitiendo el acceso de las células tumorales simplemente por movimientos mecánicos para invadir los tejidos adyacentes ^{39,40}.

La razón por la cual en un mismo tumor primario conviven células con capacidades diferentes, es que en realidad los tumores son masas genéticamente heterogéneas, donde las células que los conforman atraviesan un proceso selectivo de desdiferenciación y diferenciación muy dinámico. No todas las células que sobreviven en sitios secundarios tienen la capacidad de proliferar. Esto se debe a que no todas las células tumorales tienen el mismo potencial replicativo. Existen algunas células tumorales que tienen propiedades similares a las células madre, comúnmente llamadas Células Madre de Cáncer (en inglés: “*cancer stem cells*” (CSCs)). Considerando este modelo, solamente si una CSC alcanza el sitio secundario se producirá la metástasis macroscópica. Además, teniendo en cuenta la interacción de esta CSC con el entorno del sitio secundario, afectará en forma positiva o negativa para la formación de metástasis. Es decir, las CSCs son la fuerza que dirige la tumorigénesis, debido a la capacidad de autorrenovación y diferenciación a distintos linajes por división simétrica o asimétrica (**Fig.7**). En contraste, su descendencia, las células progenitoras y células cancerosas diferenciadas, pierden su habilidad de autorrenovación y proliferación ilimitada, y por tanto no poseen capacidad tumorigénica ^{41,42,43}.

Los estudios clínicos de pacientes con cáncer y los modelos murinos de cáncer han revelado que el proceso metastático no se da al azar. Es sabido que ciertos tipos de cáncer hacen metástasis en algunos órganos mientras que en otros no, expresando determinados patrones característicos. Estos patrones son independientes de la anatomía vascular, el flujo sanguíneo y del número de células tumorales que ingresan a cada órgano. Datos experimentales de células B16 de melanoma sobre invasión y crecimiento preferencial a algunos órganos apoyan la hipótesis de Paget, de la “tierra y semilla” ²⁶. Cuando las células de melanoma eran introducidas a la circulación en ratones

singénicos, los tumores crecían en los pulmones o en porciones de tejido pulmonar u ovárico que eran implantados intramuscularmente. En contraste, las lesiones metastáticas no se desarrollaban en tejido renal implantado, o en el mismo sitio de inyección. Esto indica que los sitios de metástasis están determinados no solamente por las características neoplásicas de las células, sino que el microambiente generado por los órganos que las hospedarán son un factor que influye fuertemente en este proceso³⁸. Por ejemplo, las células de la vasculatura de cada órgano expresan diferentes receptores en su superficie y factores de crecimiento que influyen en el fenotipo metastático ³⁸. Esta hipótesis da fundamentos para la creación de nuevas drogas para tratar a pacientes metastáticos, ya que “la tierra” donde se implanta la “semilla” es biológicamente única

44 .

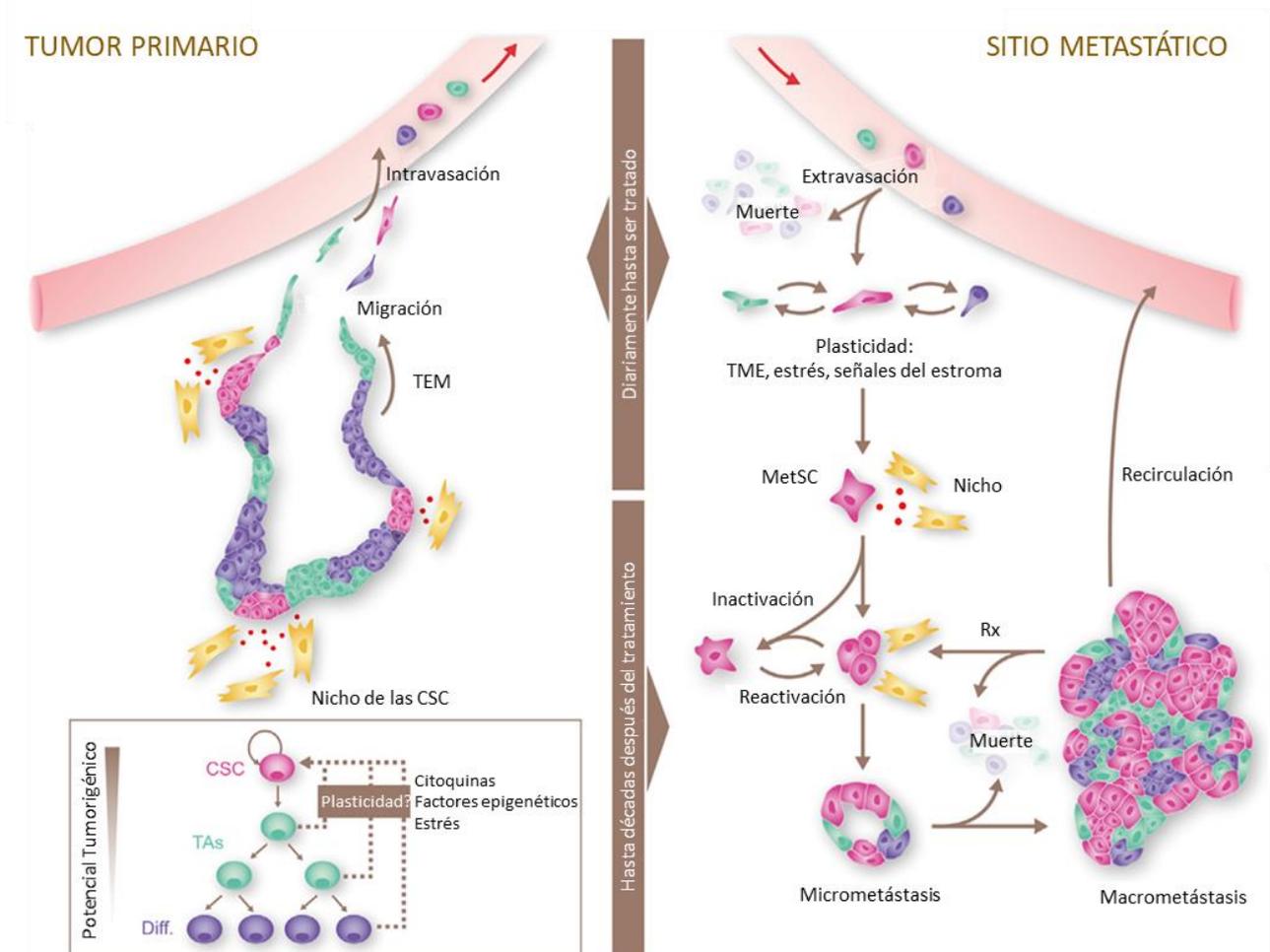


Figura 7. Plasticidad de las Células Madre de Cáncer (CSC). La jerarquía clásica de las células madre no se respeta en este caso, sino que la diferenciación es dinámica en todas las direcciones bajo circunstancias de estrés o por la presencia de ciertas citoquinas. Estas características permiten la adaptación a nichos diferentes al del tumor primario. Tas (Transit amplifying progenitors). Modificado de Oskarsson, T., Batlle, E. & Massagué, J. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. (2014)⁴².

MODELOS DE ESTUDIO DE METÁSTASIS *IN VITRO*

El estudio de la metástasis *in vitro* es un desafío importante teniendo en cuenta todos los factores implicados difíciles de modelar, como el nicho del tumor primario, la matriz extracelular, la presencia del sistema inmune, entre otros. Existen ensayos en dos dimensiones (2D) y tres dimensiones (3D) con diferentes características (**Fig.8**), que presentan enfoques a diferentes etapas del proceso y son bien aceptados por la comunidad científica como buenos predictores del comportamiento *in vivo*.

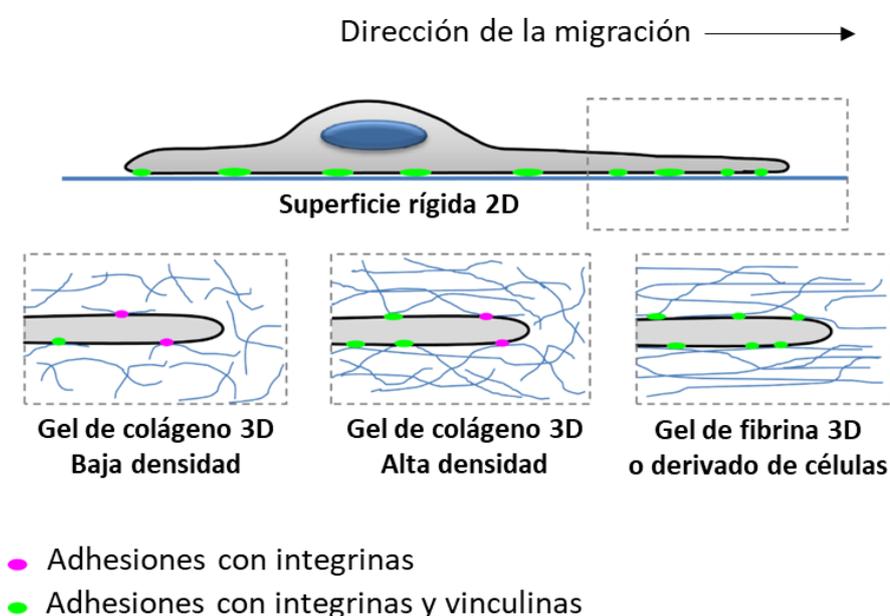


Figura 8. Diferencias en la adherencia de modelos 2D y 3D. En superficies rígidas 2D y 3D las células se adhieren firmemente al sustrato utilizando adhesiones tanto de integrinas como de vinculina. En matrices 3D más laxas todavía se forman uniones con integrinas y vinculina, pero son menos y más pequeñas, las uniones de vinculina disminuyen considerablemente. Modificado de Jill S. Harunaga and Kenneth M. Yamada, Cell-Matrix Adhesions in 3D, Matrix Biol. 2011 September ⁴⁵.

Ensayo de adhesión tumor-matriz bidimensional

En este tipo de ensayos se busca evaluar la relación de las células con la matriz extracelular, es decir, si han comenzado el proceso de EMT. Se siembran células en una placa previamente cubierta con proteínas de matriz extracelular, como por ejemplo colágeno. Los receptores que actúan en la unión célula-matriz son bloqueados con

anticuerpos o algún inhibidor específico y la adhesión es cuantificada por conteo celular utilizando métodos colorimétricos o fluorimétricos ⁴⁶. El punto clave en este ensayo es la elección de la composición de la matriz, ya que debe ser representativa del paso de metástasis que se evalúa (si se trata de EMT o de MET) y del tipo tumoral que se trabaja. Otras variables importantes son la duración del ensayo y la cantidad de suero con la que se incuban las células.

Ensayos de Migración Celular Bidimensional “Herida-Cicatrización”

Es importante evaluar la migración celular porque la capacidad de desplazarse es necesaria para prácticamente todo el proceso. Las células pueden migrar siguiendo diferentes atractores químicos o sustratos adherentes, o simplemente de forma azarosa. En el caso del ensayo de herida-cicatrización (en inglés: *wound healing*) se realiza una “herida” en un cultivo celular en monocapa confluyente. Este ensayo no es adecuado para evaluar la quimio-atracción o en el caso de células no adherentes ⁴⁷. Para disminuir la replicación celular mientras se evalúa el tiempo que tardan las células en llenar los espacios de la herida, suele utilizarse medio sin suplementación de suero ⁴⁸. Este ensayo es explicado en detalle en la sección de Materiales y Métodos.

Ensayo de cerrado de zona de exclusión celular o cerrado de hueco.

Se trata de un ensayo bidimensional que evalúa la migración de forma similar al ensayo de herida-cicatrización. Las células se siembran en placas con barreras físicas adheridas al pocillo o soporte donde son sembradas, que son retiradas cuando la monocapa alcanza la confluencia. De esta manera, se obtiene una zona libre de células que será evaluada de manera similar al ensayo de migración anterior, con la ventaja de ser más reproducible y de reducir los restos celulares producidos por la herida. Es importante usar una barrera física que no dañe la superficie adherente del pocillo o soporte que se está utilizando. Son frecuentes los *stoppers* de silicona ⁴⁸.

Ensayo de “Transwell”

En este tipo de ensayo se utilizan cámaras *transwell* donde son sembradas las células, y se monitorea la migración de las células que son capaces de atravesar sus poros atraídas por un quimio-atrayente ubicado en la cámara baja. Esta aproximación posee la ventaja de que permite medir la migración de células no adherentes. La

cuantificación se realiza por conteo utilizando generalmente métodos colorimétricos o fluorimétricos.

Cultivo y Adherencia en matrices 3D

Es sabido que el cultivo en matrices 3D ofrece múltiples ventajas frente a los cultivos en monocapa, ya que permite la formación de un microambiente más semejante a las condiciones fisiológicas *in vivo*. Esta aproximación da lugar al estudio de interacciones que no ocurren cuando las células están adheridas a una monocapa horizontal. Este tipo de ensayo es el más adecuado a la hora de evaluar la acción de alguna droga anti-tumoral, al tener en cuenta la topografía de un tumor sólido ⁴⁹. Algunas de las maneras posibles de generar estos agregados celulares o esferoides, se realizan mediante la utilización de técnicas como: gota colgante ⁵⁰, *liquid overlay* ⁵¹ o esferoides crecidos en esferas *microcarriers* ⁵².

A pesar de las numerosas ventajas con las que cuentan estas metodologías, presentan algunas desventajas a la hora de tomar imágenes y en la caracterización de complejos de adhesión. Conjuntamente, estos complejos de adhesión dependen de la composición de la matriz, así como también la solidez del tumor y su morfología ⁴⁹. Otro aspecto para tener en cuenta es la variación de la concentración de factores de crecimiento u otros componentes menos caracterizados entre diferentes lotes, que puedan influenciar la respuesta tumoral. Esto puede afectar a la reproducibilidad de los ensayos y conducir a errores en la interpretación de los resultados, por la falta de comprensión de la forma en la que ciertas interacciones bioquímicas producen cambios dinámicos en los tumores ^{53,54,55}.

Ensayo de invasión In Vitro con Matriz Extracelular

Este ensayo se encuentra explicado en detalle en la sección de Materiales y Métodos, es una alternativa rápida, simple, cuantitativa, reproducible y de relativamente bajo costo comparado con los modelos animales. Además, suele mostrar una correlación positiva del potencial metastático con los resultados de modelos animales. El mismo evalúa el proceso de la degradación de matriz extracelular dependiente de metaloproteasas (MMPs) que deben liberar las células malignas en orden de realizar una invasión exitosa.

Ensayo in vitro de Adhesión Tumor-Endotelio

Esta aproximación evalúa la capacidad de unión de células tumorales a células endoteliales. En los procesos de intravasación y extravasación es fundamental la interacción de las células tumorales con los vasos sanguíneos para facilitar la colonización de sitios secundarios. Estas interacciones dependen de receptores en la membrana de las células endoteliales y de receptores para la membrana basal (integrinas y las selectinas) ^{56,57}. Se desarrollaron técnicas de cultivo de células de endotelio que son activadas con citoquinas como TNF- α , a las que luego se agregan las células tumorales marcadas fluorescentemente y se evalúa la adhesión de las mismas al endotelio luego de 10-30 minutos.

Una de las desventajas de este ensayo es que no representa el estado *in vivo* de un vaso sanguíneo que contiene flujo en movimiento y que por lo tanto ofrece fuerzas de resistencia en contra de la adhesión. Otro aspecto a tener en cuenta es la variedad de receptores de membrana que expresan los endotelios en función del órgano en el que se encuentran, así como también el tipo tumoral. Esto va de la mano con la hipótesis de “tierra y semilla”. Este ensayo ha pasado al siguiente nivel en algunos modelos 3D, donde se induce a las células endoteliales a formar vasos en cultivos de Matrigel ⁵⁸.

MODELOS DE ESTUDIO DE METÁSTASIS IN VIVO

Si bien la gran mayoría de estudios de metástasis se ha realizado *in vitro* tanto en modelos bi como tridimensionales, estos métodos tienen algunas limitaciones a la hora de predecir lo que ocurrirá *in vivo*, y solamente permiten el estudio de un paso específico de la metástasis. Además, es difícil replicar condiciones como la respuesta del sistema inmunológico. Por estas razones, también se utilizan modelos animales para el estudio completo del proceso de metástasis y validación de los resultados observados en ensayos *in vitro*.

Modelos de Metástasis Inducida Químicamente.

En este tipo de modelos se induce la producción de metástasis como consecuencia del uso de diferentes agentes tumorigénicos.

Carcinogénesis en dos pasos: DMBA/TPA para cáncer de piel.

Es uno de los modelos más conocidos para modelar el Carcinoma de Células Escamosas (SCC) y metástasis en ratones. La iniciación de la tumorigénesis se logra por la administración del compuesto aromático DMBA (7,12-dimethylbenz[α]anthracene) a la piel dorsal con dosis sub-carcinogénicas. Una semana después de este tratamiento se aplica dos veces por semana el éster TPA (12-Otetradecanoylphorbol-13-acetate), que comienza a promover el crecimiento tumoral ⁵⁹.

La hidrólisis de DMBA produce la unión de este al ADN incrementando el riesgo a mutaciones en las células basales de la epidermis y en los folículos pilares. Luego las múltiples aplicaciones de TPA promueven el crecimiento desregulando varias vías de señalización que influyen en la proliferación, diferenciación e inflamación. La mayor ventaja de este método es que imita de forma muy similar a la patología en humanos, que frecuentemente genera metástasis en nodos linfáticos y pulmones ⁶⁰. A pesar de esto, hay algunas diferencias con humanos, por ejemplo, que el uso de los químicos para el desarrollo de la enfermedad quizá no refleje la patología humana ⁵⁹.

Carcinogénesis en dos pasos: DEN/NMOR para carcinoma hepatocelular

El Carcinoma Hepatocelular de humanos comúnmente hace metástasis en pulmones, nodos linfáticos, glándulas adrenales y huesos. Para modelar esta enfermedad, se administra a ratas F344 una dosis de dietilnitrosamina (DEN) que inicia la carcinogénesis en el hígado. Luego, se administra oralmente N-nitrosomorfolino (NMOR) durante 14 a 24 semanas. Los animales bajo este tratamiento muestran lesiones metastáticas en pulmones a las 24 semanas ⁶¹. Es un muy buen modelo de la enfermedad en humanos y por tanto, ofrece una herramienta muy útil para estudiar la eficacia de terapias anti-metastáticas *in vivo*.

Trasplante de Tumores

Implica la inoculación de células o tejido humano (xenoinjerto) o ratón (singénico o aloinjerto) que puede eventualmente metastatizar en un huésped murino. El modelo

de trasplante espontáneo de metástasis es útil para analizar etapas tempranas. Sin embargo, estos modelos experimentales de trasplante no poseen la etapa de formación del tumor primario y los primeros pasos de la metástasis. La elección de un modelo singénico o xenogénico depende en la pregunta que se quiere contestar.

Para prevenir el rechazo de las células humanas en modelos xenogénicos se suele deprimir el sistema inmune del huésped. El reclutamiento y la activación del sistema inmune innato pueden afectar varios procesos requeridos para la formación de metástasis, incluyendo la formación de angiogénesis y supervivencia del tumor. Esta representa la mayor limitación de este tipo de modelos, dado que no se está modelando el efecto del sistema inmune. Los ratones inmunocomprometidos más utilizados son los nude, NOD/SCID. Un mecanismo para modelar mejor la respuesta inmune humana es administrar al ratón medula ósea o sangre humana, lo que mejora el valor de los resultados obtenidos para predecir lo observado en la clínica^{62,63}.

En el caso de los modelos singénicos se tiene a ventaja de que las células tumorales y el huésped responden al mismo sistema inmune y comparten la misma genética, lo que resulta ventajoso en la interacción del microambiente tumor-estroma, respuesta inmune y señalización endocrina⁶⁴.

La selección apropiada entre un modelo espontáneo o experimental depende del paso específico de la metástasis que se está estudiando, el poder metastático de las células que se utilizan, y los oncogenes o supresores tumorales que se investiguen. Combinar los resultados del uso de ambos modelos es útil para la interpretación de los mecanismos moleculares de metástasis y de respuesta a drogas terapéuticas.

El sitio de implantación en modelos experimentales puede influir significativamente en la distribución y en el potencial metastático y, en consecuencia, su relevancia clínica⁶⁵. Mientras que la inyección de células tumorales en la vena lateral de la cola produce predominantemente metástasis pulmonares⁶⁶, la inyección intracardíaca aumenta la frecuencia de metástasis hepáticas, ováricas, de las glándulas suprarrenales, óseas y cerebrales^{65,66,67}. La inyección intracarotidea da lugar a metástasis cerebrales⁶⁸. En consecuencia, la selección de un sitio experimental de trasplante para introducir células tumorales directamente en el torrente sanguíneo debe tener en cuenta el sitio metastático común que se está investigando. Por ejemplo,

los cánceres de próstata y de mama humanos comúnmente hacen metástasis al hueso y, por lo tanto, una inyección intracardiaca sería apropiada para modelar experimentalmente estos cánceres ^{67,69}.

Trasplante de Tumores Primarios

Se ha demostrado que la implantación de células y tejidos directamente de un paciente en huéspedes inmunocomprometidos conserva mejor las características clinicopatológicas de la enfermedad humana, más allá de las líneas celulares de cáncer establecidas, lo que mejora drásticamente la relevancia clínica y las predicciones terapéuticas ⁷⁰.

