

TESIS DE MAESTRÍA
PROGRAMA DE DESARROLLO DE CIENCIAS BÁSICAS
ÁREA BIOLOGÍA
SUB-AREA BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

ESTUDIO DE GENES BLANCO
CANDIDATOS DE HSA-MIR-183-5P
INVOLUCRADOS EN LA ADHESIÓN
CELULAR EN CÁNCER DE PRÓSTATA

LIC. CAROLINA OLIVEIRA RIZZO

Orientadora: Dra. María Ana Duhagon

Tribunal:

Dr. Juan Pablo Tosar (presidente)

Dr. Miguel Arocena (vocal)

Dra. Adriana Di Siervi (vocal)

AGRADECIMIENTOS

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

En primer lugar, agradecer a la Dra. María Ana Duhagon por la dedicación y el excelente clima de trabajo. Por darme su confianza y permitirme aprender de su experiencia en esta área que tanto me apasiona.

A los miembros del tribunal que aceptaron leer este trabajo.

A mis compañeros del Laboratorio de Interacciones Moleculares: Beatriz, Martín, Pablo, Leticia, Lucía P, Cecilia, Lorena, Rafael, Santiago C, Santiago R, Flor, Juan, Mercedes, Lucía B y Fabricio, por todas las horas compartidas y la ayuda incondicional en todo momento. Por ser unos excelentes compañeros y amigos, gracias.

Al grupo de José Sotelo por involucrarse en el proyecto y los consejos brindados.

A mis compañeros del Departamento de Genética de la Facultad de Medicina que se involucraron en el proyecto, especialmente al grupo de la Dr. Mercedes Rodríguez Teja por sus contribuciones.

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

A Bruno, por siempre sacarme una sonrisa. Por ser mi compañero de vida, gracias eternas.

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

Finalmente, a PEDECIBA, a la ANII y a CSIC por el apoyo económico.

RESUMEN

El **cáncer de próstata (PrCa)** es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia en el mundo y la tercera causa de muerte por cáncer en Uruguay. Los **microARNs (miRs)** son moléculas endógenas de ARN de aproximadamente 22 nucleótidos, que regulan la expresión de más del 60% de los genes humanos, principalmente mediante la interacción con la región 3'UTR de su ARNs blanco, disminuyendo su estabilidad o traductibilidad. Varias de sus características los posicionan como prometedoras herramientas de uso clínico en PrCa.

Nuestro grupo ha obtenido varias evidencias que apoyan la naturaleza oncogénica de **hsa-miR-183** y su relevancia clínica en PrCa. Los resultados obtenidos sugirieron que miR-183 modula transcritos de proteínas vinculadas a las vías de adhesión focal y de insulina, tal como fue ya reportado en la literatura para otros tejidos.

En este trabajo, nos propusimos determinar el efecto de miR-183 en la **adhesión celular** en PrCa y validar de manera experimental alguno de los genes blanco involucrados. En virtud de los antecedentes descritos, seleccionamos los genes ITGB1, IRS1, FOXO1 y MBNL1 como genes candidatos. Encontramos que la expresión de los transcritos de los cuatro genes seleccionados se ve reducida en tejido tumoral o metastásico respecto al normal y que sus transcritos correlacionan negativamente con la expresión de miR-183, lo cual es consistente con la naturaleza supresora de tumor de estos genes y la existencia de una acción represora de miR-183 sobre ellos en PrCa. El estudio de la respuesta de los genes blanco en ensayos de pérdida y ganancia de función de miR-183 nos permitieron posicionar a **ITGB1** como el principal gen modulado por este miR entre los seleccionados (a nivel de transcrito y de proteína). Los ensayos de genes reporteros con la 3'UTR de ITGB1 sugirieron que miR-183 podría regular la expresión de ITGB1 de manera directa y sitio-específica. Por último, determinamos que miR-183 puede alterar la adhesión celular en PrCa, provocando un cambio a nivel del citoesqueleto y las adhesiones focales, y revelamos la influencia de ITGB1 en el fenotipo observado. Estos hallazgos nos llevan a proponer la hipótesis de que miR-183 pueda promover la transición mesenquimal-ameboidal en PrCa.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
ÍNDICE	6
INTRODUCCIÓN	8
CÁNCER.....	8
CÁNCER DE PRÓSTATA.....	10
<i>Etiología del Cáncer de Próstata</i>	11
<i>Biomarcadores utilizados en Cáncer de Próstata</i>	12
MICROARNs (MiRs).....	14
<i>Generalidades de los microARNs</i>	15
<i>Biogénesis de microARNs</i>	16
<i>microARNs en Cáncer</i>	18
<i>microARNs en Cáncer de Próstata</i>	19
FAMILIA MIR-183	20
<i>Funciones de la familia miR-183</i>	20
<i>Blancos validados de hsa-miR-183-5p</i>	23
<i>Blancos compartidos del clúster hsa-miR-183-96-182</i>	23
ADHESIÓN CELULAR.....	25
ANTECEDENTES	28
OBJETIVOS	34
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
BASES DE DATOS.....	35
CULTIVOS CELULARES	35
<i>Líneas celulares</i>	35
<i>Medio de cultivo comercial Rosswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) de Capricorn</i>	37
<i>Descomplementación del Suero Fetal Bovino</i>	38
<i>Descongelamiento de crioviales</i>	38
<i>Mantenimiento de los cultivos</i>	38
<i>Propagación</i>	38
<i>Congelamiento de células</i>	39
<i>Recuento en cámara de Neubauer</i>	40
TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE MIMIC, INHIBIDOR Y CONTROLES DE HSA-MIR-183-5P	40
CUANTIFICACIÓN DE MIR-183	41
<i>Extracción de ARN</i>	41
<i>Transcripción reversa</i>	42

<i>PCR en tiempo real</i>	42
CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ARNm DE LOS GENES BLANCO SELECCIONADOS	42
<i>Extracción de ARN</i>	42
<i>Transcripción reversa</i>	43
<i>PCR en tiempo real</i>	43
CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE PROTEÍNA DE ITGB1	44
CONSTRUCCIÓN DEL VECTOR REPORTERO CON LA 3'UTR DE ITGB1 WT Y MUT	45
<i>Amplificación de la secuencia salvaje de la 3'UTR de ITGB1</i>	45
<i>Mutagénesis sitio-dirigida del sitio de unión predicho de miR-183</i>	47
<i>Clonación de la secuencia de la 3'UTR de ITGB1 wt y mut en el vector pCR2.1-TOPO</i>	49
<i>Clonación de las secuencias de la 3'UTR de ITGB1 wt y mut en el vector pmiRGLO</i>	52
ENSAYOS DE GENES REPORTEROS CON LA 3'UTR DE ITGB1	54
ENSAYOS DE ADHESIÓN CELULAR	54
<i>Análisis cuantitativo de adhesión</i>	54
<i>Análisis de la morfología celular</i>	55
<i>Análisis de las adhesiones focales</i>	56
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	57
RESULTADOS	58
RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS GENES BLANCOS CANDIDATOS DE HSA-MIR-183-5P	58
VALIDACIÓN DE GENES BLANCO	62
<i>Determinación del efecto de la sobre-expresión e inhibición de miR-183 en los niveles de ARNm de los genes seleccionados</i>	62
<i>Determinación del efecto de la sobre-expresión e inhibición de miR-183 en los niveles de proteína de ITGB1</i>	65
<i>Construcción del plásmido reportero con la 3'UTR salvaje y mutante de ITGB1</i>	69
<i>Ensayos de genes reporteros con los plásmidos pmiRGLO-3'UTR-ITGB1 wt y mut</i>	72
ESTUDIO DEL EFECTO DE MIR-183 EN LA ADHESIÓN CELULAR	73
<i>Ensayo cuantitativo de adhesión celular</i>	73
<i>Análisis de la morfología celular</i>	75
<i>Efecto de miR-183 en las adhesiones focales</i>	76
DISCUSIÓN	80
BIBLIOGRAFÍA	88