Modelos de Metástasis de Ratones Genéticamente Modificados (GEMM)

Los modelos transgénicos permiten el análisis de respuestas específicas a la activación oncogénica o la pérdida de supresores de tumores. Los GEMM brindan información valiosa sobre los mecanismos moleculares subyacentes a la cascada metastásica que no pueden modelarse fácilmente en la singénica y sistemas xenogénicos⁷¹.

Las principales ventajas de los modelos transgénicos es que incluyen un sistema inmune intacto, interacciones microambientales tumorales-estromales específicas de la especie y todas las etapas de la progresión metastásica. Sin embargo, estos modelos pueden presentar varias limitaciones. La mutación bialélica de genes esenciales frecuentemente causa letalidad embrionaria o neonatal, la aparición de tumores concomitantes puede causar letalidad antes de que prevalezca la enfermedad metastásica, y eventos oncogénicos genéticos y/o epigenéticos adicionales pueden ser necesarios para iniciar el crecimiento tumoral y progresión. En general, los modelos transgénicos *knockout* presentan un avance metastásico relativamente bajo, predominantemente debido al rápido crecimiento de tumores primarios. En consecuencia, estos modelos se emplean principalmente para estudiar el papel funcional de oncogenes y los supresores de tumores durante la formación y progresión de tumores ⁶².

MICROARNS

GENERALIDADES

Los microARNs (miRs) son pequeñas moléculas de ARN simple hebra de aproximadamente 22 nucleótidos (nt) de longitud, codificados en el genoma de una diversidad de organismos como plantas, animales, hongos y virus. Estas pequeñas moléculas de ARN simple hebra con capacidad reguladora de ARNs mensajeros (ARNm) hicieron replantear el dogma central de la biología y prometen el avance de la medicina preventiva hacia nuevas fronteras ⁷². Los miRs tienen como función el silenciamiento génico post-transcripcional, que logran al complementar parcialmente una corta sección de su secuencia, llamada semilla, a regiones reguladoras del 3' UTR del ARN mensajero diana ⁷³. Algunos estudios recientes muestran evidencias de que la región codificante e incluso la 5' UTR del ARNm también puede ser reconocidas. En algunos casos no tan clásicos, se ha visto que los miRs pueden también activar la expresión génica en lugar de reprimirla. Específicamente, se ha demostrado que varios miRs se encuentran sobreexpresados en el núcleo, y que activan la transcripción mediante su interacción con la región promotora del gen blanco ⁷⁴. Los mecanismos por los cuales estos pequeños ARNs son capaces de inhibir la expresión génica son básicamente cuatro: degradación del ARN mensajero blanco, inhibición de la elongación de la traducción, terminación prematura de la traducción e inhibición del inicio de la traducción ⁷⁵.

Avances en la caracterización de los miRs y de las técnicas para su análisis funcional han elucidado sus funciones en varios procesos celulares, y también han descrito patrones anormales de expresión en varias enfermedades, entre ellas el PCa. Estudios realizados en la última década han demostrado que los miRs tienen un rol crucial en la mayoría de los procesos biológicos, incluyendo el desarrollo embrionario, diferenciación, proliferación, determinación celular, transducción de señales, desarrollo de órganos, diferenciación del linaje hematopoyético, apoptosis, interacciones virus-huésped y tumorigénesis ⁷⁶.

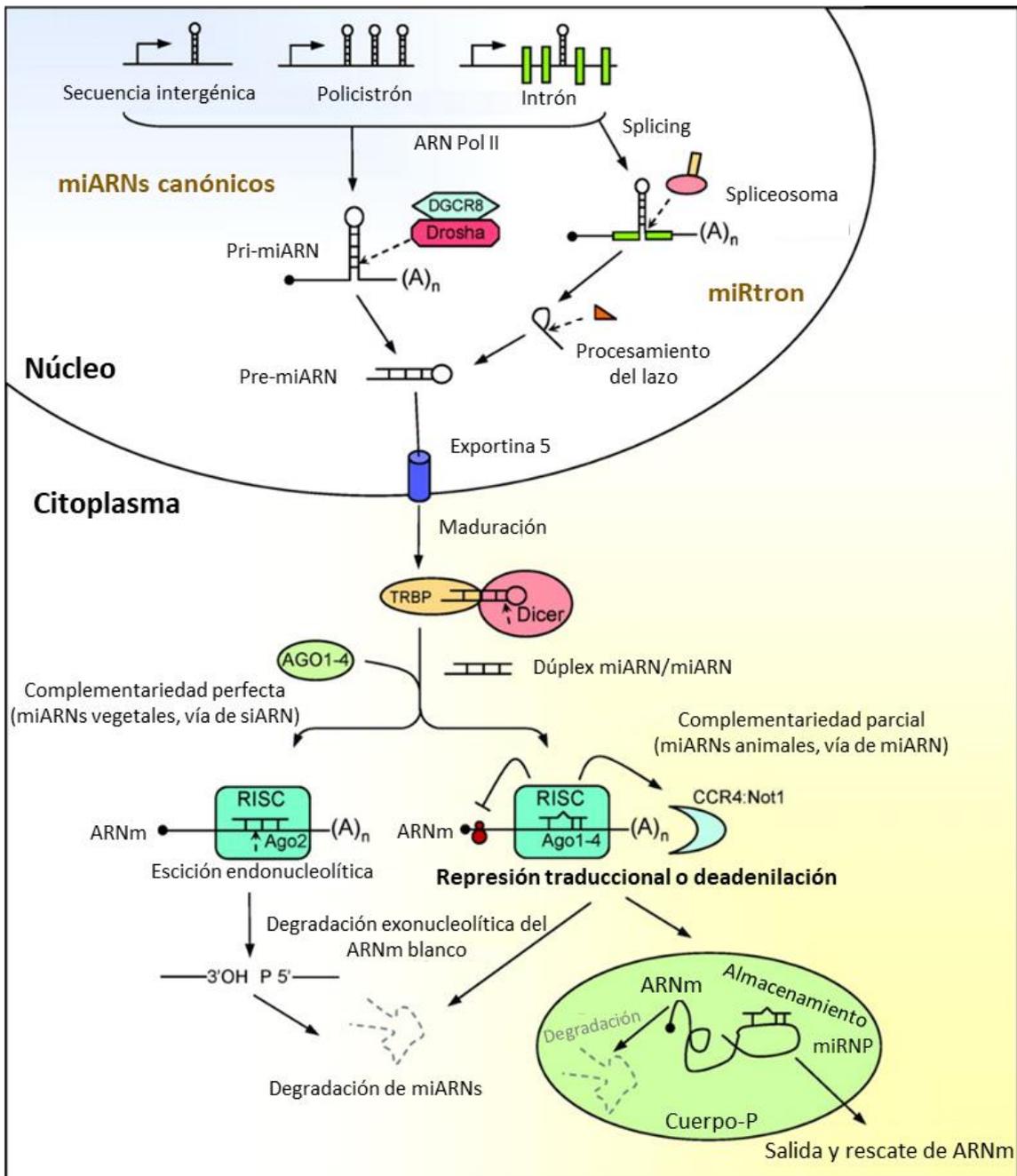


Figura 9. Biogénesis de los miRs. Modificado de Sessa, W. C. MicroRNAs As Novel Regulators of Angiogenesis. 442–454 (2009) ⁷⁷.

BIOGÉNESIS

El proceso de biogénesis de los miRs puede presentar variables dependiendo de cada organismo, pero en general, conserva los pasos básicos para su expresión (**Fig.9**). Se trata de un complejo proceso de múltiples etapas que tiene su comienzo en el núcleo,

atravesando varias modificaciones post-transcripcionales y finalizando su acción en el citoplasma celular. Generalmente son transcritos por la ARN polimerasa II al igual que los ARNm, donde se genera un miR primario (pri-miRNA) que se caracteriza por su estructura secundaria en forma de horquilla. El pri-miRNA es reconocido por la ARNasa nuclear III Drosha, junto con su cofactor DGCR8^{78,79}. Estas proteínas en asociación con otras más son conocidas como el complejo Microprocesador, se encargan de catalizar la escisión del pri-miRNA en un precursor de miR (pre-miRNA) de aproximadamente 60-100 nt⁸⁰. Este intermediario es exportado desde el núcleo al citoplasma vía Exportina-5, una vez en el citoplasma una segunda ARNasa III, Dicer en complejo con TRBP (proteína de unión a ARN de doble cadena), generan dos escisiones que definen un dúplex de 2 miR maduros, que serán denominados como miR 3p o 5p en función del extremo del pre-miRNA que les ha dado origen. En general, uno de estos dos miR maduros es descartado dejando a su complementario como el biológicamente funcional, el cual se asociará al complejo RISC (complejo de silenciamiento inducido por RNA) y será el encargado de guiar el reconocimiento de su ARNm blanco⁸¹.

MIRS EN CÁNCER

Al igual que los factores de transcripción, los miRs regulan diversos procesos celulares y se encargan de regular la mayoría de las vías conocidas⁸². La asociación de los miRs con cáncer fue reportada por primera vez en 2002, cuando se identificó un *cluster* de dos miRs: miR-15 y -16, en la región cromosómica 13q14.3, una zona que se encuentra frecuentemente deletada en la leucemia linfocítica crónica (CLL)⁸³. A partir de esta fecha ha sido reportado en una enorme cantidad de trabajos la presencia de miRs con expresión desregulada en todo tipo de cáncer, afectando la progresión de la enfermedad^{84,85}. Por ende, también fueron clasificados bajo los nombres oncomiRs y miR supresores tumorales, según su expresión se encuentre incrementada o disminuída en células tumorales y repriman la expresión de genes supresores de tumor u oncogenes, respectivamente⁸².

Con la ola de la secuenciación masiva ha progresado significativamente el estudio de genes a gran escala y por ende se produjo la disminución de los costos a la hora de analizar muestras. Es posible realizar el perfil genómico de un tumor y asociar ciertos patrones de expresión de miRs a ciertos tipos específicos de cáncer, de la misma manera en la que se asocian ciertos genes codificantes de proteínas ⁸⁶. De hecho, en los últimos años se está estudiando la forma de realizar test que permitan diferenciar entre diferentes grados de progresión de un mismo tipo de tumor con expresión de miRs ⁸⁷. Otra nueva aplicación que se está estudiando actualmente es la posibilidad de utilizar miRs terapéuticos anticancerígenos. Aprovechando la capacidad que tiene un solo miR de silenciar varios genes simultáneamente, se espera poder expandir las posibilidades de tratamiento. Sin embargo, uno de los retos que impone este nuevo procedimiento es alcanzar la correcta especificidad, eficiencia y seguridad *in vivo* ⁸⁸. Recientemente, la FDA (*US Food and Drug Administration*) aprobó la primera terapia basada en pequeños ARNs no codificantes para tratar una enfermedad rara humana ⁸⁹. Este hecho, demuestra el potencial terapéutico de este tipo de pequeños ARNs no codificantes y abre la posibilidad de éxito de nuevas terapias basadas en otros pequeños ARNs no codificantes.

MIRS BIOMARCADORES

Teniendo en cuenta los puntos mencionados hasta ahora, resulta de forma instintiva pensar en el uso de miRs como biomarcadores. Cumplen con varias de las condiciones enumeradas para un buen candidato a biomarcador, así como se ha reportado en varios trabajos las ventajas que ofrece el manejo de estas pequeñas moléculas. Entre sus ventajas, se encuentra su estabilidad en sangre y orina, la correlación de ciertos miRs específicos de tejido, la poca invasividad al tratarse de muestras de fluidos corporales ⁸⁵. Varios miRs se encuentran desregulados de manera única en ciertos tipos de tumores comparados con su expresión en tejido normal. Por tanto, estas moléculas tienen valor pronóstico y diagnóstico, y su presencia o ausencia

pueden indicar el sitio de origen del tumor, etapa de progresión, y otros factores fisiológicos relevantes ⁹⁰.

El desarrollo de métodos de cuantificación muy sensibles para estas moléculas, por ejemplo, qRT-PCR (PCR Cuantitativa en Tiempo Real) ha mejorado la sensibilidad de detección de los miRs a solo algunos nanogramos de ARN. Esta cantidad puede ser fácilmente obtenida con una biopsia de aguja fina (FNAB), de hecho, se han reportado medidas exitosas de miRs con esta metodología ⁹¹.

A pesar de todos los avances y resultados alentadores sobre el uso de miRs circulantes como futuros biomarcadores, todavía es necesario resolver algunos inconvenientes. En primer lugar, la extracción de miRs extracelulares no es una tarea sencilla, ya que se presentan en cantidades pequeñas en fluidos extracelulares y no hay protocolos consensuados sobre el proceso de extracción y almacenamiento de muestras. Por otra parte, la falta de normalizadores endógenos fiables dificulta la cuantificación específica de miRs circulantes. De momento, no existe un consenso en cuanto a la metodología a seguir, la obtención y preparación de las muestras y el método de cuantificación y normalización de los resultados. Por estos motivos, es necesaria la estandarización de protocolos para el desarrollo de miRs circulantes como nuevos biomarcadores. De momento, la alternativa más novedosa es la Droplet Digital™ PCR (ddPCR), que realiza cuantificación absoluta de miRs sin necesidad de genes normalizadores ni curvas de calibración de miR para cuantificar ^{92,93,94}.

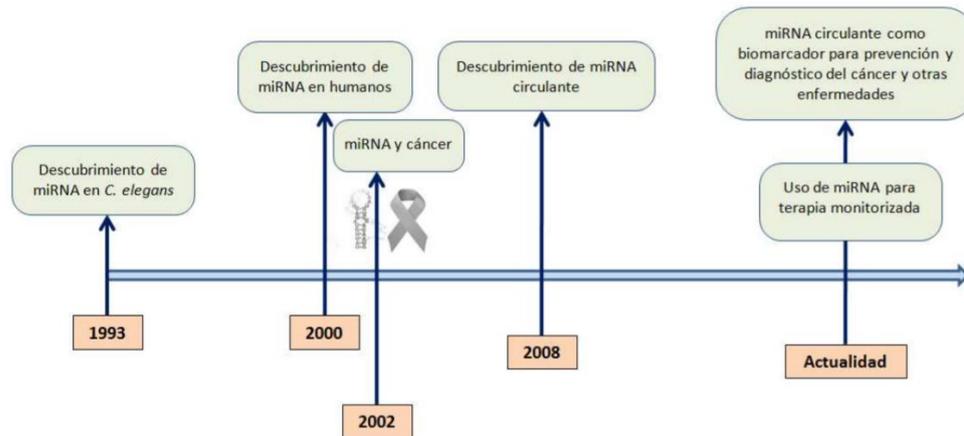


Figura 10. Línea del tiempo de miRs. Cronología de algunos de los grandes acontecimientos en el campo de los miRs desde su descubrimiento hasta la actualidad. Extraído de *MicroRNAs Circulantes: ¿Nuevos Biomarcadores en Cáncer?* Ana Belén Arroyo-Rodríguez y Salam Salloum-Asfar. Departamento de Medicina Interna, Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia. Revista Eubactea (Nov 2013) Nº 32 ⁹⁵.

MIRS Y MOTILIDAD CELULAR

La motilidad celular es una de las condiciones necesarias para que una célula comience el proceso de metástasis, y como la mayoría de los procesos celulares, está regulada por miRs. En la bibliografía se encuentran mejor descritos los oncomiRs respecto a los miRs supresores tumorales, pero de todas formas ambos se hacen presentes. Se conoce que la familia miR-200 promueve la identidad epitelial por tener como genes blanco a ZEB1 y ZEB2, que reprimen la expresión de E-cadherina y otros genes relacionados con la polaridad celular. La pérdida de expresión de miR-200c es frecuentemente observada en células tumorales que han comenzado el proceso de EMT. La restauración de miR-200c en estas células conlleva a la reducción de características de CSCs, reducción en la migración e invasión y una mayor sensibilidad a taxanos. En este trabajo se identifican nuevos blancos de este miR como fibronectina 1 (FN1), moesina (MSN), receptor neurotrófico tirosín-quinasa tipo 2 (NTRK2 o TrkB), receptor de leptina (LEPR) y GTPasa activada por Rho 19 (ARHGAP19). Estas proteínas se encuentran normalmente expresadas en células mesenquimales o de origen neural. Se mostró que miR-200c mantiene el fenotipo epitelial regulando todos estos genes

además de los ya conocidos ZEB1/2, reprimiendo los programas celulares que contribuyen a la motilidad celular ⁹⁶.

En el cáncer de mama la expresión de miR-145 está regulada negativamente en comparación con tejido normal. Se demostró que la sobreexpresión de miR-145 en las líneas celulares MDA-MB-231, MCF-7, MDA-MB-468 y SK-BR-3, conduce a un descenso en la expresión de la proteína de adhesión JAM-A y de las proteínas de unión actina (ACTA1) y fascina (FASCN1). Por otra parte, los niveles de ARNm de podocalixina (PODXL) y serpinas fueron reprimidos, y gamma-actina (ACTG1), transgelina (TAGLN) y MYL9 incrementaron con la sobreexpresión de miR-145. Este patrón de expresión dependiente de miR-145 cambia drásticamente la disminución de la motilidad de las células cancerosas, según lo revelado por videos *time-lapse*, ensayos de herida-cicatrización y ensayos de invasión con Matrigel. Además, se demostró por microscopía de inmunofluorescencia la reestructuración del citoesqueleto de actina y cambios en la morfología celular por la sobreexpresión de miR-145, que se observa como una distribución de la actina más cortical y como una reducción de fibras de estrés así como también de la formación de filopodios ⁹⁷.

Siguiendo con los oncomiRs, se ha visto que miR-10b se expresa en gran medida en células de cáncer de mama metastásico y regula positivamente la migración celular y la invasión. La expresión de miR-10b es inducida por el factor de transcripción Twist, que se une directamente al promotor de mir-10b (MIRN10B). El miR-10b inducido por Twist procede a inhibir la traducción del ARNm que codifica HOXD10, dando como resultado una expresión incrementada de un gen pro-metastásico bien caracterizado, RHOC. Además, el nivel de expresión de miR-10b se correlaciona con la progresión clínica de la enfermedad. Este es un claro ejemplo de cómo los miRs pueden afectar en la progresión de la metástasis ⁹⁸.

En otro artículo, miR-9 ha sido reportado en cáncer metastático de cerebro y mama como favorecedor de la metástasis. En este trabajo se estudia su rol en cáncer colorrectal, y se encuentra que la expresión de miR-9 ectópica favorece la motilidad de una línea celular de cáncer colorrectal, RKO, así como también se observó un cambio en su morfología, mientras que la capacidad proliferativa permaneció intacta. Se encontró

que alfa-catenina estaba reprimida luego de la transfección con miR-9, indicando que este podría ser uno de sus blancos ⁹⁹.

ANTECEDENTES

El genoma humano, así como otros eucariotas, presenta ARNs no codificantes que son funcionales y que pueden agruparse bajo dos grandes categorías: los “ARN pequeños” que tienen un tamaño <40 nt de longitud, donde se incluyen los miRs así como también los piwiARN y los snoARN; y los “ARN largos no codificantes” >200 nt de longitud ¹⁰⁰. Dentro de esta última categoría encontramos a los ARNs de “bóveda”, mejor conocidos por su nombre en inglés vault RNAs. Esta clase de ARNs tienen un largo de 81-141 nt y son transcritos por la ARN polimerasa III. Dentro de la célula se asocian a junto con proteínas también llamadas “de bóveda” para dar lugar a la formación de la partícula de bóveda. Las funciones de este complejo relacionadas al cáncer aún no son delucidadas ¹⁰¹.

nc886, también conocido como vtRNA2-1 es un homólogo divergente de los 3 componentes integrales que forman a la partícula de bóveda (vtRNA1-1-3). A pesar de esto, su transcripción no se encuentra co-regulada ni asociada a la formación de esta partícula^{102,103}. Este ARN fue por mucho tiempo clasificado como precursor de microARNs (pre-miR-886), donde se encontraba anotado como “precursor de hsa-miR-886-3p”, hasta que se reconoció su homología de secuencia con los tres vtARN-1 ¹⁰³ y en la actualización 16 de miRBase se lo excluyó de esta categoría. De este modo, se lo reclasificó como vtARN2-1 y se eliminaron sus miRs derivados de miRBase. Sin embargo, vtRNA2-1/pre-miR-886, fue recientemente propuesto para integrar una nueva categoría de ARNs no codificantes (referido como "nc886"), que actúa como un supresor tumoral, inhibiendo la activación de PKR por interacción directa ^{104,105,106}.

Se ha mostrado que nc886 funciona como supresor tumoral regulado de forma epigenética en leucemia mieloide aguda, y que tratamientos de desmetilación inhiben la fosforilación de PKR. Además, en este trabajo también se detectan microARNs maduros derivados de nc886, que se procesaban a partir de pre-miR-886 por una vía no canónica, independiente de Drosha ¹⁰⁷. Además, otros grupos han identificado los microARNs derivados de pre-miR-886 en carcinoma de células pequeñas de pulmón¹⁰⁸

y de cáncer de próstata, presentando evidencia de su asociación con la progresión de la enfermedad ¹⁰⁹.

Además, distintos trabajos en cáncer de mama, pulmón, colon, vejiga, esófago y estómago muestran que el promotor de nc886 es metilado diferencialmente en tejido tumoral vs. normal ^{110,111}. De hecho, en el cáncer de pulmón, leucemia mieloide crónica y cáncer gástrico su metilación diferencial se correlaciona con el pronóstico del paciente y la supervivencia ^{107,108,112}. Aunque estos hallazgos apoyan el papel supresor tumoral para nc886, una comunicación reciente propuso su acción como oncogén en cáncer de tiroides ¹¹³.