INTRODUCCIÓN

Cáncer

En el organismo adulto, las células crecen y se dividen a efectos de mantener la homeostasis tisular. Cuando las células normales envejecen o se dañan, las mismas pueden morir y ser reemplazadas por células nuevas con potencial replicativo, que reestablecen las estructuras del tejido normal. Sin embargo, cuando este proceso ordenado se descontrola y las células viejas o dañadas sobreviven cuando deberían morir, pueden formarse masas celulares que se denominan tumores. “**Cáncer**” es un término general que se utiliza para identificar un amplio número de patologías, caracterizadas por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular (Pierce, Shikes et al. 1978). Esta pérdida de control se da fundamentalmente por alteraciones **genéticas** y **epigenéticas** que inactivan genes supresores de tumores y activan proto-oncogenes (Kent and Mendell 2006). Los tumores surgen como producto de la acumulación de mutaciones espontáneas en las células somáticas que pueden ser promovidas por de la acción de agentes carcinógenos ambientales tales como virus, radiaciones y sustancias químicas (Leon, Guerrero et al. 1987) y/o por la existencia de mutaciones germinales heterocigotas en genes que confieren una predisposición hereditaria al cáncer.

La base de datos *Catalogue Of Somatic Mutation In Cancer* (COSMIC) cataloga hasta el momento 719 genes para proteínas cuyas mutaciones han sido causalmente implicadas en cáncer (Forbes, Beare et al. 2017). Entre los genes más frecuentemente mutados y más estudiados en cáncer, encontramos a los supresores tumorales PTEN y p53, y a los oncogenes MYC y RAS, los cuales codifican proteínas involucradas en la progresión del ciclo celular y la apoptosis (Dang 1999, Hickman, Moroni et al. 2002, Malumbres and Barbacid 2003). Recientemente, la familia de proteínas supresoras tumorales y oncoproteínas se ha ampliado para incluir a genes que codifican ARNs reguladores, entre las cuales se encuentran los microARNs.

En el transcurso del desarrollo de un tumor, las células normales sufren una serie de cambios o alteraciones fenotípicas que resultan ineludibles en el proceso de transformación. Esta serie de alteraciones constituyen lo que se denominan las firmas o sellos distintivos del cáncer (en inglés, **Hallmarks of Cancer**) y proporcionan una base conceptual para la comprensión de la biología del cáncer. Estos pueden resumirse en: capacidad de autosuficiencia en el desarrollo de señales de crecimiento y mantenimiento de señales de proliferación, evasión de las señales anti-proliferativas, activación y adquisición de capacidad invasiva (local y metástasis), desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal, inducción de la angiogénesis y resistencia a la muerte celular (Figura 1) (Hanahan and Weinberg 2011). Estas firmas están siendo continuamente revisadas y ampliadas, en particular integrando la relevancia del medio ambiente tumoral en el desarrollo del cáncer (Hanahan and Coussens 2012).



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

A pesar de los avances en el conocimiento de los cambios moleculares y celulares involucrados en el inicio y progresión del cáncer, no ha habido una reducción sustancial en la proporción de muertes por esta enfermedad. Según la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (IARC), en 2012 hubo 14,1 millones de nuevos casos y 8,2

millones de muertes y se estima que 32,6 millones de personas viven con cáncer (dentro de los 5 años de diagnóstico) en todo el mundo (Ferlay, Shin et al. 2010). El 90% de estas muertes pueden ser atribuidas a enfermedades metastásicas que, por su heterogeneidad y complejidad, difícilmente responden a terapias convencionales como cirugía, radiación y quimioterapia.

Cáncer de próstata

Dentro de los tumores sólidos, el cáncer de próstata (PrCa) es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en el mundo. Aproximadamente 1,1 millones de hombres en todo el mundo fueron diagnosticados con cáncer de próstata en 2012, representando el 15% del total de diagnósticos de cáncer en hombres (Ferlay, Shin et al. 2010). Específicamente en Uruguay, el PrCa constituye el cáncer con mayor incidencia y la tercera causa de muerte por cáncer en hombres, habiendo sido estimado un promedio de 1.444 nuevos casos y 599 muertes por año entre 2010-2014, según datos del Registro Nacional de Cáncer de la Comisión Honoraria de Lucha contra el Cáncer (Figura 2).