Este año se publicó un artículo de nuestro grupo, donde se investigó la posible participación de nc886 en la etiología y el comportamiento del PCa ¹¹⁴. Se analizaron muestras clínicas, que mostraron que nc886 está presente en tejido normal de próstata, y que su abundancia disminuye en el tumor en comparación con los niveles normales, mostrando así un patrón de expresión génica de un gen supresor de tumores. También se aprecia que el aumento de la metilación del promotor de nc886 en tejido transformado frente a no transformado, así como también el uso de un agente desmetilante en líneas celulares, indican que la regulación molecular de nc886 consiste en la disminución de la metilación de su promotor. De hecho, el nivel de metilación del promotor nc886 se correlaciona con parámetros clínicos de PCa (Gleason Score, clínica Valor t y recaída bioquímica). Asimismo, la restitución forzada de nc886 en las líneas celulares DU145 y LNCaP produce una inhibición de la invasión y proliferación celular in vitro y una reducción del crecimiento del tumor DU145 in vivo. Estos resultados son consistentes con un papel supresor de tumores sugiriendo una función antiproliferativa.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

Demostrar mediante aproximaciones *in vitro* e *in silico* el rol antitumoral propuesto para nc886 y hsa-miR-886-3p y buscar posibles genes de inhibición directa relacionados con el proceso de metástasis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la acción de nc886 respecto a la migración celular
- Evaluar la acción de nc886 respecto a la invasión celular
- Estudiar genes blanco predictivos de hsa-miR-886-3p y su función en relación a la migración e invasión celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES

Las líneas celulares de cáncer de próstata seleccionadas para este trabajo son dos variantes de la Línea Celular LNCaP, las cuales llamaremos nc886 y Control.

La línea celular LNCaP (número de catálogo ATCC® CRL-1740™) corresponde a un cáncer de próstata humano, derivada de un carcinoma metastático del lado izquierdo, ubicado en el nodo linfático de la región supraclavicular. Estas células fueron extraídas en 1977 de un hombre caucásico de 50 años. Como características generales, son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos y presentan reactividad positiva tanto para receptor de andrógenos como de estrógenos, respondiendo a la 5-alfa-dihidrotestosterona que modula su crecimiento. Tienen una morfología epitelial, no producen una monocapa uniforme, y generalmente presentan un crecimiento lento en grupos (*clusters*). Se adhieren suavemente al sustrato y acidifican el medio rápidamente. El análisis citogenético evidencia la tetraploidía de esta línea, donde mayoritariamente las células presentan 84, 86 y 87 cromosomas.

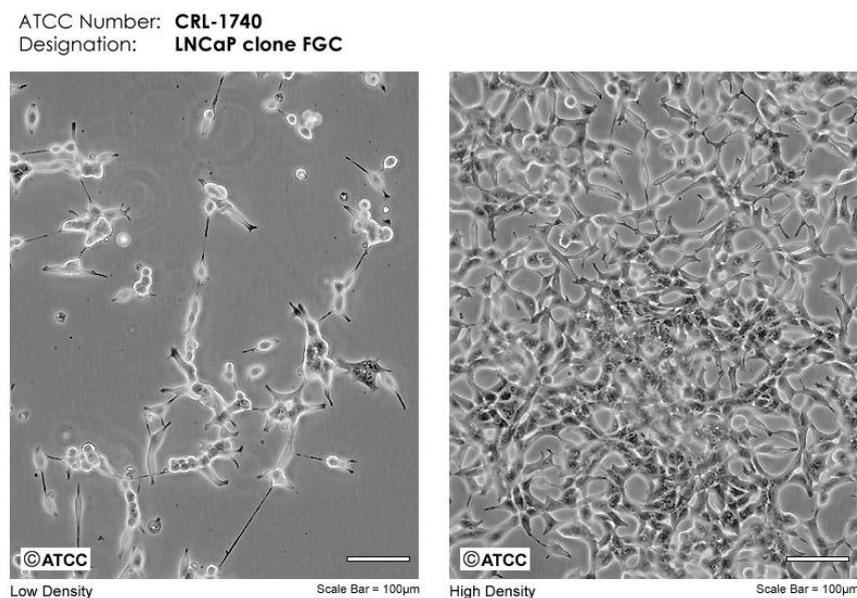


Figura 11. Microscopía óptica de células LNCaP a alta y baja confluencia. Extraída de ATCC (American Type Culture Collection).

Las líneas nc886 y Control fueron generadas en nuestro laboratorio por la Dra. Duhagon de modo que sobre-expresan establemente al nc886, con el vector que se muestra en la **Figura 12**. Este vector lentiviral obtenido de forma comercial en GeneCopoeia (esqueleto pEZX, N° catálogo HmiR0491-Mr02), está diseñado para la expresión de ARNs precursores de microARNs.

Los vectores de expresión basados en HIV son altamente eficientes en la transducción de genes en una gran variedad de células de mamífero, independientemente de su estado replicativo. Una vez que las células son infectadas con las partículas pseudovirales, el vector de expresión se integra al genoma de las células blanco y es expresado de manera estable.

El vector utilizado contiene como gen reportero a la proteína fluorescente roja mCherry, que es útil para el monitoreo de la transducción y el seguimiento de las células en diferentes aproximaciones experimentales, además de poder utilizarse como marcador cualitativo de la cantidad de expresión de dicho vector en cada célula (**Fig.13**).

Asimismo, este vector presenta un gen de resistencia al antibiótico Puromicina, que permite realizar la selección de específica de las células transfectantes para generar una línea que contenga al vector de forma estable. Se utiliza el promotor fuerte de citomegalovirus (CMV) que hace posible una expresión estable del gen deseado.

La diferencia entre el vector Control y el nc886 es que el primero consiste en la sustitución de la secuencia objeto de estudio por una secuencia al azar (*scramble*), que no se encuentra codificada en el genoma humano, pero que comparte el mismo contenido de GC y forma una estructura secundaria similar.

De esta manera, se obtuvieron las dos líneas celulares derivadas de LNCaP, una que sobre-expresa de manera constitutiva el pre-miR en estudio (LNCaP nc886), y otra línea que expresa un hairpin que funciona como control negativo (LNCaP control). La expresión del gen reportero mCherry a partir del vector lentiviral permite el monitoreo de los transfectantes por fluorescencia (Figura 13). Con este sistema de trabajo se pueden atribuir los cambios en el comportamiento entre dichas líneas exclusivamente a la presencia de nc886.

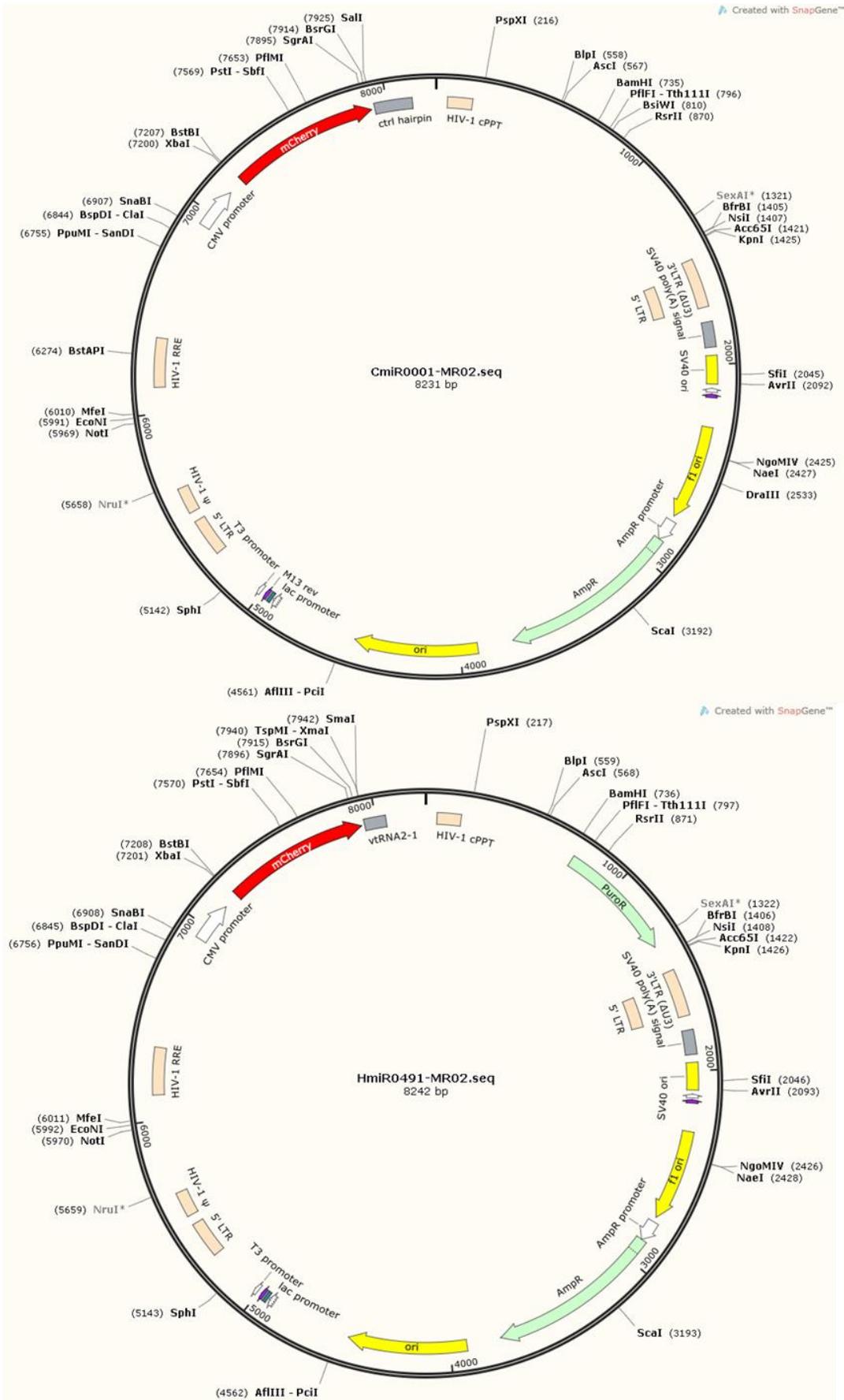


Figura 12. Esquema de los vectores lentivirales para la sobreexpresión de nc886 y el ARN control.

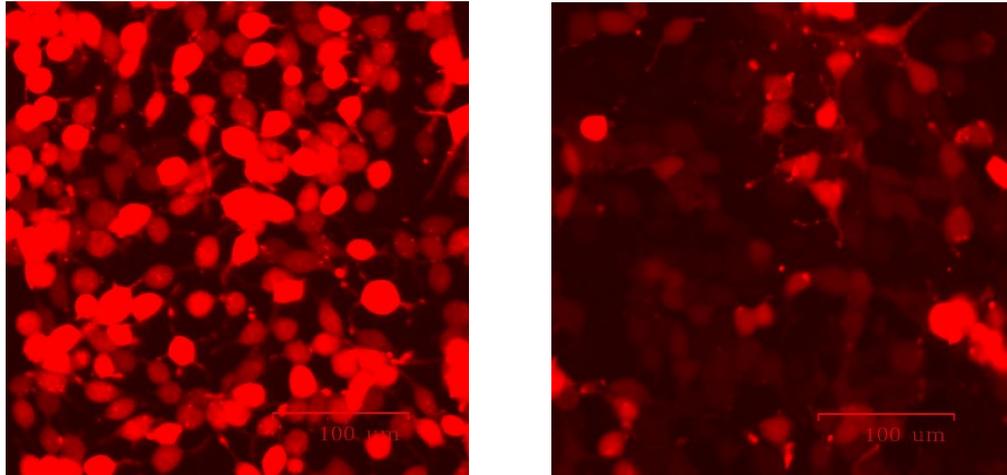


Figura 13. Imágenes de las las líneas LNCaP transfectadas establemente. Izquierda: LNCaP Control con Derecha: LNCaP nc886. Ambas líneas fueron seleccionadas con puromicina. Se observa la distribución de la proteína reportera mCherry en las células. Microscopía de epifluorescencia, aumento 20X.

<i>Gen</i>	<i>Secuencia</i>
nc886	CACUCCUACCCGGGUCGGAGUUAGCUCAAGCGGUUACCUCCUCAUGCCGGACUUU CUAUCUGUCCAUCUCUGUGCUGGGGUUCGAGACCCGCGGGUGCUUACUGACCCU UUUAUGCAAUAA
hsa-miR-886-3p	CGCGGGUGCUUACUGACCCUU
Control	GUCGAUAACGCAGAGACUCAACACCCUGUUUAUUGAUGCUGAUGAAUGACAGCUC GUAUUCAGUGACUGACUGGCCAGGUUCAUCUGCUGUAAUAACGCCCCGGACGCG GGAGUGGCCGAGGCGUUAGCAGAGAAUAACAGGCUACCUGUCACUAAUGACAUG GCAAACCAAAGUUGCCU

Tabla 1. Secuencia de los ARNs de trabajo

CULTIVOS CELULARES

DESCOMPLEMENTACIÓN DEL SUERO FETAL BOVINO

Con el objetivo de inactivar a los factores del complemento presentes en el suero fetal bovino (FBS), se incubó durante 30 minutos a 56°C. Una vez pasado este tiempo se enfrió en baño de hielo y se alicuotó en tubos falcon de 50 mL para almacenar en freezer de -20°C hasta el momento de su uso.

MEDIO DE CULTIVO

Se utilizó el medio de cultivo comercial Rosswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) de Capricorn (Cat No: RPMI-STA), que fue suplementado con 10% de FBS y 1% de Penicilina-Estreptomicina (100U/mL y 100 µL/mL, respectivamente). A este se llamó medio RPMI 1640 completo, se almacenó a 4°C una vez preparado. Los stocks de FBS y Penicilina-Estreptomicina se almacenaron a -20°C hasta el momento de preparación del medio completo.

DESCONGELADO DE CRIOVIALES

Las células se encontraban almacenadas en freezer a -140°C en crioviales de 1,4 mL con 5% DMSO y 20% FBS, con aproximadamente 1 millón de células que fueron congeladas cuando se encontraban en fase exponencial de crecimiento.

Para proceder a descongelarlas se las llevó rápidamente del freezer a un baño de agua a 37°C, una vez descongeladas se les añadió 8 mL de RPMI 1640 completo en un tubo falcon de 15 mL y fueron centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos a modo de diluir y quitar el DMSO de las células. Luego se quitó el sobrenadante con una bomba de vacío y se resuspendieron las células nuevamente en 2 mL de medio RPMI 1640 completo. Bajo estas condiciones las suspensiones de células fueron trasvasadas a frascos de cultivo estériles de 25 cm³ con 5 mL de medio RPMI 1640 completo en total. Los frascos

se almacenaron horizontalmente en incubadora a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de humedad.

MANTENIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Los cultivos fueron monitoreados de forma rutinaria bajo microscopio para constatar una confluencia y morfología adecuada de las células. El medio se cambió cada 2 o 3 días dependiendo de la confluencia celular y el pH del mismo. El RPMI 1640 tiene como marcador colorimétrico de pH al Rojo Fenol, que pasa de un color rojo-rosado pH 7,4 a uno naranja-amarillo a pH 6,5.

PROPAGACIÓN

Cuando los cultivos alcanzaron el 80% de confluencia aproximadamente, se realizaron sub-cultivos para mantenerlos en crecimiento. Con este fin, se aspiró el medio de cultivo con una bomba de vacío y se realizó un lavado con 3 mL de PBS a 37 °C para un frasco de 25 cm², para remover las trazas de suero que pudieran bajar el rendimiento de la tripsina, y luego se aspiró con la bomba de vacío. A continuación, se agregó 0,6 mL de tripsina 0,25 (w/v) y EDTA 0,53 mM y se incubó 5 minutos a 37 °C. Una vez transcurrido este tiempo se observaron las células bajo el microscopio para constatar su desprendimiento y se procedió a agregar 2 mL de medio RPMI 1640 completo para inactivar la tripsina. Luego se centrifugó la suspensión para quitar toda la tripsina y se resuspendió en 1mL de medio RPMI completo, tomando la alícuota deseada para su subcultivo y se sembró en un nuevo frasco de 25 cm² con 5mL de RPMI 1640.

CONGELADO DE CÉLULAS

Con el fin de generar un stock de células para los próximos ensayos, se congelaron células en fase exponencial de crecimiento luego del primer pasaje, cuando el cultivo se encuentra en 80% de confluencia. Para ello, se disgregaron las células del cultivo por tratamiento con tripsina de la misma manera que si se fuera a realizar un

subcultivo, luego se tomó una alícuota que contenga de 1 a 2 millones de células y se resuspendió en medio de congelamiento, de modo tal que cada criovial resulte con un volumen final de 1,4 mL aproximadamente, conteniendo 20% de FBS, es decir un 10% extra, y 5% de DMSO. El di-metil-sulfóxido es utilizado como agente crioprotector. A continuación, los crioviales se colocan en un contenedor de congelamiento con alcohol isopropílico, que permite la disminución gradual y controlada de la temperatura (1°C/min) y se almacena en freezer a -80°C.

RECUENTO EN CÁMARA DE NEUBAUER

La cámara de Neubauer consiste en una cuadrícula conformada por 9 cuadrados grandes que contienen cada uno, un volumen de 0,1 µL. De esta manera permite realizar el recuento de células. Para reducir el error del recuento se deben contar tantos cuadrados como sean necesarios para acumular un mínimo de 100 células. Finalmente teniendo en cuenta las diluciones realizadas se obtiene el número de células por mL presentes en la suspensión.

CUANTIFICACIÓN DE NC886 Y HSA-MIR-886-3P

EXTRACCIÓN DE ARN

Se realizó la extracción de ARN de cultivos celulares, de las líneas control y sobre-expresante a partir de 1×10^6 células con el kit miRNAeasy (Qiagen, N° catálogo 217004) con el fin de cuantificar el nivel de sobreexpresión de la línea nc886, siguiendo las recomendaciones del kit.

SÍNTESIS DE CDNA Y PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL (QPCR)

Para hacer la retrotranscripción se utilizó miScript II RT Kit (Qiagen, N° catálogo 218161), que si bien extrae ARN total es utilizado para enriquecer las muestras en ARNs pequeños. Esta opción se logra cuando es usado el buffer HiFlex, que permite la

adecuada síntesis a partir de miRNAs maduros, precursores de miRNAs, mRNAs y otros RNAs no codificantes.

Se siguieron todas las instrucciones indicadas en el kit, y el producto se almacenó a -20°C por una semana hasta su cuantificación por PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR).

Tanto el ADNc precursor nc886 como el de hsa-miR-886-3p fueron cuantificados por qPCR. Se utilizó el mismo kit que para la retrotranscripción, que utiliza un *primer* universal y un *primer* específico para cada una de las muestras. La cuantificación fue realizada utilizando SYBR Green, utilizando el SensiFast SYBR Hi-Rox Kit (Bioline, N° catálogo BIO-92005). Como genes normalizadores se utilizaron U6 y snord-13, y se hicieron triplicados de cada muestra y se utilizó agua como control negativo.

Las lecturas fueron obtenidas en el equipo StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Thermo Fisher) y el método de cuantificación fue obtenido por el cálculo de delta delta Ct¹¹⁵.

Gen	Primers
nc886	5'CGGGTCGGAGTTAGCTCAAGCGG3' sentido 5'AAGGGTCAGTAAGCACCCGCG3' antisentido
hsa-miR-886-3p	MS00010675, Qiagen
snord13	MS00014056, Qiagen
U6	MS00033740, Qiagen

ENSAYO DE MIGRACIÓN

Para evaluar la capacidad migratoria de ambas líneas celulares se realizaron ensayos de *wound healing*. Esta técnica consiste en realizar una “herida” *in vitro* con una punta de 200 μ l en un cultivo en monocapa confluyente, tomando fotos de este a diferentes intervalos de tiempo y comparándolas para cuantificar la migración celular (**Fig.14**).

Una de las ventajas de este método es la similitud con la migración que presentan las células *in vivo*, donde pueden observarse los diferentes patrones de migración, como la unión intercelular de un grupo migrante moviéndose como lámina con células líder o el desplazamiento independiente de cada una de ellas.

Además, es un método simple y cuantificable de estudio para la migración celular *in vitro* y solo utiliza reactivos estándares de laboratorios que trabajan con cultivos celulares.

En este caso, las capas presentaron una confluencia de 100% con una densidad de 1.200.000 células/mL, y las fotografías fueron tomadas a las 0hs, 8 hs y 24 hs. Se realizaron triplicados técnicos y triplicados biológicos. Las imágenes fueron tomadas con el microscopio digital ZOE a una magnificación de 20 X.

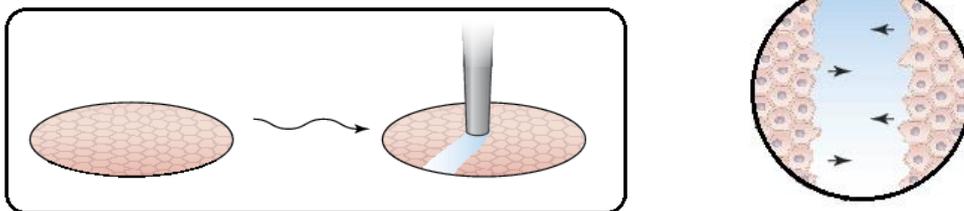


Figura 14. Esquema representativo de ensayo de migración. A la izquierda, procedimiento para realizar la herida. Se crece el cultivo hasta que alcanza una gran confluencia y con una punta descartable de micropipeta (*tip*) se abre una herida que es tomada como tiempo de inicio del ensayo. A la derecha, se espera ver al microscopio un espacio libre (herida) y células a ambos lados que migran para ocuparlo.