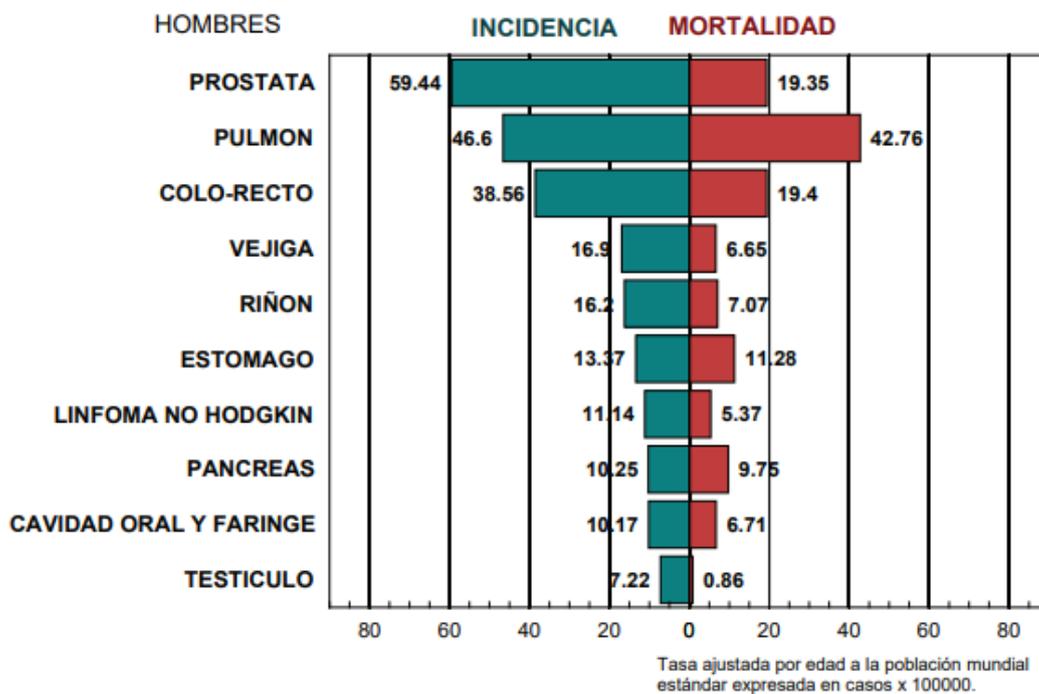


Figura 2. Tasas de incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en hombres en Uruguay (2010 – 2014). Extraído del Registro Nacional de Cáncer (RNC), Comisión Honoraria de la Lucha contra el Cáncer.

Datos más recientes del mismo registro indican que entre el período 2004-2016 existe una tendencia leve pero significativa ($p < 0.05$) al descenso de la mortalidad en Uruguay (Cáncer 2018), la cual podría deberse a la introducción del cribado por PSA, como se ha visto en otros países.

Etiología del Cáncer de Próstata

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

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

Biomarcadores utilizados en Cáncer de Próstata

Los métodos de tamiz que se utilizan actualmente para la detección temprana del PrCa se basan en la identificación de biomarcadores específicos. Estos son moléculas biológicas que pueden asistir en el diagnóstico, pronóstico y predicción 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, poseer un método de cuantificación poco invasivo, sencillo, sensible, robusto y de bajo costo.

Actualmente, el **antígeno específico de próstata (PSA)** es el único marcador que se utiliza de manera generalizada en la clínica para la detección del PrCa. Se trata de una serín-proteasa regulada por andrógenos, que es secretada por el epitelio prostático y el de las glándulas periuretrales, que participa en la licuefacción y liberación de los espermatozoides. El principal problema del PSA es su falta de especificidad, debido a que puede verse incrementado en otros cánceres, así como también en hiperplasia prostática benigna (HPB) y la prostatitis. Adicionalmente, se ha visto que los niveles de PSA aumentan con la edad y por el uso de drogas específicas, como hormonas masculinas. Por otro lado, numerosos factores pueden causar una disminución de los niveles de PSA, tales como inhibidores de la 5- α reductasa, mezclas de hierbas, obesidad, aspirina, estatina y diuréticos tiazídicos. Consecuentemente, los falsos positivos son el principal problema de este test; de hecho se ha estimado que solo el 25-30% de los hombres con altos niveles de PSA en sangre tienen efectivamente PrCa (Esfahani, Ataei et al. 2015, Filella and Foj 2015). Esto conlleva frecuentemente a un sobrediagnóstico, que conduce a un alto número de biopsias innecesarias, que además de la morbilidad para el paciente produce costos de salud innecesarios. Por otro lado, a pesar de que el diagnóstico por imágenes y puntajes histopatológicos de la biopsia (por ejemplo, puntaje de Gleason), junto con el PSA, permiten cierta estratificación del riesgo, no permiten evaluar de manera definitiva el pronóstico individual del paciente (Wang, Cowan et al. 2014).

En los últimos años, se han descrito nuevos biomarcadores de PrCa con el objetivo de aumentar la especificidad de diagnóstico y diferenciar entre los cánceres clínicamente agresivos de aquellos que son indolentes. Alguno de ellos son derivados o isoformas del

PSA, tales como el porcentaje de PSA libre (en inglés, *Free PSA Percent % fPSA*), el Índice de Salud de la Próstata (en inglés, *Prostate Health Index PHI*), como también el panel de cuatro calicreínas (en inglés, *4k score*) (Crawford 2015).

Recientemente, un ARN no codificante ha sido aprobado por la FDA como un biomarcador del PrCa. Se trata del antígeno de cáncer de próstata 3 (en inglés, ***Prostate Cancer Antigen 3* o *PCA3***), el cual se ha demostrado que se encuentra elevado en más del 90% de los hombres con PrCa, no así en la glándula prostática normal o en la hipertrofia prostática benigna (Crawford 2015).

Una mejor comprensión de las bases moleculares del proceso de carcinogénesis del PrCa ha producido un aumento en el número de potenciales herramientas de diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (Bostrom, Bjartell et al. 2015). Por ejemplo, la translocación que produce la fusión entre el gen de la serín-proteasa transmembrana 2 (TMPRSS2) y el oncogén ERG (del homólogo al gen v-ets erythroblastosis E26 del virus de aves), es la variante predominante en el 40-80% de los PrCa y se ha visto que está asociada con la significancia clínica de PrCa (Crawford 2015). Recientemente, esta marca genética junto con el PSA y el PCA3 han sido incorporados en una prueba de diagnóstico, llamada en inglés *Mi Prostate score (MiPS)* (Tomlins, Day et al. 2016). Adicionalmente, la pérdida total o desregulación del gen PTEN se asocia con un mayor grado de Gleason, riesgo de progresión y la recurrencia después de la terapia (Crawford 2015). Más recientemente, se han identificado novedosas mutaciones menos frecuentes en tumores primarios, en los genes SPOP, IDH1, MED12, y FOXA1 (Frank, Nelson et al. 2018). Adicionalmente, en el mismo estudio se observó que en metástasis derivadas de tumores de Cáncer de Próstata Metastásicos Resistentes a la Castración (en inglés, *Metastatic Castration-Resistant Prostate Cancer* o mCRPC) existe un enriquecimiento de mutaciones en genes vinculados a las vías de la señalización de AR (71%), PI3K / PTEN (49%), WNT (18%), ciclo celular (21%) y reparación del ADN (13%) Además, aproximadamente el 21% de los tumores mCRPC tienen HEY1 amplificado, un gen importante de la vía NOTCH.