La cuantificación de la reducción en la herida se realizó con el programa Fiji ¹¹⁶ utilizando un plugin llamado MRI Wound Healing Tool, que permite el reconocimiento de los bordes de la herida y calcula el área de la misma.

La migración de las células se expresó como la reducción total en el área de la herida a las 24 hs, tomando el tiempo 0 hs como referencia.

Tras la evaluación de varios parámetros que influyen en este ensayo, se puso a punto el ensayo con las siguientes condiciones:

Día 1

Sembrado de placa de cultivo celular de 12 pocillos con una densidad de 300.000 células en 1 mL de medio RPMI completo.

Día 2

Se realizan 2 heridas por pocillo con una punta “tip” para pipeta de 200 µL. Se aspira el medio muy suavemente con pipeta P1000 y se reemplaza por medio RPMI sin complementar. Se toman 3 fotos por cada herida y se guardan como “tiempo 0 horas”.

Transcurridas las 8 horas de realizada la herida se vuelven a tomar fotos de los mismos lugares y se guardan como “tiempo 8 horas”.

Día 3

Se toman fotos de los mismos lugares de t 0hs y t 8hs y se las guarda como “tiempo 24 horas”.

ENSAYO DE INVASIÓN

Para determinar la capacidad invasiva de las líneas LNCaP-Control y LNCaP-nc886 se realizaron ensayos clásicos de invasión. Estos consisten en cultivar células en una placa con *transwells* de fondo poroso cubiertos con una capa proteica y sobre ella se siembran células, se espera un intervalo de tiempo determinado y se cuantifica la cantidad de células que lo atraviesan, producto de ser atraídas por un quimioatrayente que sólo está presente del lado de abajo del *transwell* (Fig.15).

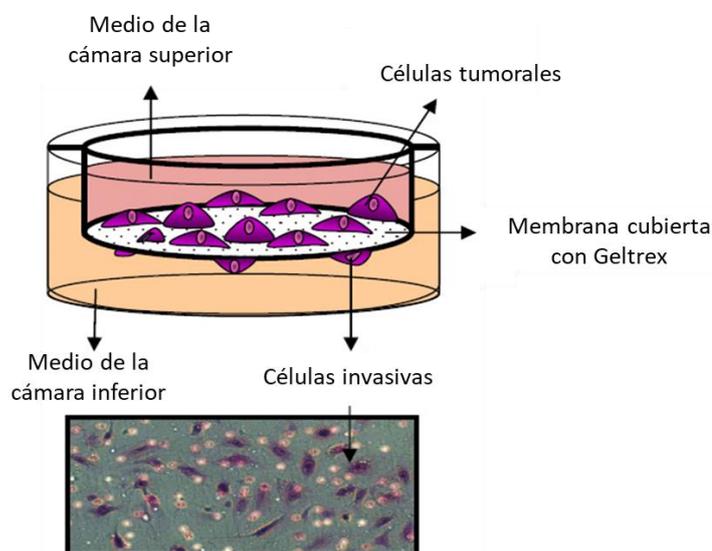


Figura 15. Esquema representativo de un ensayo de invasión. Las células sembradas (en violeta) en la parte de arriba del *transwell* no contienen FBS (medio rosado), atraviesan la matriz proteica y pasan por los poros de 8 μm hacia el lado de abajo, que sí contiene FBS (medio amarillo). Abajo, imagen esperada de células invasivas fijadas y teñidas.

Este ensayo se diferencia del de migración en la presencia de una capa proteica, que debe ser digerida por proteasas liberadas por células con capacidad invasiva, que permitan a las mismas atravesar la membrana porosa de policarbonato del *transwell*. El FBS que se encuentra del lado de abajo genera un gradiente que atrae a las células invasivas ubicadas arriba. De esta manera obtenemos un modelo *in vitro* del proceso que sucede cuando un grupo de células pertenecientes a un tumor primario abandonan este lugar para entrar a los vasos sanguíneos e invadir otros tejidos, y así formar nuevos tumores.

En este caso, fueron utilizados *transwell* de la marca Nunc con membrana de policarbonato y poros de 8 μM (N° catálogo 140629) cubiertos con una capa de matriz extracelular (Geltrex, Life Technologies N° catálogo A1413302) con una dilución del $1/75$ y FBS con una dilución del 10% en RPMI 1640. Transcurridas las 24 horas los *transwell* fueron fijados con MetOH 100% por 15 minutos y teñidos con hematoxilina/eosina. Se realizaron triplicados biológicos, cada uno con duplicados técnicos, se sacaron 5 fotos por *transwell* que fueron cuantificadas con el programa Fiji.

Se puso a punto el ensayo al evaluar las condiciones de trabajo, de forma que se favorezca la reproducibilidad del mismo. A continuación, se detalla el protocolo utilizado:

Primera parte: Preparación de insertos *transwell* con Geltrex

Colocar tips y eppendorf que se utilizaran para hacer la dilución de Geltrex en la heladera, el material debe estar frío para evitar la gelificación al pipetear o diluir. Colocar en la placa los *transwell* que serán recubiertos con Geltrex.

Preparar la dilución del gel en medio RPMI sin suero ni ningún agregado en hielo. En este caso dilución $1/75$. Sembrar 100 μL de la dilución del Geltrex a cada *transwell*, sin generar burbujas.

Colocar la placa a 37°C durante 2 hs para permitir la gelificación de Geltrex.

Segunda parte: Sembrado de células

Disgregar las células por tratamiento con tripsina como se detalla en Materiales y Métodos. Resuspender las células en 5 mL de PBS y centrifugar a 450 g durante 5 minutos a temperatura ambiente a modo de lavado. Resuspender en 2 mL de medio RPMI sin aditivos.

Realizar la dilución correspondiente para obtener 20.000 células en 250 μL de RPMI sin aditivos por *transwell* y sembrar las células lentamente.

En el pocillo colocar el quimioatrayente: 750 μL de RPMI + 10% FBS.

Sacar fotos de todos los pocillos en este tiempo (T = 0 hs).

Tercera parte: Revelado

Transcurridas las 24 horas del ensayo se sacan fotos del fondo de la placa y de la membrana porosa del *transwell*, asegurándose de que ninguna célula invasiva se haya depositado en el fondo de la placa.

Pasar los insertos a una nueva placa de 24 wells y volcar el medio en un vaso de descarte. Colocar 750 μ L de metanol 100% (frio, colocado en el freezer algunos minutos antes) e incubar durante 15 minutos.

Realizar dos lavados en PBS por inmersión en vasos de bohemia conteniendo un volumen apropiado (se utilizan dos vasos, uno para cada lavado).

Colocar en placa de 24 wells con hematoxilina arriba y abajo del *transwell* para que cubra (300 μ l arriba y 300 μ l abajo) e incubar 2 minutos.

Realizar un lavado por inmersión en un vaso de bohemia con agua de la canilla.

Colocar en placa de 24 wells con eosina arriba y abajo del *transwell* para que cubra (300 μ l arriba y 300 μ l abajo) y se incubara 1 minuto.

Realizar un lavado por inmersión con H₂O milli Q.

Dejar secar a temperatura ambiente y obtener imágenes de 5 campos diferentes representativos del *transwell*.

ANÁLISIS DE MICROARREGLOS AFFYMETRIX

Los chips Affymetrix fueron utilizados para medir la expresión de mRNA de un gran número de genes simultáneamente, de la línea Control y nc886. Estos experimentos fueron realizados por la Dra. Duhagon y en este trabajo se utilizaron sus resultados para realizar aproximaciones bioinformáticas de expresión diferencial entre ambas líneas.

La expresión diferencial se enunció en términos de cambio relativo (FC) y se analizó con diferentes programas online.

En primer lugar, se realizaron análisis de vías y de ontología con el programa GenClip2.0 ¹¹⁷. Este abordaje resulta útil para experimentos de alta procesividad; nos brinda información sobre las redes moleculares que se están viendo afectadas en determinadas circunstancias y permite observar listas de genes que se encuentran relacionados a ciertas funciones, términos o patologías.

Para poder cumplir con todas estas funciones, GenClip2.0 se sustenta en una variedad de bases de datos, así como también es capaz de buscar términos libres en la literatura. La entrada con la cual este programa trabaja es una lista de identidad (ID) de genes, que se obtienen seleccionando un grupo de interés, resultado de la expresión diferencial de los microarreglos. En este trabajo se seleccionaron diferentes grupos de genes que fueron analizados por ontología y vías.

También fue utilizado el programa miRmap ¹¹⁸, que es capaz de predecir lugares de unión entre un UTR correspondiente a un mRNA y un miRNA. Para lograrlo, este algoritmo se basa en características termodinámicas, evolutivas, probabilísticas y de secuencia. Con este programa online se obtuvieron los posibles blancos de hsa-miR-886-3p, la cantidad de veces que se une a un mismo 3'UTR, así como también la cercanía al codón de terminación del mensajero. En este programa se utilizó la opción de escribir la secuencia del miRNA, ya que, como se explica en la sección de antecedentes, no está ingresado en la base de datos.

Otro de los softwares utilizados fue VarElect de Genecards ¹¹⁹, en donde nuevamente la entrada es una lista de ID de genes, pero también se le suma la opción de escribir diferentes términos con los que se especula que la lista puede estar relacionada. La salida es la misma lista de entrada, pero ordenada con un puntaje dado por VarElect, que muestra el nivel de relación que tienen dichos genes con los términos propuestos. Los algoritmos utilizados en esta plataforma emplean asociaciones entre genes y enfermedades/fenotipos basados en vías compartidas, redes de interacción, relaciones de paralogía y publicaciones mutuas. Junto con el puntaje dado también se encuentran las publicaciones en las cuales se basa el software para dar este resultado, que simplifica en gran medida la búsqueda bibliográfica de trabajos donde se demuestre esta relación. VarElect se utilizó para buscar trabajos donde estuviera experimentalmente probado el

cambio en la invasión de células de cáncer de próstata cuando se disminuía la expresión de genes blanco de hsa-miR-886-3p.

También se utilizó el programa Venny ¹²⁰ donde se realizó un diagrama de Venn que permitió la formación de un grupo de genes que mostraron un descenso en su expresión en el microarreglo y que además presentaron sitios de unión para hsa-miR-886-3p.

Finalmente se utilizó la plataforma The Cancer Genome Atlas (TCGA)¹²¹, utilizando específicamente los datos de PRAD (Adenocarcinoma de Próstata) con el objetivo de extraer datos clínicamente relevantes de la expresión de diferentes genes en PCa. Esta base de datos recolectó y caracterizó muestras tumorales de alta calidad y muestras normales de más de 11,000 pacientes. Los datos disponibles cuentan con información clínica sobre los participantes, metadatos sobre las muestras (por ejemplo, el peso de una porción de muestra), imágenes de histopatología de la muestra e información molecular derivada de las muestras (por ejemplo, expresión de ARNm/miARN, expresión de proteínas, número de copias, etc.)

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

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

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CUANTIFICACIÓN DE NC886 Y HSA-MIR-886-3P

Con el fin de verificar la sobreexpresión de nc886 y hsa-miR-886-3p en la línea celular LNCaP-nc886 respecto a LNCaP-Control, se evaluaron los niveles de expresión de nc886 y hsa-miR-886-3p mediante RT-qPCRs utilizando *primers* específicos. Producto de dicho análisis, se observó la sobreexpresión de nc886 y hsa-miR-886-3p en la línea LNCaP-nc886 respecto a LNCaP-Control, mostrando un incremento de 691 veces para hsa-miR-886-3p y de 230 veces para nc886. Se destaca la gran diferencia que existe entre el cambio evidenciado para el precursor (nc886) y su producto final (hsa-miR-886-3p). Esto puede deberse a que la línea LNCaP control posee una menor expresión basal del microARN respecto al precursor (nc886), por lo que los cambios provocados al sobreexpresar el precursor son mucho más pronunciados para el microARN.

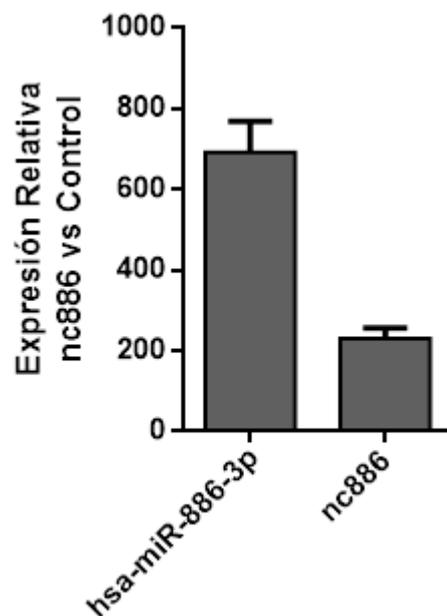


Figura 16. Cuantificación de nc886 y hsa-miR-886-3p mediante RT-qPCR. Expresión relativa de nc886 y hsa-miR-886-3p en la línea celular LNCaP-nc886 respecto a la línea celular LNCaP-Control. Para la cuantificación por RT-qPCR de los ARNs no codificantes se utilizaron cebadores específicos, en todos los casos se utilizó a RNAU6 y snord13 como ARNs endógenos para normalizar la cantidad de ARN de las reacciones.

ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR – “WOUND HEALING ASSAY”

PUESTA A PUNTO

Para este tipo de aproximación, donde existen múltiples variables que pueden afectar la reproducibilidad del ensayo, es necesario realizar diferentes pruebas con el fin de determinar las condiciones ideales que minimizan la variabilidad entre réplicas, para finalmente ejecutar los ensayos concluyentes.

Entre las variables evaluadas se destacan: línea celular, la confluencia celular al momento de realizar la herida, el tiempo para la toma de fotografías, el ancho de la herida, la realización de la herida en seco, en medio de cultivo completo o en PBS 1X, el porcentaje de FBS en el medio durante el ensayo, y la realización de lavados posteriores a la formación de la herida.

Un aspecto muy importante en este tipo de ensayo es evitar la contribución de la replicación celular en el cerrado de la herida, lo que conduciría a interpretaciones erradas en el comportamiento migratorio, ya que ambos fenómenos pueden contribuir a cubrir el espacio libre la herida. Es sustancial que el medio de cultivo suministre la menor cantidad posible de aditivos, de FBS o de otro tipo, para disminuir las señales de replicación que puedan tener las células y así mantener al mínimo el efecto de la proliferación en el fenómeno de cerrado de la herida durante el tiempo que requiera el ensayo, que en este caso fueron 24 horas. Para disminuir el aporte de la proliferación, no se complementa con FBS el medio RPMI 1640.

Otro aspecto importante es la realización de un lavado de PBS 1X luego de realizar la herida, para remover las células flotantes que pueden formarse con la realización de la herida y remanentes de FBS. En este caso, se evaluaron los perjuicios y beneficios que tiene este lavado, y se optó por no hacerlo. La línea celular LNCaP presenta baja adhesión al sustrato, y muchas veces la monocapa se despegaba al realizar este lavado. No se observó un cambio sustancial en la replicación de las células durante el tiempo del ensayo. Asimismo, no se analizaron imágenes en las que existieran deposición de células en la herida producto de la adhesión de células flotantes.

Adicionalmente, se valoró la influencia del ancho inicial de la herida. Se observó que, si se realiza una herida de ancho mayor a los 600 μm , las células migraban menos que cuando se hacía una herida más angosta, menor a los 400 μm . Esto podría explicarse producto de que los frentes de las células que se encuentran demasiado lejos no son capaces de enviarse suficientes señales para una incentivar una migración adecuada¹²². Con el fin de estandarizar el ancho de las heridas a estudiar se optó por seleccionar solamente las heridas con un ancho inicial intermedio, en el rango de los 400 y 550 μm .

Por último, se testearon diferentes medios al momento de realizar la herida. El medio RPMI completo con el cual se sembró la monocapa, PBS 1X, RPMI sin complementar y directamente en seco. Tanto en PBS 1X como en seco resultaron ser tratamientos muy agresivos para las células, que provocaron que muchas de ellas se desprendieran del sustrato. Entre los medios RPMI con o sin aditivos no se vio diferencia, por lo tanto, se optó por realizar la herida con el medio complementado para evitar el agregado de pasos de manipulación al cultivo.

Luego de realizar múltiples ensayos alterando las variables antes mencionadas se seleccionaron las siguientes condiciones de trabajo:

<i>Condición evaluada</i>	<i>Parámetro seleccionado</i>
Confluencia en t= 0 hs	1.200.000 células en 1mL en placa de 12 pocillos
Ancho de la herida en t=0 hs	Entre 450 y 550 μm
Medio en el cual se realiza la herida	RPMI sin complementar
Porcentaje de FBS del medio	Sin FBS
Lavados luego de la herida	No

Tabla 2. Parámetros utilizados para los ensayos de migración.

Las imágenes obtenidas al realizar este ensayo se ven como se muestra a continuación en la **Figura 17**.

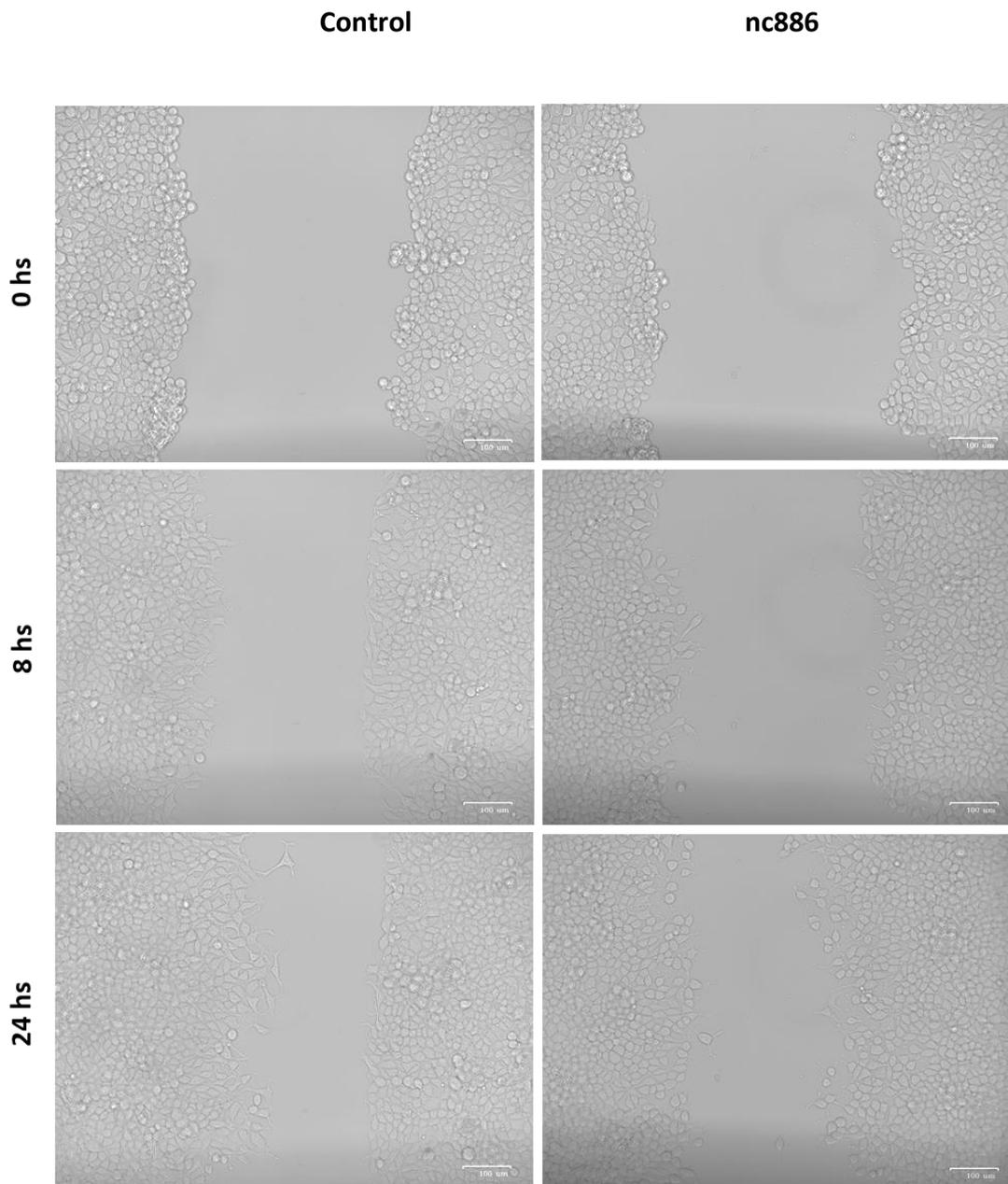


Figura 17. Imágenes representativas del ensayo de Herida-Cicatrización con la línea celular LNCaP nc886 y LNCaP-Control. Pueden observarse imágenes sin procesar realizadas con un microscopio invertido en contraste de fases en las diferentes horas del ensayo para las dos líneas celulares transfectadas en estudio (LNCaP nc886 y LNCaP control). Magnificación 20X.