Debido a la naturaleza genéticamente heterogénea del PrCa, es difícil identificar un único biomarcador adecuado. Adicionalmente, a pesar de que existen muchos

biomarcadores prometedores, ninguno de ellos cumple con todos los criterios necesarios. Por lo tanto, la evidencia actual muestra una tendencia en la utilización de paneles o series de marcadores (denominados *Multiplexing*) para caracterizar los fenotipos heterogéneos del PrCa en la población. Los recientes avances en las tecnologías de alta procesividad (en inglés, *high-throughput technologies*) que permiten la rápida cuantificación y comparación de la expresión de diversas moléculas en un gran número de muestras, han ayudado a ampliar la búsqueda de tales biomarcadores. Varios paneles de genes ya están disponibles en el mercado, aunque la mayoría todavía tienen que ser ampliamente utilizados para verificar su utilidad. Entre ellos, encontramos los paneles Prolaris, Oncotype DX Genomic Prostate Score, Decipher, ExoDx[®] prostate intelliscore, ProMark y ConfirmMDx, los cuales pueden ser utilizados para estimar evolución de la enfermedad además de los parámetros clínicos. Estrategias futuras adicionales incluyen el uso de la información genética de las células tumorales circulantes y el ADN libre de células en la sangre periférica para el diagnóstico inicial, así como también para la toma de decisiones en las etapas posteriores (Bostrom, Bjartell et al. 2015, Kretschmer and Tilki 2017)

MicroARNs (miRs)

En este complejo escenario, los microARNs (miRs) surgen como buenos candidatos para su uso como biomarcadores en cáncer debido a su gran estabilidad en plasma, suero y tejidos fijados y su especificidad y reproducibilidad. De hecho, se ha visto que miRs presentes en el suero (libres de células) son extremadamente resistentes a ribonucleasas y a condiciones fisicoquímicas severas, como niveles extremos de pH y ciclos de congelamiento y descongelamiento, muy probablemente debido a su empaquetamiento en microvesículas (exosomas y cuerpos apoptóticos) o en complejos con proteínas, tales como Ago2, que las protegen de la degradación. Además del plasma y suero, los miRs se han encontrado en otros fluidos corporales, en particular la orina y el semen, que los hacen biomarcadores aún más interesantes para el PrCa. Los miRs pueden detectarse fácilmente y cuantificarse con precisión mediante una variedad de técnicas estándar ampliamente utilizadas, tales como qRT-PCR, microarrays y secuenciación de ARN pequeños (Cannistraci, Di Pace et al. 2014).

Generalidades de los microARNs

Los miRs son pequeñas moléculas de ARN simple hebra, de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, codificados en el genoma de una diversidad de organismos como plantas, animales, hongos y virus. Los genes de miRs pueden estar presentes tanto en secuencias intergénicas, los cuales contienen sus propios elementos reguladores, como en regiones intrónicas, que en este caso se co-transcriben de forma independiente o dependiente del huésped y se escinden mediante eventos de *splicing* alternativo (Lynam-Lennon, Maher et al. 2009, Monteys, Spengler et al. 2010). Es ampliamente aceptado que los miRs son moléculas centrales en la regulación post-transcripcional de la expresión génica, desempeñando una acción fundamentalmente represora (Liu, Zheng et al. 2011). Con algunas excepciones, los miRs regulan la expresión génica mediante la interacción secuencia específica de sus bases nitrogenadas con secuencias complementarias localizadas en la región 3'UTR de ARNm, produciendo la inhibición de la traducción o la desestabilización del ARNm (Costa and Pedroso de Lima 2013). Sin embargo, varios estudios muestran evidencias de que la región codificante e incluso la 5'UTR del ARNm puede ser reconocida y, por lo tanto, también puedan estar involucrados en el mecanismo de regulación por miRs. Por otro parte, se ha visto que los miRs pueden también activar la expresión génica en vez de reprimirla. Específicamente, se ha visto que varios miRs se encuentran sobre-expresados en el núcleo y que activan la transcripción mediante su interacción con la región promotora de genes blanco (Khanmi, Ignacimuthu et al. 2015).

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

decapping, para luego ser degradado por la exonucleasa Xrn1 (Costa and Pedroso de Lima 2013). El efecto represor de un miR sobre un blanco puede ocurrir en todos o algunos de estos procesos, dependiendo probablemente del gen blanco y el contexto celular (Djuranovic, Nahvi et al. 2012, Fabian and Sonenberg 2012). EL modelo más aceptado actualmente es que el miR produzca una inhibición de la traducción del ARNm llevando así a una desprotección y consecuente degradación del ARNm (Wilczynska and Bushell 2015).

Desde la descripción del primer miR en 1993 en *C. elegans* (Lee, Feinbaum et al. 1993), se han identificado aproximadamente 1.000 miRs en el humano, encontrándose entre 500 a más de 10.000 copias de un miR específico por célula (Ragan, Zuker et al. 2011, Pritchard, Cheng et al. 2012). Actualmente, se cuenta con 38589 entradas de precursores de miRs y más de 48885 miRs maduros en 271 especies en el repositorio de secuencias Mirbase (<http://www.mirbase.org/>) y se ha estimado que el 60% de los genes humanos se encuentran bajo la regulación de los miRs (Friedman, Farh et al. 2009).

Biogénesis de microARNs

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

Los genes de los miRs son generalmente transcritos por la ARN polimerasa II para dar lugar a un transcrito primario (pri-miARNs) que presenta una estructura de tallo-horquilla. Luego, los pri-miARNs son clivados por la ribonucleasa Drosha, que forma un complejo con la proteína DGCR8, para dar lugar al precursor del miARN (pre-miARNs) de 60 nucleótidos aproximadamente con estructura de horquilla. Estos son luego exportados al citoplasma por la Exportina XPO5, para ser luego procesados por Dicer, generando miARNs dúplex de aproximadamente 21 – 25 nucleótidos que consisten en una hebra guía (referida como miARN) y la hebra pasajera (referida como miARN*). Luego, una helicasa abre el dúplex de ARN y solamente una de las hebras es cargada en un complejo proteico, denominado miR-RISC, el cual es el responsable de la parte efectora del silenciamiento y está conformado por proteínas de la familia Argonaua.

Este complejo regula la expresión de sus genes blanco mediante represión traduccional y/o degradación del ARNm, valiéndose de una de las hebras del miARN como guía y dependiendo del grado de complementariedad entre ellas (Ohtsuka, Ling et al. 2015).