Al finalizar el ensayo se procesaron todas las imágenes con el programa Fiji utilizando el módulo para análisis de ensayos de herida cicatrización (plugin: Wound Healing Tool). Este módulo permite el reconocimiento de los bordes de la monocapa y realiza el cálculo del área carente de células. Con esta cuantificación, se calculó el

porcentaje de reducción del área de las líneas celulares nc886 y control en los diferentes tiempos respecto al tiempo inicial 0 horas (**Fig.18**).

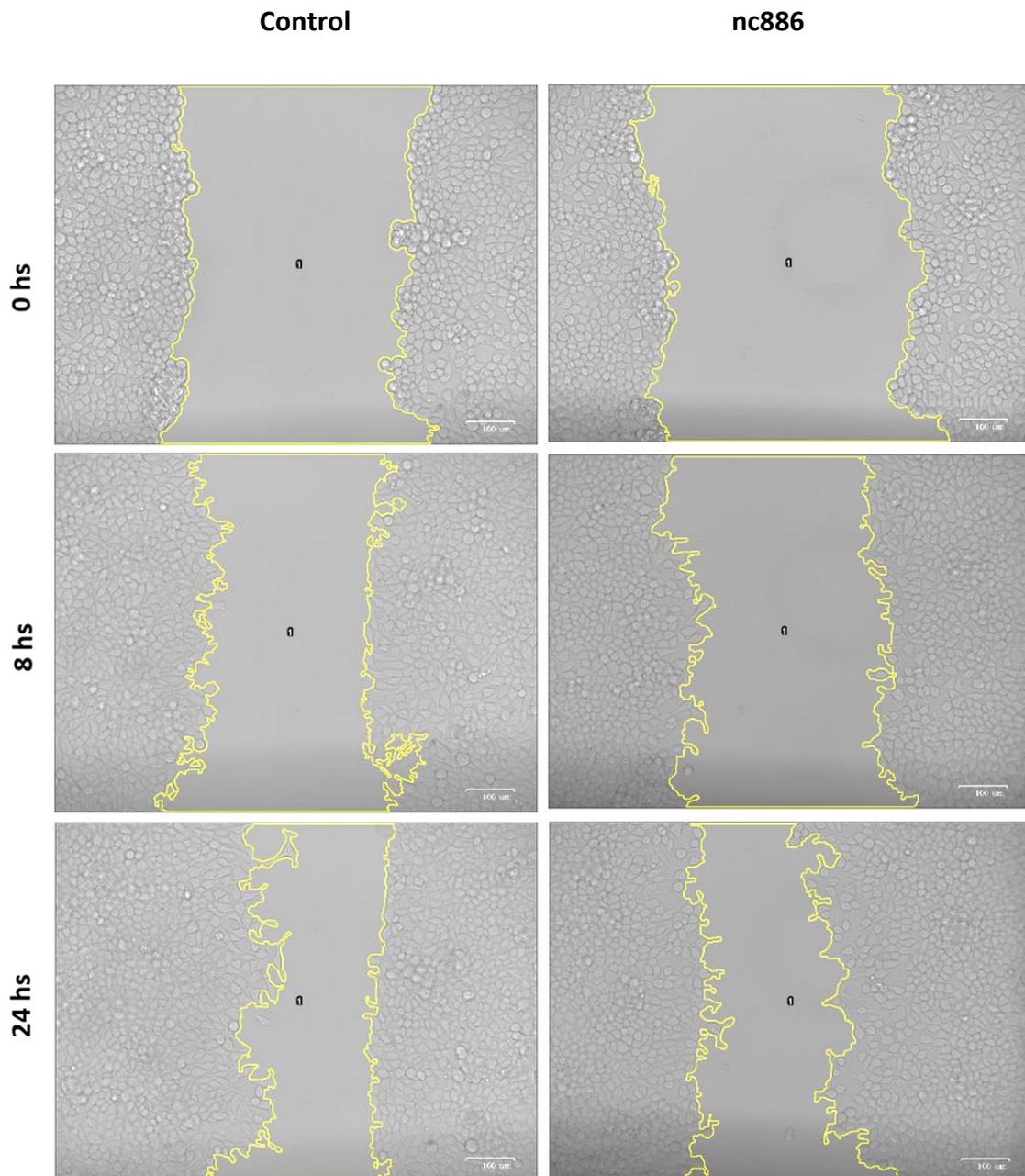


Figura 18. Imágenes representativas del ensayo de Herida-Cicatrización con la línea celular LNCaP-nc886 y LNCaP-control analizadas con el programa Fiji. Se observa marcado como una línea amarilla como son reconocidos los bordes de la monocapa, encerrando un área que se denomina “1” a la que se le calcula el tamaño de área. Magnificación20X.

Para evaluar el efecto de nc886 en la migración celular, se calculó la reducción del área de cada herida, utilizando como punto de partida la imagen de *Tiempo 0 hs*.

Para cada sitio fotografiado se obtuvo un valor de reducción del área; luego las réplicas para cada tiempo y línea celular fueron promediadas y el valor final se expresa como el promedio de porcentaje de área libre con su respectivo error estándar a los diferentes tiempos establecidos.

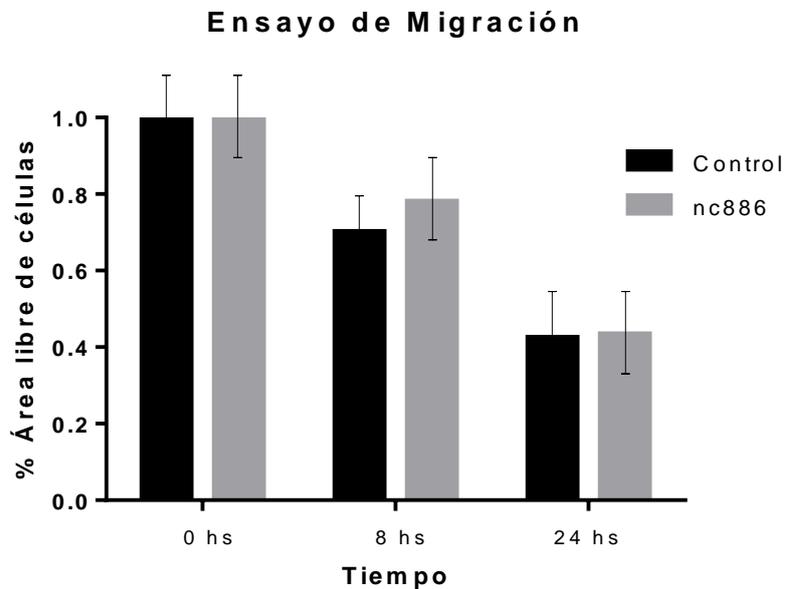


Figura 19. Evaluación de la reducción del área libre de células en los ensayos de migración. Se observa el valor promedio de porcentaje de área libre de células respecto al tiempo 0 horas para cada tiempo establecido para las dos condiciones en estudio. En gris oscuro se muestra el porcentaje de área libre células de la línea celular LNCaP control y en gris claro la correspondiente a la línea celular LNCaP nc886. A tiempo 0 horas las dos barras representan el 100% del área libre células que va disminuyendo a medida que las células migran.

Se puede ver en la **Figura 19** que las dos líneas celulares LNCaP-nc886 y LNCaP-Control no presentan diferencias en el área de cerrado de la herida en los tiempos analizados. Sin embargo, se puede observar una pequeña tendencia en la línea control a migrar un poco más rápido, pero esta pequeña diferencia no es estadísticamente significativa. En resumen, podemos concluir que la sobreexpresión de nc886/hsa-miR-886-3p no parece afectar los procesos de migración celular en la línea LNCaP en las condiciones ensayadas. En búsqueda de otras etapas de la metástasis en donde este ARNnc pueda estar haciendo efecto, se prosigue con el desarrollo de los ensayos de invasión con Geltrex.

ENSAYO DE INVASIÓN

PUESTA A PUNTO

Al igual que en los ensayos de migración, para llevar a cabo el estudio del fenotipo invasivo de la línea nc886 también fue necesaria una puesta a punto previa de los ensayos de invasión en Geltrex. Este tipo de ensayo es muy reproducible si se realiza correctamente, por lo que se procedió a buscar las condiciones ideales con experimentos preliminares antes de su ejecución definitiva.

Anteriormente en nuestro laboratorio fueron realizados ensayos de invasión, utilizando *transwell* comerciales ya cubiertos con Matrigel. En nuestro caso, partimos de los *transwell* sin matriz y los recubrimos con Geltrex. Este factor es relevante ya que estamos cubriendo los insertos manualmente, y es de suma importancia lograr una distribución homogénea de la matriz en el pocillo en cada *transwell*, con el fin de no generar variabilidad entre diferentes pocillos. En este trabajo, luego de probar diferentes condiciones, se llegó al protocolo detallado en la sección de Materiales y Métodos.

Para la cuantificación de las células invasivas (aquellas que lograron atravesar la matriz de Geltrex) en las imágenes tomadas con el microscopio se utilizó el módulo de contador automático del programa Fiji. Para ello se puso a punto variando los parámetros para la correcta detección de las células en las imágenes contrastándolas con el conteo a mano.

Como se puede percibir al observar la **Figura 20**, los resultados muestran un cambio drástico en la invasión de la línea LNCaP-nc886. Puntualmente, se aprecia una disminución del 77% de células invasivas respecto a la línea LNCaP-Control, y este fenotipo muestra ser independiente del número inicial de células sembradas en los *transwell* (resultados no mostrados).

Teniendo en cuenta en conjunto los resultados de los ensayos de migración e invasión, podemos inferir que la sobreexpresión de nc886 afecta a procesos celulares relacionados específicamente con la invasión de la matriz, mientras que no observamos cambios en la migración celular en las condiciones analizadas. Estas características

adquiridas, pueden deberse tanto a la acción directa del RNA no codificante nc886 y/o a la de sus productos microARN 3p y/o 5p. Para abordar esta interrogante a continuación se presenta un breve análisis bioinformático que busca contestar de alguna manera las preguntas que surgen luego de ver este fenotipo.

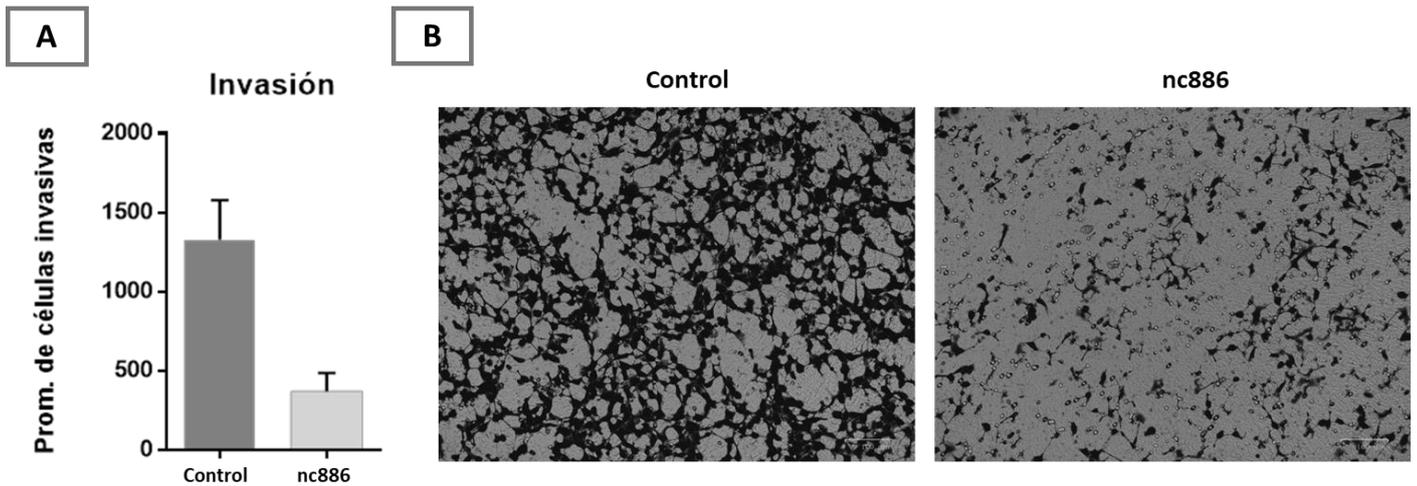


Figura 20. Evaluación de la capacidad invasiva en ensayo de transwell de línea celular LNCaP-Control y LNCaP-nc886. A, Se observa el número de células que atravesaron la membrana y matriz Geltrex (células invasivas) a las 24 horas de sembrados las células para cada condición evaluada. En gris oscuro se presenta la línea celular control y en gris claro la línea celular nc886. Se gráfica el promedio de células invasivas por *transwell* con su respectivo desvío estándar. B, Imágenes representativas del fondo externo del *transwell*. Pueden apreciarse las células invasivas que fueron capaces de atravesar el *transwell*. Tinción con hematoxilina-eosina. Microscopía óptica campo claro 20X.

ANÁLISIS IN SILICO DE LOS POSIBLES BLANCOS MOLECULARES DE HSA-MIR-886-3P.

En esta sección se muestra el abordaje *in silico* realizado con el fin de encontrar genes responsables del cambio en la invasión expuesta por los ensayos anteriores. Para ello utilizamos datos expresión de microarreglos de ARNm de la plataforma Affymetrix, realizados previamente para la línea celular LNCaP-nc886 y Control. Primeramente, buscamos aquellos genes candidatos a ser directamente reprimidos por hsa-miR-886-

3p. Si bien es cierto que este tipo de aproximaciones permite el estudio solamente de los procesos que se afectan a nivel de cantidad de ARNm y no de proteína funcional, ya se ha demostrado que la represión mediada por microARNs conduce a una desestabilización del ARN mensajero además de una represión traduccional ¹²³. Este abordaje permite un primer acercamiento a los procesos que podría estar afectando este microARN, que luego deberán ser corroborados con ensayos específicos para cada gen para demostrar la represión directa del microARN sobre dicho gen. De este modo, se trata de una buena aproximación global para explorar las vías que pueden ser afectadas por el microARN a la hora de evaluar su funcionalidad.

Partimos de la lista de expresión normalizada transformada a logaritmo en base 2 de los genes seleccionados por el microarreglo para la línea celular LNCaP-nc886 y control. En esta lista se mostraban todos los genes evaluados por el chip en orden descendente en cuanto a cambio de expresión de la línea nc886 respecto de la línea control. Con estos datos nos fue posible dividir la lista de partida en tres grandes zonas: los genes que disminuyen con la sobreexpresión de nc886 (97), los genes que no se ven afectados ante la modulación por este ARN, y aquellos genes que aumentan sus niveles frente a su sobreexpresión (113). Estas tres zonas fueron definidas estableciendo umbrales de acuerdo con el cambio relativo de $\log_2 FC = 0,58$ (cambio relativo lineal de 1,5) de expresión de los ARNm en una condición respecto a la otra. Este criterio de selección nos pareció un buen comienzo para ir en la búsqueda de genes candidatos que puedan explicar la alteración observada en la invasión celular.

Claramente de las tres subdivisiones realizadas, la más interesante para este trabajo es la de genes que bajan sus niveles frente a la sobreexpresión de nc886, ya que contiene a los principales genes potencialmente reprimidos en la célula por ser blancos directos de hsa-miR-886-3p, y que podrían ser responsables en la modulación de la invasión.

Para determinar si existe un enriquecimiento de los genes seleccionados en términos de ontología (GO), y de vías y procesos celulares se evaluó dicha lista en el programa GenClip2.0 ¹¹⁷. La lista de genes que **disminuyen** su expresión cuando se

sobreexpresa nc886 consta de 97 genes y los resultados del análisis realizado en GenClip2.0 muestran a continuación en la **Figura 21**.

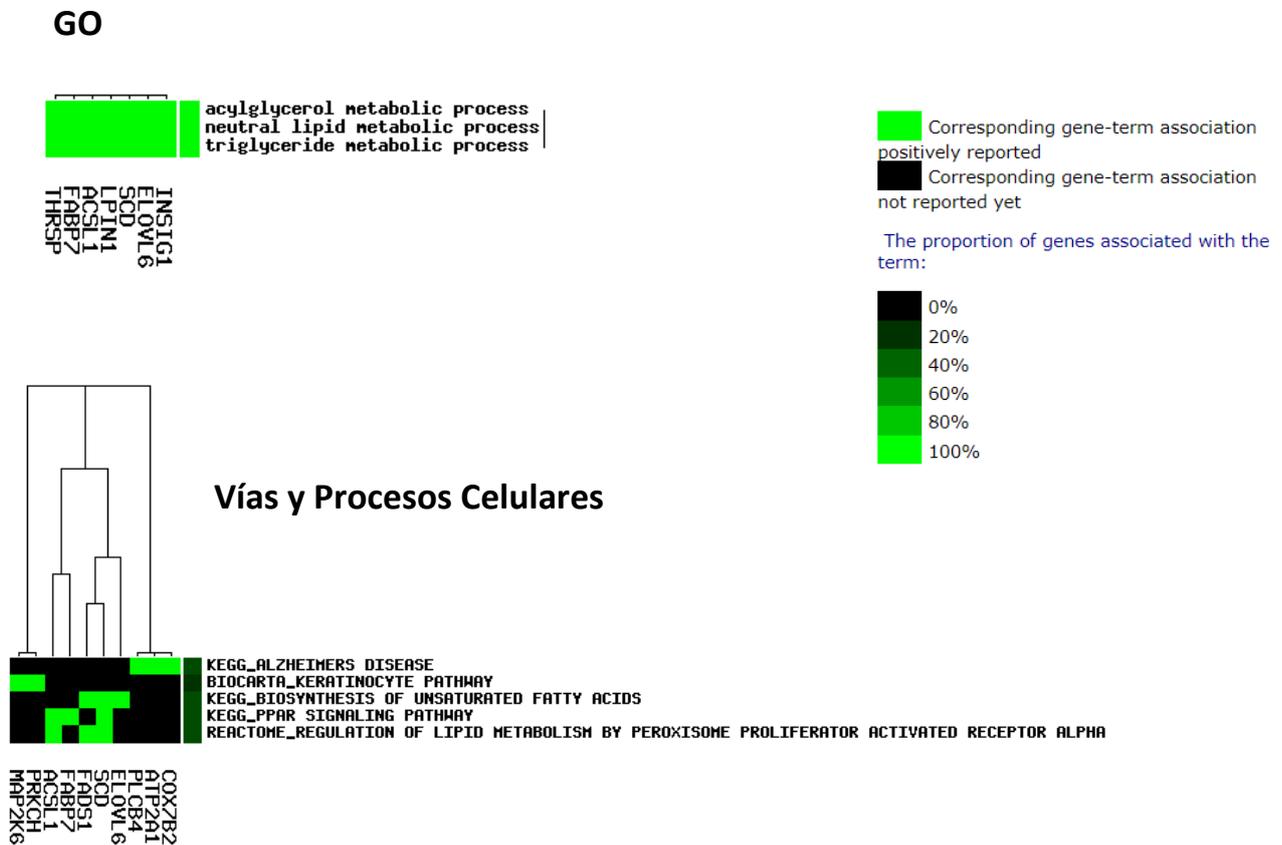


Figura 21. Análisis de GO y Vías y Procesos Celulares de los genes regulados negativamente en las líneas LNCaP-nc886 en comparación con LNCaP-control (97 genes).

Adicionalmente, se realizó el análisis anterior con la lista de genes que **aumentan** cuando se sobre-expresa nc886, conformada por 113 genes, obteniéndose los siguientes resultados, expuestos en la **Figura 22**.