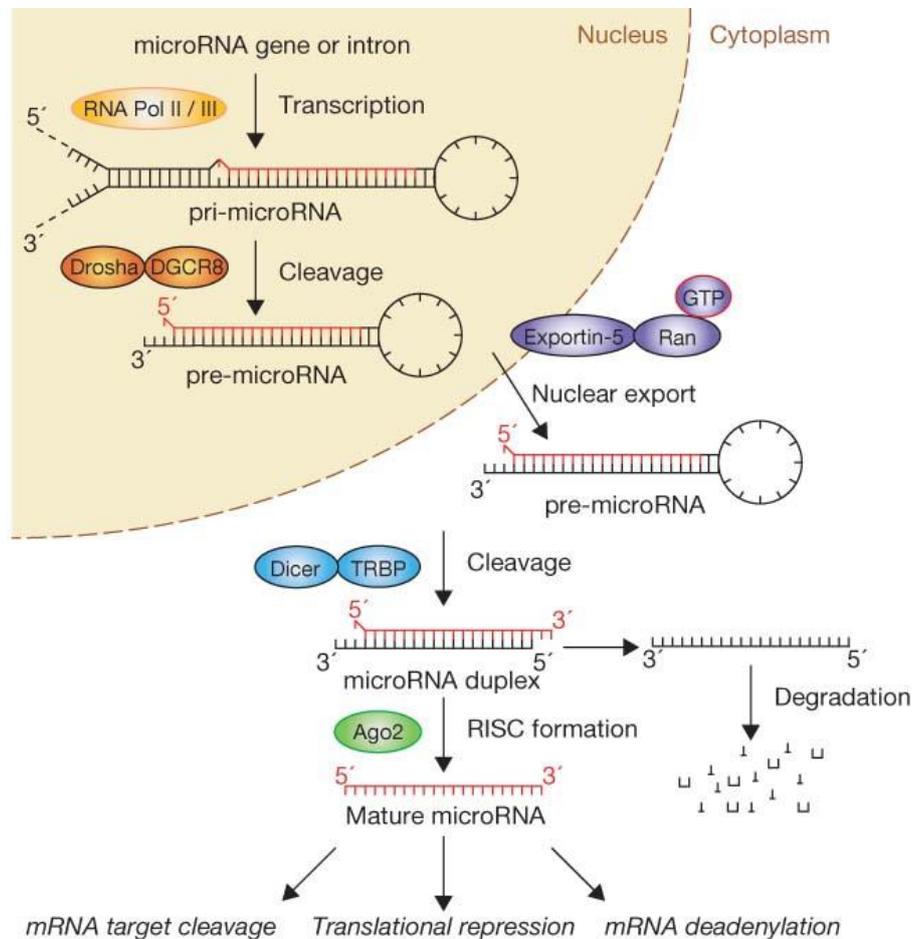


Figura 4. Esquema de la biogénesis de los miRNAs. Extraído de Winter, J., S. Jung, et al. 2009.

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

microARNs en Cáncer

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

Existen una gran cantidad de estudios donde identifican perfiles únicos de expresión de miRs en diferentes tipos de cáncer, así como en diferentes estadios de la enfermedad (Volinia, Calin et al. 2006, Porkka, Pfeiffer et al. 2007, Lawrie, Gal et al. 2008, Lynam-Lennon, Maher et al. 2009). Por otro lado, se ha visto que los perfiles de expresión de miRs de las células del tumor, de células tumorales circulantes, como también del suero y de la orina, presentan un potencial uso clínico en **diagnóstico, pronóstico, predicción y terapia** del cáncer, resultando en prometedores biomarcadores en las diversas etapas de la enfermedad. En este sentido, algunos de los miRs con potenciales usos en terapéutica ya han sido validados en modelos animales e incluso algunos se encuentran en estudios preclínicos en humanos, tales como miR-34 y miR-7 (Gregory, Bracken et al.

2008, Trang, Medina et al. 2010). Las estrategias terapéuticas que involucran a estos se basan en la re-introducción de miRs supresores tumorales que se encuentran disminuidos y/o la inhibición de miRs oncogénicos que se encuentran sobre-expresados (Bader, Brown et al. 2010, Khanmi, Ignacimuthu et al. 2015).

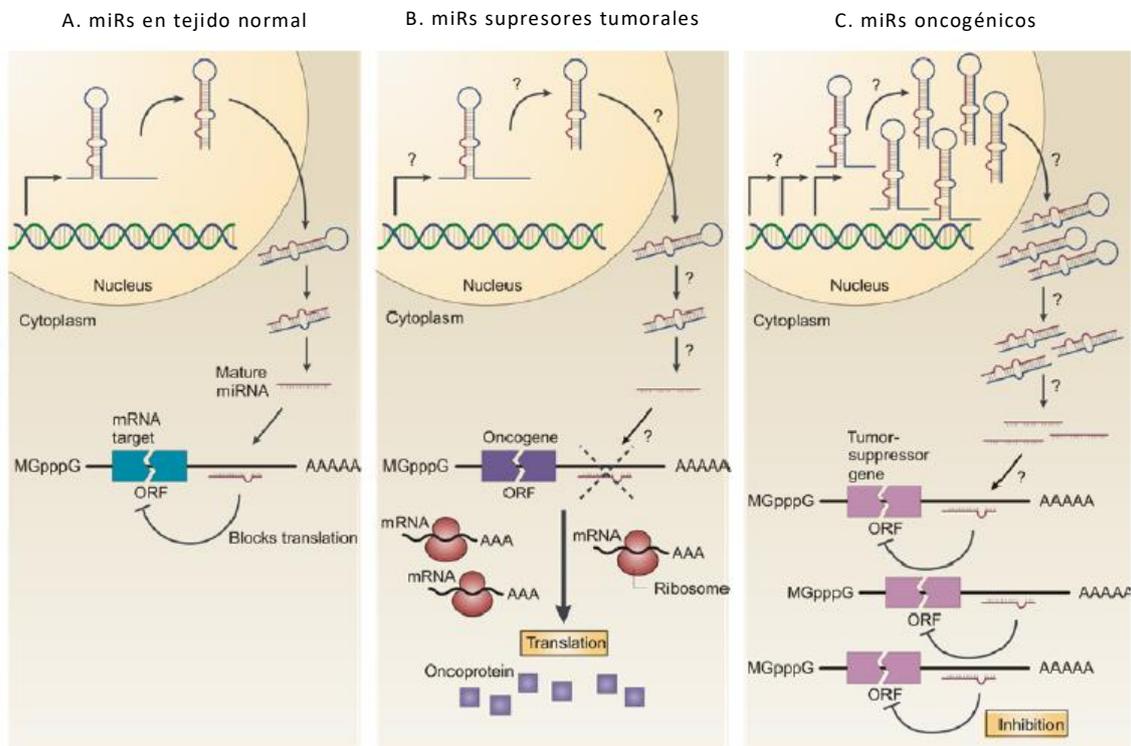


Figura 5. Función de los miRs como supresores tumorales y oncogenes. Extraído de Costa y Pedroso de Lima 2013.

microARNs en Cáncer de Próstata

Específicamente en PrCa, se han reportado varios perfiles de expresión de miRs y todos coinciden en una extensa desregulación global de los mismos. Hasta el momento, se ha asociado la desregulación de miRs en el ciclo celular, la vía de señalización de andrógenos, la resistencia a la apoptosis, la transición epitelio-mesenquimal, la invasión y la metástasis, la transición mesenquimal-epitelial y la diferenciación de células madres de PrCa (Filella and Foj 2017, Sharma and Baruah 2018). En la actualidad, la mayoría de los trabajos se centran en encontrar firmas de miRs que puedan correlacionarse con la clínica, postulándolos así como indicadores de diagnóstico, pronóstico y terapéutica (Srivastava, Goldberger et al. 2013, Cannistraci, Di Pace et al. 2014, Stupolyte, Daniunaite et al. 2016, Lin, Mahon et al. 2017, Souza, Kuasne et al. 2017, Cheng, Plets et

al. 2018). Sin embargo, aunque no ha sido posible aún encontrar una firma distintiva de miRs capaz de diferenciar entre los pacientes sanos y enfermos, se han obtenido resultados alentadores (Leidinger, Hart et al. 2016). Por otro lado, diversos estudios muestran el papel de los miRs como blancos directos para la terapia del PrCa (Cannistraci, Di Pace et al. 2014).