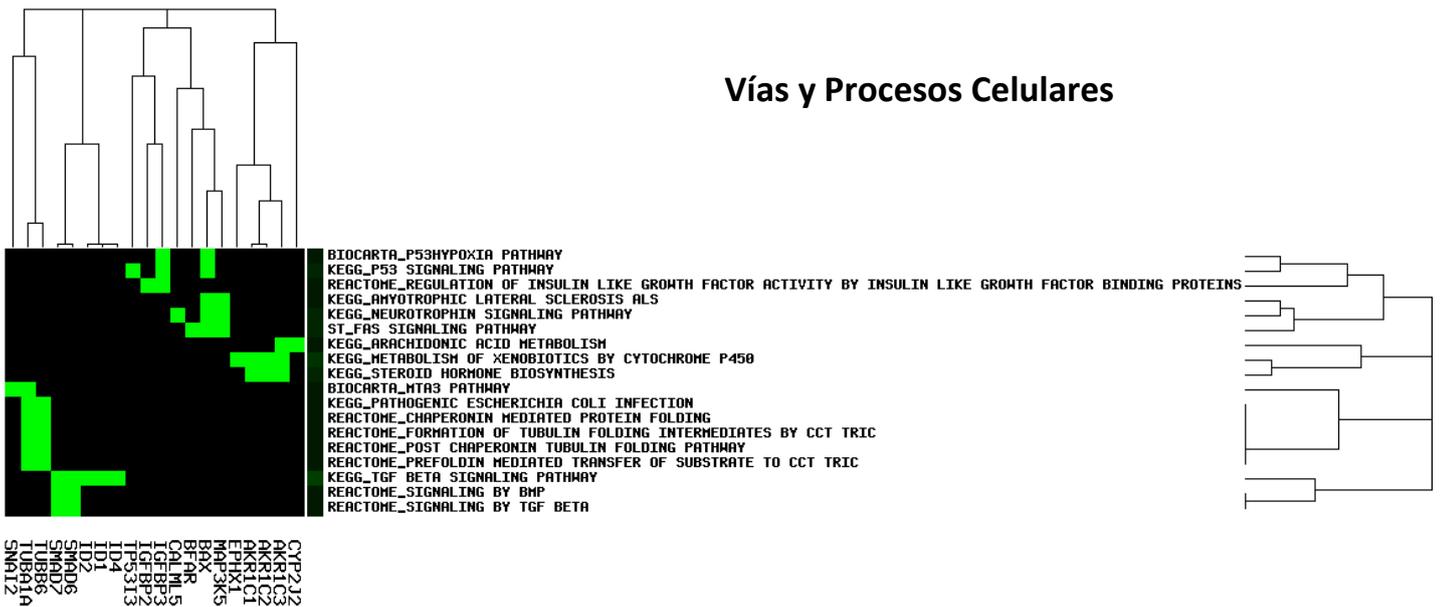
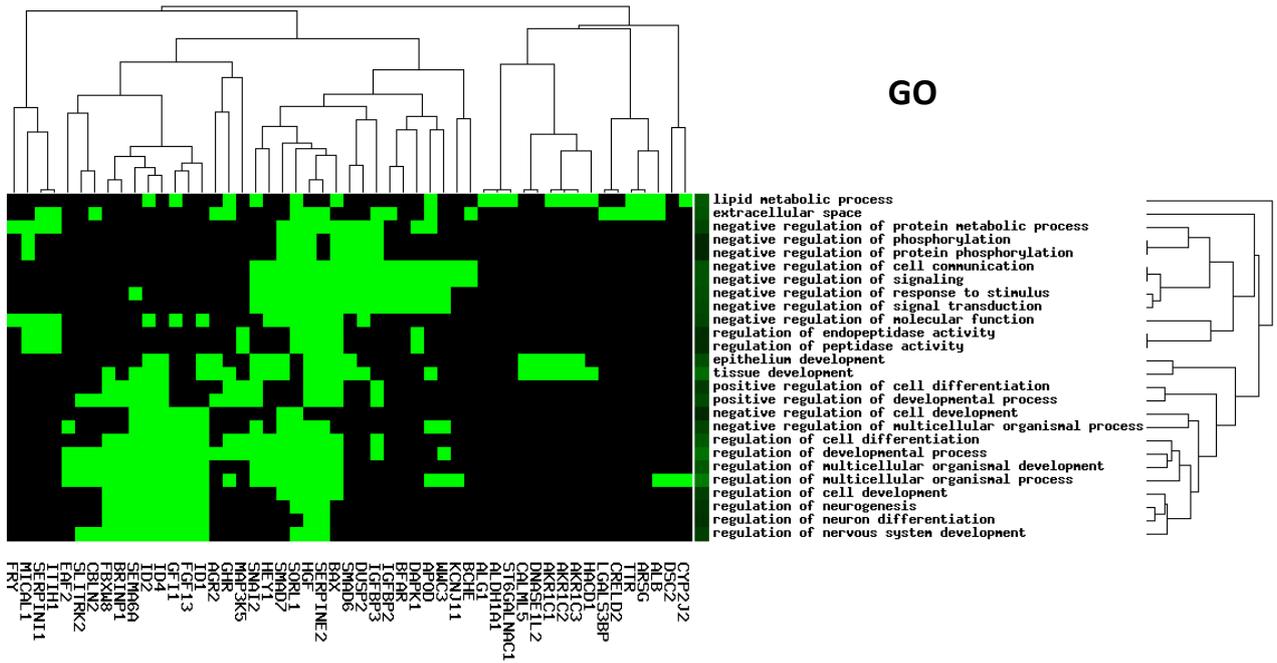


Figura 22. Análisis de GO y Vías y Procesos Celulares de los genes regulados positivamente de la línea LNCaP-nc886 en comparación con LNCaP-control (113 genes).

A partir de la observación de los agrupamientos (*Heat Maps*) de términos ontológicos y de vías y procesos celulares presentados queremos resaltar el enriquecimiento en procesos de biosíntesis y metabolismo de lípidos, que puede

apreciarse para el grupo de genes que disminuyen cuando aumenta nc886. De igual modo, para el caso de los genes que aumentan junto con nc886 queremos resaltar los procesos de señalización celular, diferenciación celular y desarrollo.

Con el fin de apreciar una visión más global de los procesos que se están viendo afectados en las células LNCaP ante la sobreexpresión de nc886, también se realizaron análisis de términos ontológicos y vías y procesos celulares utilizando como lista de entrada el conjunto total de genes expresados diferencialmente (97 +113=210) (Fig.23).

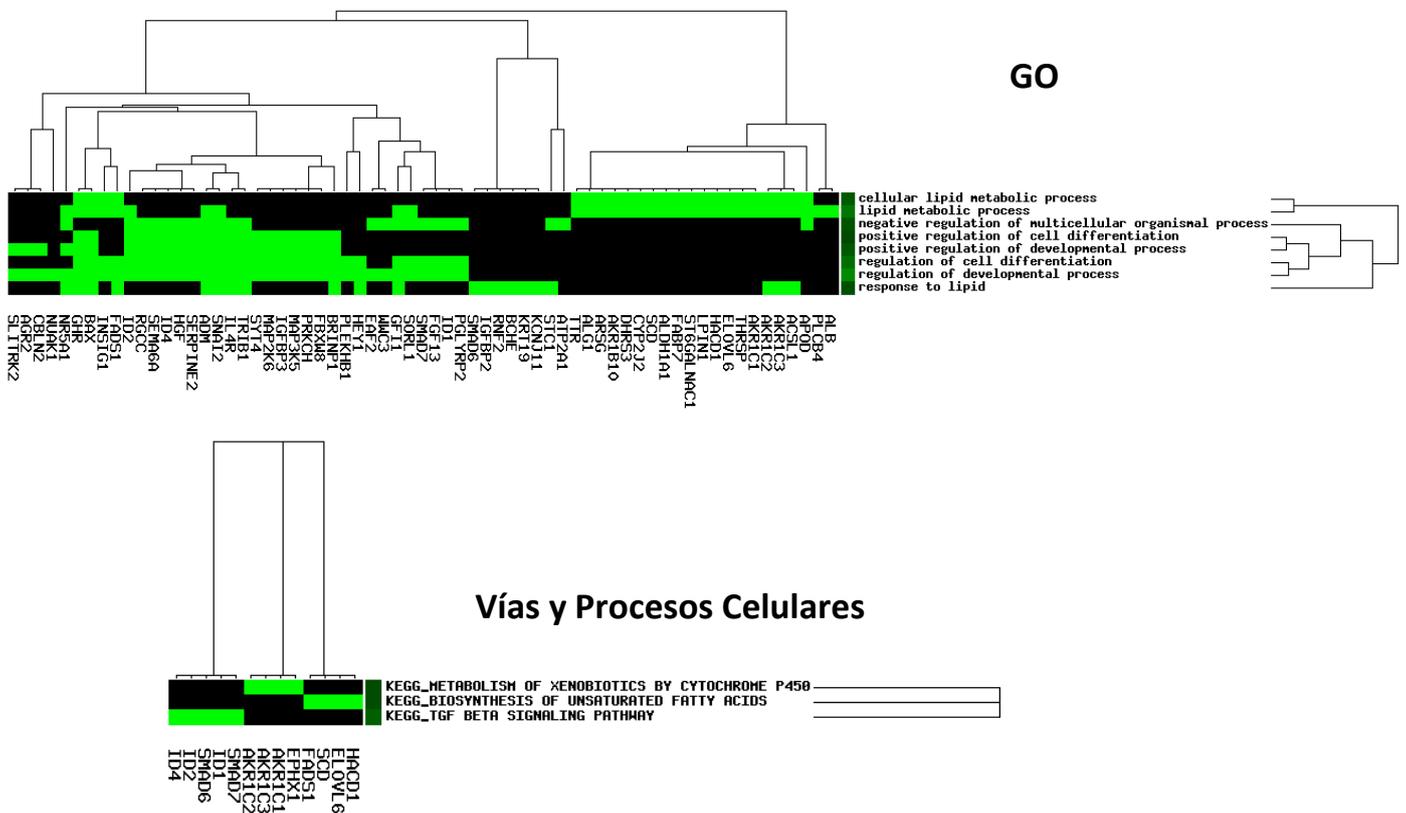


Figura 23. Análisis de GO y Vías y Procesos Celulares de los genes diferencialmente expresados en las líneas LNCaP-nc886 en comparación con LNCaP-control (220 genes).

Producto de este análisis global se puede observar que vuelven a aparecer términos de los análisis anteriores, que en gran medida marcan un impacto respecto de la modulación de nc886 en procesos vinculados a la diferenciación y desarrollo celular,

así como el metabolismo de lípidos. Si bien la asociación de estos términos nos resulta muy interesante en la interpretación del efecto global de la modulación del ARNnc en la biología celular, para estudiar los **posibles blancos** de acción directa del microARN proponemos un abordaje más amplio. Para ello se amplía la lista de entrada a los 500 genes que presentan la mayor represión frente a la sobreexpresión de nc886 y se analiza procediendo de igual manera, estudiando términos ontológicos y vías y procesos celulares. La razón por la cual se decide agrandar esta lista es principalmente porque entendemos que al analizar una entrada con tan solo 97 genes se pierde mucha información de candidatos que podrían estar siendo reprimidos en un modo más leve, pero que pueden reflejar cambios importantes en procesos celulares. De todos modos, corroboramos que estos 500 genes tengan un cambio en su expresión relativa que sea adecuado para categorizarlos como “reprimidos”. Por tanto, en esta lista se incluyen genes que presentan un cambio de al menos 30% en su expresión.

De este análisis se estudiaron los términos que muestran mayor significancia, ilustrado en tonos de verde más claros. Estos términos se muestran en la **Tabla 3**.

Término	Q valor
Cellular developmental process	0,390
Lipid metabolic process	0,028
Cell projection	0,430
System development	0,393
Anatomical structure morphogenesis	0,667
Animal organ development	0,067
Single-organism biosynthetic process	0,436
Multicellular organism development	0,312
Cell differentiation	0,250

Tabla 3. Términos ontológicos asociados a los 500 genes más reprimidos frente a la sobreexpresión de nc886.

El programa GenClip2.0 expresa la significancia de sus resultados en términos de p valor y q valor. La significación del q valor se trata de una mejor aproximación estadística cuando se realizan varias pruebas. El q valor es un p valor que se ha ajustado a la Tasa de descubrimiento falso (FDR), que es la proporción de falsos positivos que se espera obtener de una prueba. El p valor muestra la probabilidad de un falso positivo en una sola prueba, pero si se están ejecutando varias pruebas a partir de muestras pequeñas, que son comunes en los test genómicos, es mejor utilizar la valoración de la estadística de los valores q.

Luego, se analizó con mayor profundidad la **Tabla 3** y se procedió a buscar en ella genes candidatos blancos directos de hsa-miR-886-3p. Para este fin se utilizó una lista de genes con sitio complementario a la semilla de hsa-miR-886-3p en el 3'UTR de todos genes humanos, previamente elaborada en el laboratorio. Se evaluó el enriquecimiento de los términos descritos en la **Tabla 3** en genes con sitio complementario a la semilla de hsa-miR-886-3p en su 3'UTR. Como resultado se obtuvieron distintos agrupamientos que indican los blancos candidatos a represión directa por el miR de estudio (**Fig. 25**).

Cell projection	Anatomical structure morphogenesis	Animal organ development	Single-organism biosynthetic process	Lipid metabolic process	Cell differentiation	Cellular developmental process	System development	Multicellular organism development
CDH13 LAMP5 MYO1G CCDC120	CDH13 WTIP ALDH1A3 INSIG1 ZNF135 PTCD2	FASN NR5A1 HLF INSIG1 WDR38 LYL1 LIN28A PTCD2 SYNGR3	CYP46A1 FASN ALDH1A3 FDPS NR5A1 INSIG1 FADS1 PLD2 TM7SF2 ELOVL6	CYP46A1 PNPLA5 FASN ALDH1A3 FDPS NR5A1 INSIG1 FADS1 PLD2 TM7SF2 ELOVL6	FASN NR5A1 HLF INSIG1 FADS1 WDR38 LYL1 TSNAXIP1 PRDM13 HAPLN2 LIN28A PTCD2	WTIP FASN NR5A1 HLF INSIG1 FADS1 WDR38 LYL1 TSNAXIP1 PRDM13 HAPLN2 ZNF135 LIN28A PTCD2	CDH13 CYP46A1 FASN ALDH1A3 NR5A1 HLF INSIG1 WDR38 LYL1 PCDHA5 PRDM13 HAPLN2 LIN28A PTCD2 SYNGR3	CDH13 CYP46A1 FASN ALDH1A3 NR5A1 HLF INSIG1 WDR38 LYL1 TSNAXIP1 PCDHA5 HAPLN2 PRDM13 HAPLN2 LIN28A PTCD2 CCDC120 SYNGR3

Figura 25. Genes blanco directos candidatos predichos computacionalmente. Se muestran los genes que presentan sitio semilla de hsa-miR-886-3p en su 3'UTR, ordenados en función de la cantidad de genes blancos candidatos presentes en los términos de ontología evaluados.

Luego, se seleccionó el conjunto de aquellos genes que presentan sitio de unión al microARN en su 3'UTR (círculo rojo en **Figura 26**) y que disminuyeron su expresión cuando se sobreexpresa nc886 frente al control (círculo azul en **Figura 26**) como se muestra en el diagrama de Venn de la **Figura 26**. Este filtrado nos arroja como resultado 52 genes que cumplen con ambas condiciones, y que fueron utilizados a continuación para profundizar en su estudio a través del programa VarElect ¹¹⁹.

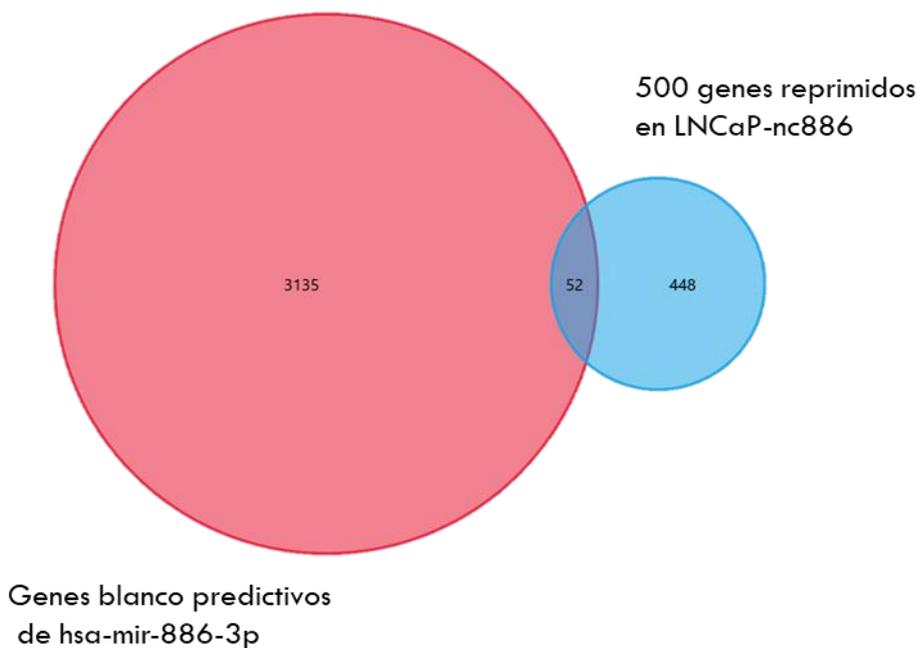


Figura 26. Diagrama de Venn de genes que disminuyen su expresión frente a la sobreexpresión de nc886 (azul) y que presentan sitio blanco en su 3'UTR para hsa-miR-886-3p (rojo).

En la plataforma de VarElect se utilizaron los términos de filtrado “prostate” e “invasion”, que dio como resultado una lista conformada por 20 genes que coincidieron con ambos términos o solo con alguno de ellos, ordenados en función de una puntuación asignado por VarElect. Esta herramienta permitió facilitar la asociación de genes con términos de interés en la búsqueda bibliográfica. En la **Tabla 4** se muestra la lista ordenada por VarElect. Una vez obtenida esta información se puede a buscar con más detalle la asociación de estos genes con el efecto en el cambio en la invasividad observado para la modulación de nc886. Basados en la literatura se intentan sacar conclusiones que relacionen al gen con un posible impacto en el efecto fenotípico observado.

#	Símbolo	Descripción	Tipo	Fenotipo emparejado	Cantidad de fenotipos emparejados	Puntaje	Cambio de Expresión Relativo
1	FASN	Fatty Acid Synthase	Protein	prostate; invasion	2	28.39	1,33
2	ALDH1A3	Aldehyde Dehydrogenase 1 Family Member A3	Protein	prostate; invasion	2	6.53	1,36
3	PTMA	Prothymosin, Alpha	Protein	prostate; invasion	2	6.5	1,32
4	BBC3	BCL2 Binding Component 3	Protein	prostate; invasion	2	5.71	1,34
5	LIN28A	Lin-28 Homolog A	Protein	prostate; invasion	2	3.83	1,36
6	CCDC7	Coiled-Coil Domain Containing 7	Protein	prostate; invasion	2	3.81	1,59
7	FDPS	Farnesyl Diphosphate Synthase	Protein	prostate; invasion	2	3.8	1,46
8	NR5A1	Nuclear Receptor Subfamily 5 Group A Member 1	Protein	prostate; invasion	2	3.44	1,35
9	PLD2	Phospholipase D2	Protein	prostate; invasion	2	3.1	1,34
10	HLF	HLF, PAR BZIP Transcription Factor	Protein	prostate; invasion	2	2.46	1,35
11	NUAK2	NUAK Family Kinase 2	Protein	invasion	1	2.24	1,50
12	PCDHA5	Protocadherin Alpha 5	Protein	prostate; invasion	2	1.87	1,56
13	TM7SF2	Transmembrane 7 Superfamily Member 2	Protein	prostate	1	1.62	1,41
14	FADS1	Fatty Acid Desaturase 1	Protein	prostate; invasion	2	1.58	1,57
15	TSNAXIP1	Translin Associated Factor X Interacting Protein 1	Protein	prostate	1	1.55	1,46
16	LYL1	LYL1, Basic Helix-Loop-Helix Family Member	Protein	prostate	1	0.68	1,38
17	CCR10	C-C Motif Chemokine Receptor 10	Protein	invasion	1	0.57	1,43
18	ELOVL6	ELOVL Fatty Acid Elongase 6	Protein	prostate	1	0.56	1,30
19	ERVFRD-1	Endogenous Retrovirus Group FRD Member 1, Envelope	Protein	prostate	1	0.55	1,63
20	KSR2	Kinase Suppressor Of Ras 2	Protein	invasion	1	0.5	1,40

Tabla 4. Resultados de VarElect. Se puede ver la identidad de los genes, para qué proteínas codifican, los términos de búsqueda ingresados con los cuales se apareó cada gen, la puntuación asignada por el programa, y el nivel de expresión que muestran en el microarray.

Se encontraron múltiples artículos donde se realizaron ensayos de invasión bloqueando genes presentes en la lista seleccionada con siRNA. Sin embargo, solamente

tres de ellos fueron realizados con líneas celulares de cáncer de próstata^{124,125,126}. Según los artículos revisados, las funciones de la mayoría de estos genes concordarían con la de un oncogén, lo que apoya la noción de que hsa-miR-886-3p actuaría como un microARN supresor tumoral.

Para realizar un filtrado más exigente de posibles genes blanco de hsa-miR-886-3p utilizamos el programa miRmap¹¹⁸ como predictor de sitios blanco para microARNs, con el fin de determinar sitios clásicos de unión de hsa-miR-886-3p al 3'UTR de ARNs mensajeros (**Tabla 5**). Hubo genes en los cuales miRmap no fue capaz de predecir la unión de hsa-miR-886-3p, dado que se tratan de uniones menos clásicas entre el miR y el ARN mensajero.

Por último, se estudió el perfil de expresión de los genes seleccionados en el set de datos de próstata presentes en la cohorte del The Cancer Genome Atlas (TCGA-PRAD). Producto de dicho análisis encontramos solo 9 de los genes que mostraron un aumento en la expresión en el tejido tumoral estadísticamente significativa, en apoyo a favor de la hipótesis planteada que implica que funcionen como oncogenes en esta neoplasia y por ende esté aumentada su expresión en los tumores (**Tabla 5**).

Gen	Ensayo de invasión (Literatura)	Línea celular utilizada en ensayo de invasión(Literatura)	Función (Literatura)	Número de sitios para hsa-miR-886-3p	Función TCGA PRAD
ALDH1A3	si	PC-3	ONC	-	ONC ****
FDPS	si	A549 y H1957	ONC	-	igual en normal y tumoral
PLD2	si	MDA-MB-231	ONC	-	ST
CCR10	si	MDA-MB-232	ONC	-	ST
FASN	si	LNCaP	ONC	4	ONC ****
NR5A1	si	SW480 y HCT116	ONC	3	ONC p = 0,1486
PTMA	si	PC-3	ONC	2	ONC ****
LIN28A	si	HCT116	ONC	1	ONC p = 0,8875
NUAK2	si	A172	ONC	1	ONC ***
FADS1	si	U2OS	ST	1	ST
CCDC7	no	-	ONC	-	ONC ****
KSR2	no	-	ONC	-	ONC *
ELOVL6	no	-	ONC	2	ONC p = 0,0616
BBC3	no	-	ONC	1	ONC **
LYL1	no	-	ONC	1	ST
ERVFRD-1	no	-	No se sabe	1	ST
TM7SF2	-	-	-	-	ONC ****
TSNAXIP1	-	-	-	-	igual en normal y tumoral
HLF	-	-	-	1	ST
PCDH5	-	-	-	1	ONC **

Tabla 5. Compilado de los datos de la bibliografía, sitios predictivos por el programa miRmap y el perfil de expresión entre tejido normal y tumoral en el set de datos de próstata presentes en el TCGA (The Cancer Genome Atlas). ONC, oncogén. ST, supresor tumoral.