Familia miR-183

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

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

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

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

Funciones de la familia miR-183

Las funciones de los miembros de la familia miR-183 en células normales fueron inicialmente descritas en neuronas sensoriales ciliadas, sugiriéndose que favorece el mantenimiento y longevidad de las mismas (Weeraratne, Amani et al. 2012). Se ha

observado la **sobre-expresión** de miRs del *clúster* en numerosas patologías. Entre ellas encontramos las enfermedades autoinmunes, como en Lupus Eritematoso Sistémico (SLE) (Dai, Zhang et al. 2010, Dai, McReynolds et al. 2013, Yu, Liu et al. 2014); en trastornos neurodegenerativos (Kye, Niederst et al. 2014, Ubhi, Rockenstein et al. 2014); en trastornos psiquiátricos, como desorden hiperactivo y déficit de atención (ADHD) (Sanchez-Mora, Ramos-Quiroga et al. 2013) y depresión (Yu, Liu et al. 2014); como también en diversos tipos de cáncer, tales como de endometrio y de colon (Sarver, French et al. 2009, Myatt, Wang et al. 2010), en gliomas (Jiang, Mao et al. 2010, Song, Liu et al. 2012, Tanaka, Sasayama et al. 2013, Yan, Wang et al. 2014), meduloblastomas (Gokhale, Kunder et al. 2010, Weeraratne, Amani et al. 2012), en cáncer colorectal y carcinoma hepatocelular (HCC) (Sarver, French et al. 2009, Wang, Li et al. 2012, Xu, Qian et al. 2012, Zhou, Zhang et al. 2014), como también en cáncer de ovario, mama y próstata (Guttilla and White 2009, Lin, Dai et al. 2010, Lowery, Miller et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Mihelich, Khramtsova et al. 2011, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Hirata, Ueno et al. 2013, Ueno, Hirata et al. 2013). Podría así especularse que la sobre-expresión del clúster favorece al fenotipo tumoral otorgando a la célula una ventaja en la supervivencia (Weeraratne, Amani et al. 2012). Sin embargo, algunos estudios muestran una actividad supresora tumoral del clúster; por ejemplo, en cáncer de pulmón y mama (Lowery, Miller et al. 2010, Myatt, Wang et al. 2010), en adenocarcinoma ductal pancreático (Zhou, Zhang et al. 2014), en melanoma (Sun, Cheng et al. 2017) y en carcinoma de pulmón de células no pequeñas (Yang, Zheng et al. 2018), lo que sugiere una función contexto y/o tipo celular específico del mismo en la carcinogénesis. Un trabajo reciente realiza un metanálisis de 12 trabajos publicados para determinar el valor pronóstico de miR-183 en cáncer, encontrando que es su expresión incrementada es predictora de baja supervivencia en la mayoría de los tumores (Zhang, Pan et al. 2018).

Otro aspecto relevante sobre el clúster de miR-183 es que se ha descrito a miR-96 como potencial **biomarcador** junto con miR-183 en orina en carcinoma urotelial, observando una correlación con el estadio y el grado patológico (Yamada, Enokida et al. 2011). También se ha propuesto a miR-183 como biomarcador en carcinoma hepatocelular (Liu, Yao et al. 2012) y en PrCa (Souza, Kuasne et al. 2017). Por otro lado, se ha reportado

la sobre-expresión de miR-182 en cáncer de vejiga y su rol potencial como biomarcador en orina, así como su reciente asociación con la progresión del PrCa (Wang, Mao et al. 2008, Guttilla and White 2009, Sarver, French et al. 2009, Hanke, Hoefig et al. 2010, Myatt, Wang et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Hirata, Ueno et al. 2013, Tsuchiyama, Ito et al. 2013, Zhang, Sun et al. 2013). Asimismo, se ha visto a miR-182 asociado a exosomas en suero de pacientes con cáncer de mama y de próstata, aunque no así a miR-183 (Mihelich, Dambal et al. 2016). Por otro lado, en el trabajo de Jung Stephan et al. se muestra que los niveles de miR-183 y miR-205 en orina no correlacionan con la clínica del PrCa, no pudiendo discriminar entre pacientes con y sin la enfermedad, así como también con el grado de Gleason y el PSA sérico, a pesar de su extensa desregulación en el tejido tumoral (Stephan, Jung et al. 2015). De este modo, los autores plantean dudas sobre la capacidad de estos miRs presentes en orina de reemplazar o mejorar los biomarcadores predictivos actualmente utilizados. A pesar de esto, recientemente se ha demostrado que miR-183 es un potencial biomarcador de diagnóstico de PrCa a partir de biopsias (Paziewska, Mikula et al. 2018).

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

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

roles establecidos en la embriogénesis y la carcinogénesis, como β -catenina / TCF4 / LEF y TGF β se ha demostrado que se unen al promotor del *clúster* (Dambal, Shah et al. 2015).

Blancos validados de hsa-miR-183-5p

Hasta el momento se han comunicado varios genes blancos directos de miR-183 en cáncer de endometrio, mama y colon, tales como los genes supresores de tumor *FOXO1* y *EGR1*, que regulan genes involucrados en la apoptosis, el ciclo celular y en la diferenciación celular, respectivamente (Myatt, Wang et al. 2010). Asimismo, se ha demostrado la regulación de miR-183 sobre *PDCD4* en carcinoma hepático (Li, Fu et al. 2010), en carcinoma esofágico escamoso (Ren, Chen et al. 2014), en carcinoma papilar de tiroides (Wei, Song et al. 2015), en la línea celular SW1990 de cáncer de páncreas (Lu, Zheng et al. 2015) y en carcinoma de células escamosas del esófago (Ren, Chen et al. 2014); *EZRIN* en cáncer de pulmón (Wang, Mao et al. 2008), de mama y osteosarcoma (Lowery, Miller et al. 2010, Zhu, Feng et al. 2012). Estudios realizados en situaciones fisiológicas normales muestran que miR-183 puede regular la dinámica de la actina modulando directamente genes como *ITGB1*, *kinesina 2A* (Xu, Witmer et al. 2007, Li, Luna et al. 2010, Chen, Gu et al. 2015) y la vía de señalización de insulina, las integrinas, la de IGF-1, la remodelación de la cromatina (Xu and Wong 2008) y la adipogénesis (Chen, Xiang et al. 2014). Otros genes blanco publicados incluyen a *IDH2* en glioma (Tanaka, Sasayama et al. 2013), *BMI1* en páncreas (Wellner, Schubert et al. 2009), *TIAM1* en ovario y cáncer de colon (Xu, Rajagopal et al. 2010, Li, Liang et al. 2012) y *LPR6* en retinoblastoma (Wang, Wang et al. 2014). En la **próstata**, se ha mostrado que el miR regula a genes vinculados a la homeostasis del Zn (Mihelich, Khramtsova et al. 2011) y a *Dkk3* y *SMAD4* (Ueno, Hirata et al. 2013). Por otro lado, se ha asociado a miR-183 con la sensibilidad al quimioterápico docetaxcel mediante la interacción directa con *SPRY2* (Gao, Lin et al. 2018).