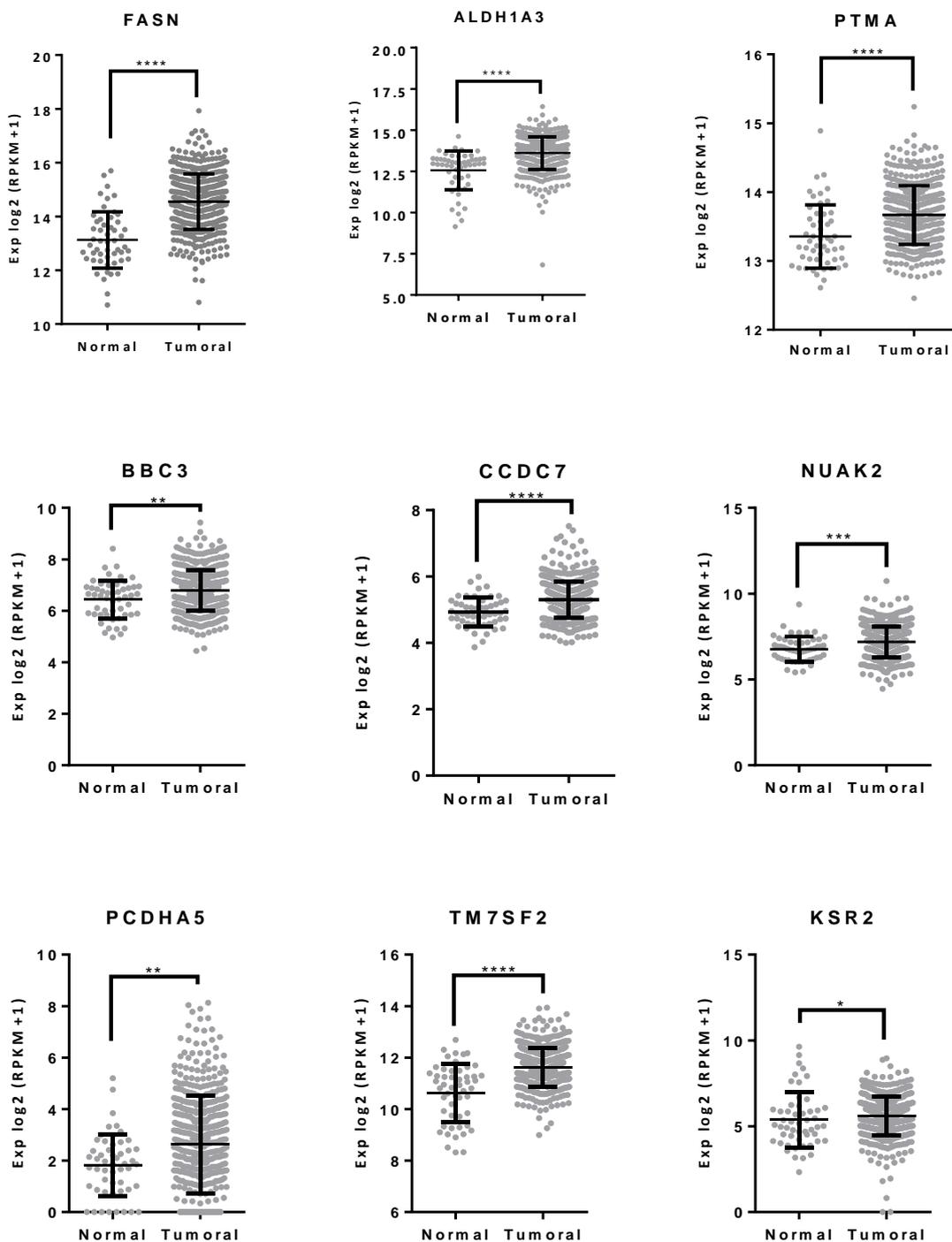


Figura 27. Expresión diferencial entre tejido normal y tumoral de próstata de los 9 genes seleccionados.

Se observa la expresión normalizada como RPKM+1 para cada uno de los 9 genes seleccionados en los datos de expresión de transcriptómica del TCGA. Se muestra la media con su respectivo desvío estándar. Se realizó el test de T de dos colas y su significancia estadística se expresa como p valor $\leq 0,05$, representado en los gráficos con asteriscos. Cuanto menor es el p valor mayor es la cantidad de asteriscos que se muestran.

Ensamblando todos los datos obtenidos hasta el momento, se seleccionaron dos genes candidatos que podrían estar participando en forma directa en procesos invasivos: FASN y PTMA. Como se puede ver en la **Tabla 5**, ambos genes presentan datos bibliográficos donde se muestran ensayos de invasión utilizando líneas celulares de próstata, en donde se bloquea solamente al gen de interés y se observa una disminución de la invasión celular^{124,126}. Este aspecto los hace lucir como candidatos directamente relacionados con este proceso. Al mismo tiempo, ambos presentan sitios clásicos de unión para hsa-miR-886-3p en su 3' UTR, donde se observan 4 sitios para FASN y 2 para PTMA (**Fig.28**), lo que indica que la represión de su expresión podría ser más importante. Además, en los datos de TCGA-PRAD ambos muestran una mayor expresión en tejido tumoral respecto al tejido normal, que revela la desregulación de estos genes en PCa (**Fig.27**), y por lo tanto que la represión en su expresión por hsa-miR-886-3p podría conferirles a estos tejidos un fenotipo más cercano al normal. A continuación, se muestra un breve resumen bibliográfico en cuanto a la funcionalidad de estos genes.

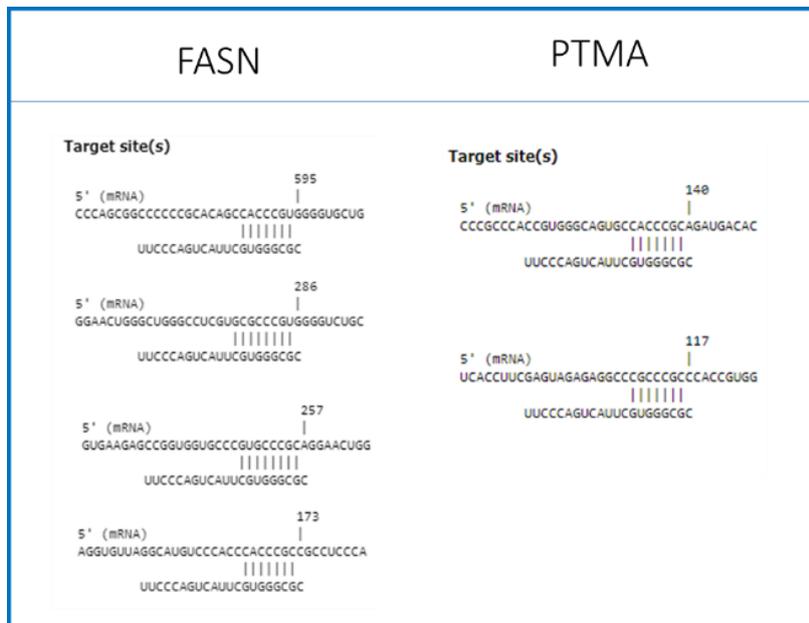


Figura 28. Sitios blanco predictivos para hsa-miR-886-3p reportados por miRmap para FASN y PTMA.

FASN

La Ácido graso sintasa (FASN) es la principal enzima de lipogénesis, cataliza la condensación dependiente de NADPH de acetil-CoA y malonil-CoA para producir ácido palmítico (**Fig.29**). Su síntesis se ve incrementada bajo la presencia de glucosa e insulina por diferentes factores de transcripción ¹²⁷. Ya en el año 1994 se notó la presencia elevada de FASN en tumores de mama y se propuso la vía de síntesis de ácidos grasos como marcador de mal pronóstico de la enfermedad ¹²⁸. Hoy en día se sabe que FASN se expresa en bajos niveles en tejidos normales pero su expresión aumenta en la mayoría de los tejidos tumorales ¹²⁴. El cáncer de próstata no es la excepción, y se ha reportado este aumento en pacientes andrógenos dependiente e independiente. Se ha probado la inhibición farmacológica de esta proteína obteniendo una reducción de tumores dependiente de la dosis en modelos de xenoinjertos humanos ¹²⁹. Experimentos donde se bloquea la expresión FASN mediante el uso de siARN específicos dieron como resultado una disminución importante en la síntesis de triglicéridos y de fosfolípidos, e indujeron cambios morfológicos marcados incluyendo una reducción en el volumen celular, una pérdida de contactos célula-célula y la formación de extensiones tipo araña ¹³⁰. Muchas propiedades funcionales de las membranas celulares están influenciadas por la composición relativa de ácidos grasos mezclados con fosfolípidos. Se ha demostrado que FASN juega un papel importante en la formación de microdominios de membrana resistente a los detergentes, que constituyen pequeñas balsas lipídicas implicadas en procesos celulares clave como transducción de señales, polarización celular y migración celular ¹³¹. Además, en otro trabajo donde se inhibe a FASN también con ARN interferente en LNCaP, se observa en videos de *time-lapse* una menor motilidad celular. Las células transfectadas con el ARN interferente control se veían bien adheridas a la placa de cultivo, con formación de pseudopodios, adoptaban una morfología de huso, y migraban y se replicaban activamente. Sin embargo, las células con FASN reprimido mostraban la formación ineficiente de pseudopodios, cambiaban a una morfología redondeada y no se replicaban en gran medida ¹²⁴. Además, se ha visto que el malonil-CoA disminuye la expresión del gen HER2/neu, un oncogén

tipo factor de crecimiento. Esto enfatiza el papel de FASN en la EMT, ya que FASN disminuye el contenido de malonil-CoA en las células ¹³².

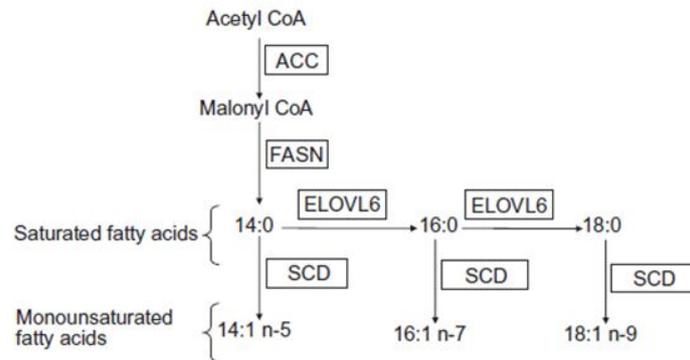


Figura 29. Síntesis de ácidos grasos. Como se observa en la imagen tanto FASN como ELOVL6 tienen una función clave en esta vía. Ambos genes se encuentran en la lista de 20 genes candidatos finales.

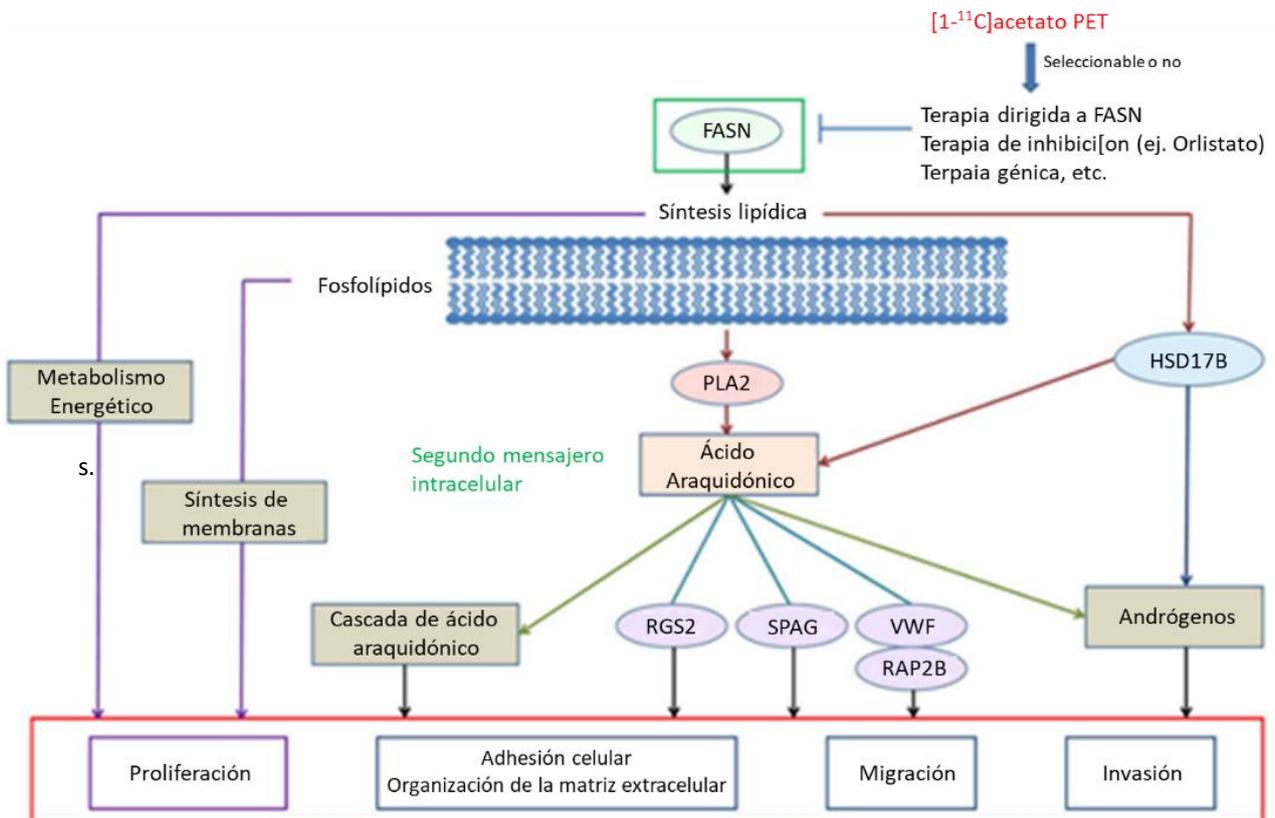


Figura 30. Procesos regulados por FASN. Modificado de Yoshii, Y. et al. Fatty Acid Synthase Is a Key Target in Multiple Essential Tumor Functions of Prostate Cancer: Uptake of Radiolabeled Acetate as a Predictor of the Targeted Therapy Outcome. PLoS One 8, (2013) ¹²⁴

PTMA

La Protimosina- α es la proteína precursora de la Timosina- α , formada por 110 aminoácidos y ubicuamente expresada en los tejidos de mamíferos. Dentro de sus funciones se encuentra su participación en la división celular, proceso durante el cual esta proteína migra al núcleo e interacciona con factores de transcripción para la remodelación de la cromatina ¹³³. PTMA ha sido detectada en suero humano, aunque no se ha identificado ninguna vía de secreción ¹³⁴. La sobreexpresión de PTMA ha sido reportada en varios tipos de cáncer, como pulmón, mama, vejiga y cuello y cabeza ¹³⁵. Si bien no está descrito en la bibliografía actual el posible rol que puede cumplir PTMA en la invasión celular, hay varios reportes que lo asocian a un mal pronóstico en cuanto al avance del cáncer ^{136,137,138,135}.

La sobreexpresión de PTMA ha sido reportada en varios neoplasmas, y su nivel de expresión está asociado con el pronóstico, potencial metastásico del tumor y supervivencia general de los pacientes. La sobreexpresión de este gen en cáncer de mama se asocia con potencial de metástasis del tumor y con riesgo de muerte. Ha sido reportado como un posible biomarcador en el cáncer de colon y de carcinoma de células transicionales de vejiga ¹³⁷. Ensayos inmunohistoquímicos han demostrado la localización nuclear de PTMA tanto en células epiteliales gástricas normales y malignas como en células humanas de cáncer de próstata ¹³⁶.

En otro trabajo se muestra que el silenciamiento de PTMA con siARN y la sobreexpresión de miR-1 (que tiene como target PTMA) pueden acelerar la apoptosis en células NPC-TW01 cuando se las trata con drogas inductoras de la apoptosis (actinomicina D, camptotecina y etopósido) utilizadas en la clínica, por lo que el silenciamiento de este gen podría tener aplicaciones clínicas asistiendo estos tratamientos. ¹³⁹

En otro estudio de cáncer colorrectal se observó que la tinción con inmunohistoquímica era mayor en metástasis de nodo linfático en comparación con tumores primarios. La expresión de PTMA se relacionó con los resultados de

supervivencia desfavorable, lo que indica que el aumento de la expresión de PTMA se asocia con un comportamiento invasivo y metástasis de CCR. Esto es apoyado por otro artículo, que previamente identificó a PTMA relacionado con la adhesión de células de cáncer de ovario, la migración y la proliferación.⁸²

Al igual que Myc, Ras, E2F y β -catenina, la sobreexpresión de PTMA da como resultado la activación de TP53, aceptado como un mecanismo supresor tumoral innato y una respuesta celular crítica a diversos estímulos de estrés⁸². Por otra parte, se ha reportado que el aumento excesivo en los niveles de ROS puede llevar a reacciones inflamatorias que inducen la resistencia a insulina, trastornos metabólicos e incluso cáncer¹³⁴. Las células que experimentan estrés forman especies reactivas del oxígeno (ROS), debido a las condiciones hostiles en las que crece el tumor. El aumento de ROS podría desencadenar la apoptosis que conduciría a la liberación de PTMA a la circulación, que generaría aún más resistencia a la insulina en tejidos sensibles como el hígado y músculo vía TLR4¹³⁴. Esto podría justificar la presencia de PTMA en suero.

Más específicamente en próstata, la anulación de PTMA mediada por ARN interferencia tuvo como consecuencia la supresión de la proliferación y la invasión de la línea celular PC3, que indica una participación íntima en la diferenciación y progresión de adenocarcinomas de próstata¹²⁶. En este trabajo, los autores aseguran que PTMA podría ser un candidato para la terapia del cáncer de próstata, acompañado de un buen sistema de entrega para evitar el daño en el resto de los tejidos que lo expresan. Se necesita más investigación para dilucidar la posibilidad de interacciones entre PTMA y el receptor de andrógenos en el cáncer de próstata.

CONCLUSIÓN Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se estudió el posible rol supresor tumoral de nc886/hsa-miR-886-3p en los procesos de migración e invasión tumoral. Si bien ambos procesos contribuyen a la formación de metástasis, solo fue posible corroborar este aspecto en los ensayos de invasión. No se mostraron cambios significativos en la migración bidimensional. De todas formas, para concluir que efectivamente este ARN no se encuentra implicado en los fenómenos de migración es necesario el estudio de otros factores, como la adhesión a la matriz extracelular de forma bidimensional, ya que la adhesión celular a una placa de cultivo no es la misma que a una matriz biológica. Respecto a la invasión celular se efectuó un cambio muy marcado con la sobre-expresión de nc886. Sería interesante probar si este cambio se relaciona con la cantidad de nc886, realizando transfecciones en distintas dosis y realizando ensayos in vivo, para evaluar si la formación de metástasis es dependiente de la concentración de este ARN. Esto último resulta interesante porque podría proponerse como molécula terapéutica. También queda determinar cuál es la molécula que tiene el efecto sobre la invasión, es decir, si el actor principal es nc886 o su producto hsa-miR-886-3p.