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

Debido a la alta homología de secuencia, los miRs-183, -96 y -182 los mismos comparten la regulación de varios genes. Sin embargo, existen pequeñas diferencias en sus secuencias que quizá han evolucionado con el tiempo para permitir la regulación de ARNm específicos. Además la diferencia en los niveles de expresión de los tres miRs en

diversos tejidos puede también influencia su acción diferencial sobre los genes blancos. En la **Figura 7** se muestra un diagrama de Venn que detalla los ARNm de genes blanco directos de los miembros de la familia miR-183 validados por ensayos de genes reporteros hasta el 2015 (Dambal, Shah et al. 2015). El análisis de enriquecimiento de vías específicas a partir de los genes blanco validados mostró que la familia de miR-183 podría estar involucrada en procesos como la apoptosis, la reparación del ADN, la regulación de la respuesta inmune y el metabolismo energético, procesos que se encuentran directamente relacionados al proceso de carcinogénesis.

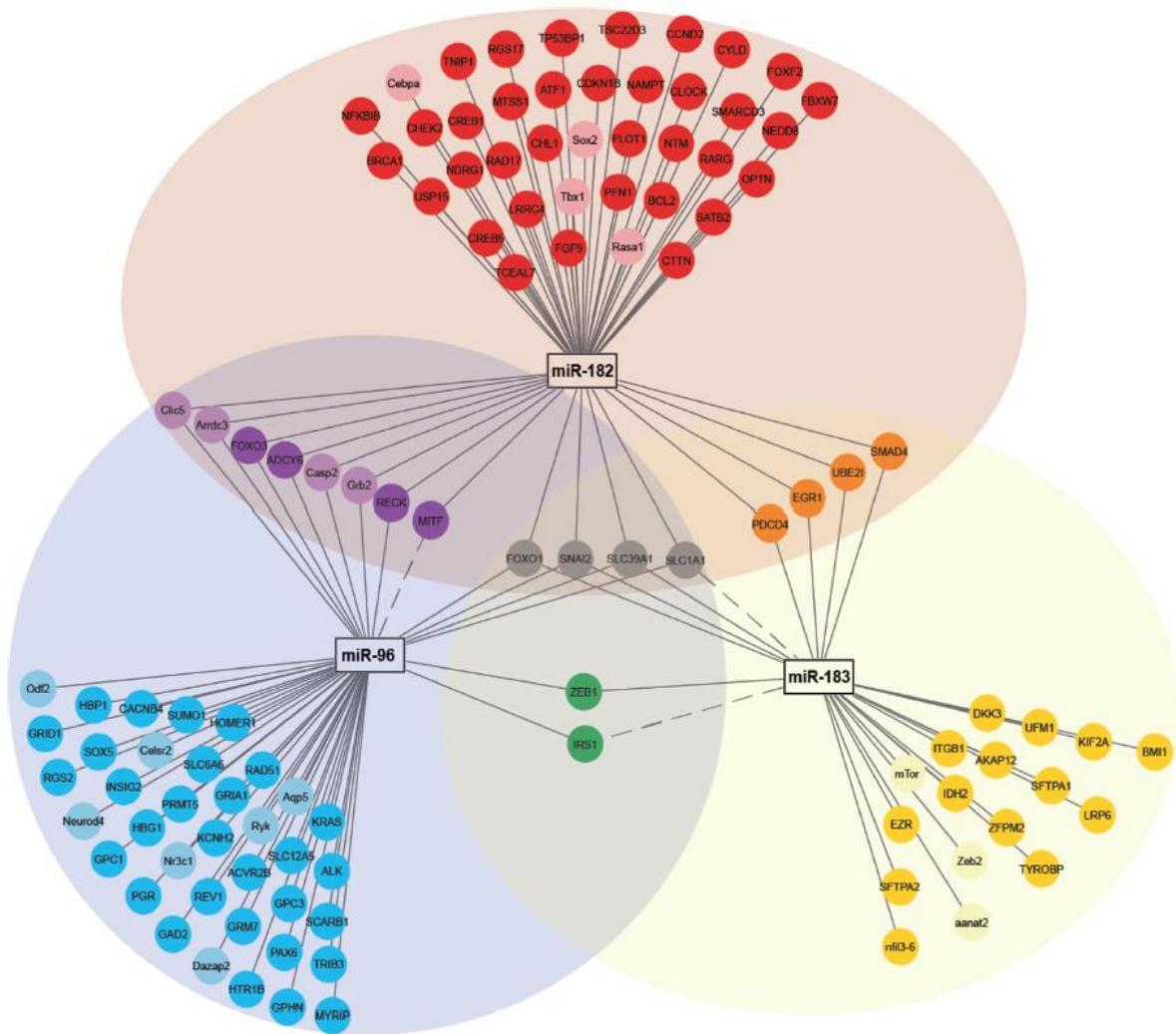


Figura 7. Diagrama de Venn representando la red de regulación de los miR-183, -182 y -96. Se observan que varios genes blanco son compartidos entre los miembros del clúster mientras que otros son únicos de cada uno. Extraído de Dambal, Shah et. al. 2015.

Adhesión celular

El término “**Adhesión Celular**” describe todas las formas de comunicación celular debidas al contacto directo de células o entre las células y la matriz extracelular (MEC). Ambos tipos de adhesión celular son procesos clave durante el desarrollo de los organismos multicelulares, jugando un papel fundamental en la regulación celular, la embriogénesis, la morfogénesis, la fisiología de los tejidos y la regeneración (Loster and Horstkorte 2000). La célula expresa diversas moléculas o receptores de adhesión en su membrana celular que pertenecen principalmente a cuatro familias de proteínas: integrinas, cadherinas, selectinas e inmunoglobulinas. Éstas son típicamente proteínas transmembrana conformadas por tres dominios: un dominio extracelular responsable de la unión del ligando, un dominio transmembrana que ancla la proteína a la membrana celular y un dominio o “cola” citoplasmática capaz de convertir los estímulos provenientes del espacio extracelular en cascadas de señalización intracelular (Zhong and Rescorla 2012).

Las **integrinas** son las principales moléculas de adhesión que median la interacción entre la célula y los componentes de la MEC. Consisten en heterodímeros formados por una de 18 subunidades α y una de ocho subunidades β , dando lugar a un repertorio de 24 integrinas diferentes en mamíferos (Zhong and Rescorla 2012). Cada subunidad β es capaz de unirse a subunidades α específicas. Particularmente, la subunidad $\beta 1$ puede dimerizarse con múltiples subunidades α , desde la $\alpha 1$ hasta la $\alpha 11$ y la αV (Barczyk, Carracedo et al. 2010).