Respecto al estudio sobre los genes blanco predictivos de este miR, se observó que la desregulación del metabolismo lipídico parece ser uno de los blancos más importantes, aunque también se observaron otros genes pocos estudiados, cuya función todavía no se conoce con certeza y que tampoco han sido estudiados bajo el marco del PCa. En primer lugar, es fundamental corroborar de forma experimental la unión de hsa-miR-886-3p a los genes predictivos con ensayos de genes reporteros, para asegurar la interacción directa predicha por los programas utilizados en este trabajo. Además, queda mucho por estudiar sobre el gen PTMA, que si bien presenta bibliografía que apoya los resultados de este trabajo, queda pendiente dilucidar su rol en la invasión tumoral, para verificar si el fenotipo observado puede ser atribuido a la baja en la expresión de este gen.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Review Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
2. World Health Organization. Cancer Fact sheet N°297. (2018).
3. Massagué, J. Hacia Una Comprensión Del Cáncer. 203–215 (2008).
4. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat. Med.* **10**, 789–799 (2004).
5. Vogelstein, B. *et al.* Cancer Genome Landscapes. *Science (80-.)*. **339**, 1546–1558 (2013).
6. Vogelstein, B. & Kinzler, K. W. The Path to Cancer — Three Strikes and You’re Out. *N. Engl. J. Med.* **373**, 1895–1898 (2015).
7. Hanahan, D. & Coussens, L. M. Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* **21**, 309–322 (2012).
8. Shiao, S. L., Chu, G. C.-Y. & Chung, L. W. K. Regulation of prostate cancer progression by the tumor microenvironment. *Cancer Lett.* **380**, 340–348 (2016).
9. International Agency for Research on Cancer & World Health Organization. *Biennial Report*. (2012).
10. Comprehensive Cancer Information - National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/>. (Accessed: 21st October 2018)
11. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol.* **1**, 505–527 (2015).
12. Ferlay, J. *et al.* Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int. J. Cancer* (2018).
13. Daniyal, M. *et al.* Epidemiology, etiology, diagnosis and treatment of prostate cancer. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **15**, 9575–9578 (2014).
14. Farkas, A., Marcella, S. & Rhoads, G. G. Ethnic and racial differences in prostate cancer incidence and mortality. *Ethn.Dis* **10**, 69–75 (2000).
15. Wallace, T. A. *et al.* Tumor immunobiological differences in prostate cancer between African-American and European-American men. *Cancer Res.* **68**, 927–936 (2008).
16. Larkin, S. E. T. *et al.* Proteomics in prostate cancer biomarker discovery. *Expert Rev. Proteomics* **7**, 93–102 (2010).
17. Kral, M. *et al.* Genetic determinants of prostate cancer: A review. *Biomed. Pap.* **155**, 3–10 (2011).
18. Mejak, S. L., Bayliss, J. & Hanks, S. D. Long Distance Bicycle Riding Causes Prostate-Specific Antigen to Increase in Men Aged 50 Years and Over. *PLoS One* **8**, e56030 (2013).
19. Esfahani, M., Ataei, N. & Panjehpour, M. Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **16**, 2601–2611 (2015).
20. Filella, X. & Foj, L. Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer. *Clin. Chem. Lab. Med.* **53**, 963–973 (2015).
21. Ilic, D., Neuberger, M. M., Djulbegovic, M. & Dahm, P. Screening for prostate cancer. *Cochrane*

- Database Syst Rev* **1**, Cd004720 (2013).
22. Loeb, S. Biomarkers for Prostate Biopsy and Risk Stratification of Patients with Newly Diagnosed Prostate Cancer. *Urol. Pract.* **4**, 315–321 (2017).
 23. De La Calle, C. *et al.* Multicenter evaluation of the prostate health index to detect aggressive prostate cancer in biopsy naïve men. *J. Urol.* **194**, 65–72 (2015).
 24. Loeb, S. *et al.* The prostate health index selectively identifies clinically significant prostate cancer. *J. Urol.* **193**, 1163–1169 (2015).
 25. Vickers, A. J. *et al.* A panel of kallikrein marker predicts prostate cancer in a large, population-based cohort followed for 15 years without screening. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* **20**, 255–261 (2011).
 26. Parekh, D. J. *et al.* A Multi-institutional Prospective Trial in the USA Confirms that the 4Kscore Accurately Identifies Men with High-grade Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **68**, 464–470 (2015).
 27. Crawford, E. D., Higano, C. S., Shore, N. D., Hussain, M. & Petrylak, D. P. Treating patients with metastatic castration resistant prostate cancer: A comprehensive review of available therapies. *J. Urol.* **194**, 1537–1547 (2015).
 28. Vlaeminck-Guillem, V. *et al.* Test urinaire PCA3 et diagnostic du cancer prostatique: Étude à partir de 1015 patients. *Prog. en Urol.* **25**, 1160–1168 (2015).
 29. Boström, P. J. *et al.* Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **68**, 1033–1044 (2015).
 30. Alizadeh, A. M., Shiri, S. & Farsinejad, S. *Metastasis review: from bench to bedside. Tumor Biology* **35**, (2014).
 31. Berish, R. B., Ali, A. N., Telmer, P. G., Ronald, J. A. & Leong, H. S. Translational models of prostate cancer bone metastasis. *Nat. Rev. Urol.* **15**, 403–421 (2018).
 32. Zhang, Y. & Weinberg, R. A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. *Front. Med.* **12**, 361–373 (2018).
 33. Wade, C. & Kyprianou, N. Profiling Prostate Cancer Therapeutic Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 904 (2018).
 34. Davis, F. M., Stewart, T. A., Thompson, E. W. & Monteith, G. R. Targeting EMT in cancer : opportunities for pharmacological intervention. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 479–488 (2014).
 35. Friedl, P. & Alexander, S. Review Cancer Invasion and the Microenvironment : Plasticity and Reciprocity. *Cell* **147**, 992–1009 (2012).
 36. everydaybiochemistry. Available at: <https://everydaybiochemistry.wordpress.com/>. (Accessed: 21st October 2018)
 37. Poste, G. & Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* **283**, 139–146 (1980).
 38. Fidler, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: The ‘seed and soil’ hypothesis revisited. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 453–458 (2003).
 39. Sahai, E. Illuminating the metastatic process. *Nat. Rev. Cancer* **7**, 737–749 (2007).
 40. Christiano, A. P., Yoshida, B. A., Dubauskas, Z., Sokoloff, M. & Rinker-Schaeffer, C. W. Development of markers of prostate cancer metastasis. Review and perspective. *Urol Oncol* **5**, 217–223 (2000).

41. O'Connor, M. L. *et al.* Cancer stem cells: A contentious hypothesis now moving forward. *Cancer Lett.* **344**, 180–187 (2014).
42. Oskarsson, T., Batlle, E. & Massagué, J. Metastatic stem cells: Sources, niches, and vital pathways. *Cell Stem Cell* **14**, 306–321 (2014).
43. Ayob, A. Z. & Ramasamy, T. S. Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *J. Biomed. Sci.* **25**, 20 (2018).
44. Langley, R. R. & Fidler, I. J. Tumor cell-organ microenvironment interactions in the pathogenesis of cancer metastasis. *Endocr. Rev.* **28**, 297–321 (2007).
45. Harunaga, J. S. & Yamada, K. M. Cell-matrix adhesions in 3D. *Matrix Biol.* **30**, 363–368 (2011).
46. Bendas, G. & Borsig, L. Cancer cell adhesion and metastasis: Selectins, integrins, and the inhibitory potential of heparins. *Int. J. Cell Biol.* **2012**, (2012).
47. Grada, A., Otero-vinas, M., Prieto-castrillo, F., Obagi, Z. & Falanga, V. Research Techniques Made Simple : Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *J. Invest. Dermatol.* **137**, e11–e16 (2018).
48. Shiode, Y. *et al.* A novel cell exclusion zone assay with a barrier made from room temperature vulcanizing silicone rubber. *PLoS One* **12**, 1–12 (2017).
49. Yamada, J. S. H. and K. M. Cell-Matrix Adhesions in 3D Jill. *Matrix Biol.* **6**, 247–253 (2011).
50. Millet, L. J. & Gillette, M. U. Over a century of neuron culture: From the hanging drop to microfluidic devices. *Yale J. Biol. Med.* **85**, 501–521 (2012).
51. Elisabete C. Costa, Duarte de Melo-Diogo, André F. Moreira, Marco P. Carvalho, I. J. C. Spheroids formation on non-adhesive surfaces by Liquid Overlay Technique: considerations and practical approaches. 1–25 (2017).
52. Becker, J. L., Prewett, T. L., Spaulding, G. F. & Goodwin, T. J. Three-dimensional growth and differentiation of ovarian tumor cell line in high aspect rotating-wall vessel: Morphologic and embryologic considerations. *J. Cell. Biochem.* **51**, 283–289 (1993).
53. Kleinman, H. K. & Martin, G. R. Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Semin. Cancer Biol.* **15**, 378–386 (2005).
54. Vukicevic, S. *et al.* Identification of multiple active growth factors in basement membrane matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components. *Exp. Cell Res.* **202**, 1–8 (1992).
55. Benton, G., Kleinman, H. K., George, J. & Arnaoutova, I. Multiple uses of basement membrane-like matrix (BME/Matrigel) in vitro and in vivo with cancer cells. *Int. J. Cancer* **128**, 1751–1757 (2011).
56. Haier, J. & Nicolson, G. L. Tumor cell adhesion under hydrodynamic conditions of fluid flow. *APMIS* **109**, 241–62 (2001).
57. Gout, S., Tremblay, P. L. & Huot, J. Selectins and selectin ligands in extravasation of cancer cells and organ selectivity of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **25**, 335–344 (2008).
58. Lugassy, C. *et al.* Ultrastructural and immunohistochemical studies of the periendothelial matrix in human melanoma: Evidence for an amorphous matrix containing laminin. *Journal of Cutaneous Pathology* **26**, 78–83 (1999).
59. Abel, E. L., Angel, J. M., Kiguchi, K. & Digiovanni, J. Fundamentals and applications. *Methods* **4**, 1350–1362 (2011).

60. Murad Alam, D. R. Cutaneous Squamous-cell Carcinoma. *J. Surv. Eng.* **122**, 158–167 (1997).
61. Futakuchi, M. *et al.* Establishment of an in vivo highly metastatic rat hepatocellular carcinoma model. *Japanese J. Cancer Res.* **90**, 1196–1202 (1999).
62. Richmond, A. & Su, Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis. Model. Mech.* **1**, 78–82 (2008).
63. Khanna, C. & Hunter, K. Modeling metastasis in vivo. *Carcinogenesis* **26**, 513–523 (2005).
64. Francia, G., Cruz-Munoz, W., Man, S., Xu, P. & Kerbel, R. S. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics. *Nat. Rev. Cancer* **11**, 135–141 (2011).
65. Ottewell, P. D., Coleman, R. E. & Holen, I. From genetic abnormality to metastases: Murine models of breast cancer and their use in the development of anticancer therapies. *Breast Cancer Res. Treat.* **96**, 101–113 (2006).
66. Arguello, F., Baggs, R. B. & Frantz, C. N. A Murine Model of Experimental Metastasis to Bone and Bone Marrow. *6876–6882* (1988).
67. Harms, J. F. & Welch, D. R. MDA-MB-435 human breast carcinoma metastasis to bone. *Clin Exp Metastasis* **20**, 327–334 (2003).
68. Lorger, M. & Felding-Habermann, B. Capturing changes in the brain microenvironment during initial steps of breast cancer brain metastasis. *Am. J. Pathol.* **176**, 2958–2971 (2010).
69. Curtis *et al.* Selection of Highly Metastatic Variants of Different Human Prostatic Carcinomas Using Orthotopic Implantation in Nude Mice. *Clin. Cancer Res.* **2**, 1627–1636 (1996).
70. Rubio-Viqueira, B. & Hidalgo, M. Direct in vivo xenograft tumor model for predicting chemotherapeutic drug response in cancer patients. *Clin. Pharmacol. Ther.* **85**, 217–221 (2009).
71. Bos, P. D., Nguyen, D. X. & Massagué, J. Modeling metastasis in the mouse. *Curr. Opin. Pharmacol.* **10**, 571–577 (2010).
72. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**: 843–85, 843–854 (1993).
73. Costa, P. M. & Pedroso de Lima, M. C. MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression. *Pharmaceuticals (Basel)*. **6**, 1195–220 (2013).
74. Khanmi, K., Ignacimuthu, S. & Paulraj, M. G. MicroRNA in prostate cancer. *Clin. Chim. Acta* **451**, 154–160 (2015).
75. Eulalio, A., Huntzinger, E. & Izaurralde, E. Getting to the Root of miRNA-Mediated Gene Silencing. *Cell* **132**, 9–14 (2008).
76. Huang, Y., Shen, X.-J. & Zou, Q. Biological functions of MicroRNAs : A review Biological functions of microRNAs : a review. (2010).
77. Sessa, W. C. MicroRNAs As Novel Regulators of Angiogenesis. 442–454 (2009).
78. Liu, X., Luo, G., Bai, X. & Wang, X. J. Bioinformatic analysis of microRNA biogenesis and function related proteins in eleven animal genomes. *J. Genet. Genomics* **36**, 591–601 (2009).
79. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
80. Sibley, C. R. *et al.* The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin. *Nucleic Acids Res.* **40**, 438–448 (2012).

81. Du, T. microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* **132**, 4645–4652 (2005).
82. Deng, S. *et al.* cancer Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer ND ES SC RIB. **4101**, (2008).
83. Calin, G. A. *et al.* Nonlinear partial differential equations and applications: Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 15524–15529 (2002).
84. Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D. & Croce, C. M. MicroRNA and cancer - A brief overview. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 1–9 (2015).
85. Melo, S. A. & Esteller, M. Dysregulation of microRNAs in cancer : Playing with fire. *FEBS Lett.* **585**, 2087–2099 (2011).
86. Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 857–866 (2006).
87. Yang, H. *et al.* MicroRNA Expression Signatures in Barrett’s Esophagus and Esophageal Adenocarcinoma. *Cancer* **15**, 5744–5752 (2009).
88. Chen, Y., Gao, D., Huang, L. & Hill, C. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 128–141 (2016).
89. Ledford, H. Gene-silencing technology gets first drug approval after 20-year wait. *Nature* **560**, 291–292 (2018).
90. Michael, M. Z., O’ Connor, S. M., van Holst Pellekaan, N. G., Young, G. P. & James, R. J. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol. Cancer Res.* **1**, 882–91 (2003).
91. Szafranska, A. E. *et al.* Analysis of MicroRNAs in Pancreatic Fine-Needle Aspirates Can Classify Benign and Malignant Tissues. *Clin Chem* **54**, 1716–1724 (2014).
92. Nagarkatti, M., Rieder, S. & Hegde, V. Do cannabinoids have a therapeutic role in transplantation? *Trends Pharmacol. Sci.* **717**, 85–90 (2010).
93. Weiland, M., Gao, X. H., Zhou, L. & Mi, Q. S. Small RNAs have a large impact: Circulating microRNAs as biomarkers for human diseases. *RNA Biol.* **9**, 850–859 (2012).
94. Armand-Labit, V. & Pradines, A. Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *Biomol. Concepts* **8**, 61–81 (2017).
95. Salloum-Asfar, A. B. A.-R. y S. MicroRNAs Circulantes: ¿Nuevos Biomarcadores en Cáncer? *Rev. EUBACTERIA* **32**, 1–7 (2013).
96. Howe, E. N., Cochrane, D. R. & Richer, J. K. Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Res.* **13**, 1–15 (2011).
97. Götte, M. *et al.* MiR-145-dependent targeting of Junctional Adhesion Molecule A and modulation of fascin expression are associated with reduced breast cancer cell motility and invasiveness. *Oncogene* **29**, 6569–6580 (2010).
98. Ma, L., Teruya-Feldstein, J. & Weinberg, R. A. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature* **449**, 682–688 (2007).
99. Zhu, L. *et al.* MicroRNA-9 up-regulation is involved in colorectal cancer metastasis via promoting cell motility. *Med. Oncol.* **29**, 1037–1043 (2012).
100. Wilusz, J. E., Sunwoo, H. & Spector, D. L. Long noncoding RNAs: functional surprises from the

- RNA world. *Genes Dev.* **23**, 1494–504 (2009).
101. Amort, M. *et al.* Expression of the vault RNA protects cells from undergoing apoptosis. *Nat. Commun.* **6**, 7030 (2015).
 102. Nandy, C. *et al.* Epstein–Barr Virus-Induced Expression of a Novel Human Vault RNA. *J. Mol. Biol.* **388**, 776–784 (2009).
 103. Lee, Y. S. A Novel Type of Non-coding RNA, nc886, Implicated in Tumor Sensing and Suppression. **13**, 26–30 (2015).
 104. Lee, K. *et al.* Precursor miR-886 , a novel noncoding RNA repressed in cancer , associates with PKR and modulates its activity. 1076–1089 (2011).
 105. Jeon, S. H. *et al.* Characterization of the direct physical interaction of nc886, a cellular non-coding RNA, and PKR. *FEBS Lett.* **586**, 3477–3484 (2012).
 106. Jeon, S. H., Johnson, B. H. & Lee, Y. S. A tumor surveillance model: a non-coding RNA senses neoplastic cells and its protein partner signals cell death. *Int. J. Mol. Sci.* **13**, 13134–9 (2012).
 107. Treppendahl, M. B. *et al.* Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML. *Blood* **119**, 206–216 (2012).
 108. Cao, J. *et al.* DNA Methylation-Mediated Repression of miR-886-3p Predicts Poor Outcome of Human Small Cell Lung Cancer. 1–11 (2013).
 109. Jung, K. *et al.* miRNAs can predict prostate cancer biochemical relapse and are involved in tumor progression. *Int. J. Oncol.* **39**, 1183–92 (2011).
 110. Lee, H.-S. *et al.* Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget* **5**, 3472–3481 (2014).
 111. Romanelli, V. *et al.* Variable maternal methylation overlapping the nc886/vtRNA2-1 locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. *Epigenetics* **9**, 783–90 (2014).
 112. Lee, K.-S. *et al.* nc886, a non-coding RNA of anti-proliferative role, is suppressed by CpG DNA methylation in human gastric cancer. *Oncotarget* **5**, 3944–3955 (2014).
 113. Lee, E. K. *et al.* nc886, a non-coding RNA and suppressor of PKR, exerts an oncogenic function in thyroid cancer. *Oncotarget* **7**, 75000–75012 (2016).
 114. Fort, R. S. *et al.* Nc886 is epigenetically repressed in prostate cancer and acts as a tumor suppressor through the inhibition of cell growth. *BMC Cancer* **18**, 127 (2018).
 115. 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).
 116. Schindelin, J. *et al.* Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods* **9**, 676–682 (2012).
 117. Wang, J.-H. *et al.* GenCLiP 2.0: a web server for functional clustering of genes and construction of molecular networks based on free terms. *Bioinformatics* **30**, 2534–2536 (2014).
 118. Vejnar, C. E. & Zdobnov, E. M. miRmap: Comprehensive prediction of microRNA target repression strength. *Nucleic Acids Res.* **40**, 11673–11683 (2012).
 119. Stelzer, G. *et al.* VarElect: the phenotype-based variation prioritizer of the GeneCards Suite. *BMC Genomics* **17**, 444 (2016).

120. Oliveros, J. C. VENNY. An interactive tool for comparing lists with Venn Diagrams. (2007). Available at: http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny_old/venny.php. (Accessed: 19th October 2018)
121. Weinstein, J. N. *et al.* The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer analysis project. *Nat. Genet.* **45**, 1113–1120 (2013).
122. Kramer, N. *et al.* In vitro cell migration and invasion assays. *Mutat. Reserach* **752**, 10–24 (2013).
123. Guo, H., Ingolia, N. T., Weissman, J. S. & Bartel, D. P. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* **466**, 835–840 (2010).
124. Yoshii, Y. *et al.* Fatty Acid Synthase Is a Key Target in Multiple Essential Tumor Functions of Prostate Cancer: Uptake of Radiolabeled Acetate as a Predictor of the Targeted Therapy Outcome. *PLoS One* **8**, (2013).
125. Wang, S. *et al.* ALDH1A3 correlates with luminal phenotype in prostate cancer. *Tumor Biol.* **39**, 1–8 (2017).
126. Shugo Suzuki, Satoru Takahashi, Seishiro Takahashi, K. T., Atsuya Hikosaka, Toshiaki Wakita, Naoki Nishiyama, T. F. & Takehiko Okamura, and T. S. Expression of Prothymosin Alpha Is Correlated With Development and Progression in Human Prostate Cancers. *Prostate* **66**, 463–469 (2006).
127. Campa, D. *et al.* Genetic variation in genes of the fatty acid synthesis pathway and breast cancer risk. *Breast Cancer Res. Treat.* **118**, 565–574 (2009).
128. Kuhajda, F. P. *et al.* Fatty acid synthesis: A potential selective target for antineoplastic therapy since inhibition of FAS inhibits growth of human carcinoma cell lines commensurate with their FAS levels. Since FAS activity in the tissues of humans eating a diet containing. *Med. Sci.* **91**, 6379–6383 (1994).
129. Pizer, E. S. *et al.* Increased fatty acid synthase as a therapeutic target in androgen-independent prostate cancer progression. *Prostate* **47**, 102–110 (2001).
130. Schrijver, E. De, Brusselmans, K., Heyns, W. & Cells, C. RNA Interference-mediated Silencing of the Fatty Acid Synthase Gene Attenuates Growth and Induces Morphological Changes and Apoptosis of LNCaP Prostate Cancer Cells RNA Interference-mediated Silencing of the Fatty Acid Synthase Gene Attenuates Growth and . 3799–3804 (2003).
131. Baron, A., Migita, T., Tang, D. & Loda, M. Fatty acid synthase: A metabolic oncogene in prostate cancer? *J. Cell. Biochem.* **91**, 47–53 (2004).
132. Mounier, C., Bouraoui, L. & Rassart, E. Lipogenesis in cancer progression (review). *Int. J. Oncol.* **45**, 485–492 (2014).
133. Moreira, D. *et al.* import and antiapoptotic activity. **269**, 265–269 (2013).
134. Su, Y.-C. *et al.* Prothymosin- α Overexpression Contributes to the Development of Insulin Resistance. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **100**, 4114–4123 (2015).
135. Zhang, M. *et al.* Increased expression of prothymosin- α , independently or combined with TP53, correlates with poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **7**, 4867–4876 (2014).
136. Tsai, Y.-S. *et al.* Loss of nuclear prothymosin- α expression is associated with disease progression in human superficial bladder cancer. *Virchows Arch.* **464**, 717–724 (2014).
137. Tripathi, S. C. *et al.* Overexpression of prothymosin alpha predicts poor disease outcome in head and neck cancer. *PLoS One* **6**, (2011).

138. Gomez-Marquez, J. *et al.* The expression of prothymosin α gene in T lymphocytes and leukemic lymphoid cells is tied to lymphocyte proliferation. *J. Biol. Chem.* **264**, 8451–8454 (1989).
139. Wu, C. Der, Kuo, Y. S., Wu, H. C. & Lin, C. T. MicroRNA-1 induces apoptosis by targeting prothymosin alpha in nasopharyngeal carcinoma cells. *J. Biomed. Sci.* **18**, 80 (2011).