El dominio extracelular de las integrinas es capaz de unirse a componentes específicos de la MEC, tales como colágeno, laminina, trombospondina, vitronectina y fibronectina. Sin embargo, estas moléculas también reconocen muchos otros ligandos fisiológicos y sirven como receptores para venenos de serpientes, virus y otros patógenos. Algunas integrinas se unen solo a un ligando específico mientras que otras exhiben un repertorio más amplio y compartido con otros miembros de la familia. Además, la unión del mismo ligando a diferentes integrinas puede desencadenar una señalización distinta en la célula. Por lo tanto, el patrón de expresión de integrinas en la superficie celular es clave

para determinar el comportamiento celular en respuesta a las influencias ambientales (Hamidi and Ivaska 2018).

La interacción entre el ligando y el dominio extracelular de las integrinas induce un cambio conformacional que desenmascara sitios de unión en su cola citoplásmica, reclutando proteínas que dan como resultado el ensamblaje de estructuras especializadas, denominadas **Adhesiones Focales (AF)**. Estos complejos proteicos están conformados por enzimas con actividad quinasa y proteínas de andamiaje que se unen al citoesqueleto de actina, por lo que son capaces de transducir la fuerza mecánica y las señales bioquímicas tanto del exterior como del interior de la célula para regular importantes aspectos del comportamiento celular, como la adhesión, la supervivencia, la proliferación, la motilidad y la diferenciación (Zhong and Rescorla 2012). De hecho, además de funcionar como radares que detectan cambios en el entorno, permitiendo a las células reaccionar de acuerdo al ambiente extracelular, la señalización intracelular o los cambios en el citoesqueleto pueden regular la afinidad de las integrinas por los componentes de la MEC, lo que permite que las integrinas tengan la capacidad de transducir señales en ambas direcciones (Barczyk, Carracedo et al. 2010). Las integrinas más comunes que en las adhesiones focales son $\alpha 5\beta 1$ (receptor de fibronectina) y $\alpha \nu \beta 3$ (receptor de vitronectina) (Zhong and Rescorla 2012).

La adhesión y la señalización desregulada mediada por las integrinas promueve el desarrollo de muchas enfermedades humanas, incluido el cáncer (Winograd-Katz, Fassler et al. 2014). De hecho, se han implicado en casi todos los pasos de la progresión de esta enfermedad, incluida la iniciación y proliferación, la invasión local y la intravasación en la vasculatura, la supervivencia de las células tumorales circulantes, la extravasación en el sitio secundario y la colonización metastásica del nuevo tejido, por tanto la expresión alterada de las integrinas juega un rol importante en todas las firmas moléculas del cáncer definidas por Hanahan and Weinberg en 2011 (Bianconi, Unsel et al. 2016). En este sentido, han surgido numerosos trabajos donde intentan establecer una asociación entre el patrón de expresión de las integrinas y el pronóstico, supervivencia y respuesta a la terapia (revisado recientemente por Hellyeh Hamidi y Johanna Ivaska en 2018). En este trabajo, sin embargo, los autores señalan que la mayoría de los datos clínicos observados son correlativos, en lugar de dar evidencias

directas de un papel para integrinas específicas en los cánceres indicados. Además, algunos de estos estudios proporcionan datos contradictorios, ya sea dentro del mismo tipo de cáncer o en diferentes tipos de cáncer para la misma molécula de integrina, lo que sugiere que estas moléculas podrían actuar como oncogenes o supresores de tumores dependiendo del tipo de tumor y del estadio del cáncer (Hamidi and Ivaska 2018).

ANTECEDENTES

Nuestro grupo estudia la función de tres miRs en PrCa: hsa-mir-301b, hsa-mir-183-5p y hsa-mir-886-3p; que fueron identificados en un cribado de expresión diferencial de miRs modulados durante la diferenciación de células madre de PrCa, utilizando microarreglos y validación por qRT-PCR. En el marco de la tesis de maestría de Carolina Ottati (Ottati 2014) y en la tesis de grado de Carolina Oliveira (Oliveira-Rizzo 2015) se profundizó en la función de hsa-miR-183-5p en el cáncer de próstata. A continuación, se resumirán los resultados obtenidos por nuestro grupo y que constituyen la base de este trabajo.

En 2010 nuestro grupo analizó muestras de prostatectomías del Hospital Policial y encontró que hsa-miR-183-5p está significativamente sobre-expresado en tejido tumoral, relativo a tejido normal pareado de muestras de prostatectomías radicales (Figura 8-A). Por otro lado, los pacientes con sobre-expresión de hsa-mir-183-5p en tejido tumoral presentaron una tendencia al incremento del grado histopatológico de Gleason (Figura 8-B). Esto apoyó la hipótesis de que miR-183 presentara un rol oncogénico en esta PrCa y que poseyera interés clínico.

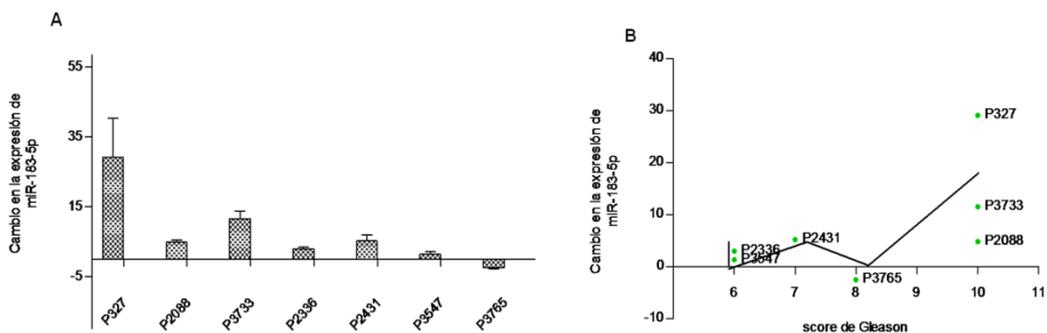


Figura 8. Expresión de miR-183 y variables clínicas en muestras de clínicas de tumores de próstata del Hospital Policial A) Niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en muestras clínicas de tumores de próstata, relativo a las muestras de glándula prostática control. B) Correlación entre nivel de hsa-miR-183-5p y Score de Gleason en muestras de tejido tumoral. Tomado de la tesis de maestría de Carolina Ottati (Ottati 2014).

Más recientemente, cuando se hizo disponible la cohorte del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) de pacientes con adenocarcinoma de próstata (TCGA-PRAD), encontramos un

aumento de la expresión de miR-183 en tejido tumoral respecto al tejido normal adyacente, igual que a los otros miembros del clúster (Figura 9-A). Por otro lado, se encontró una correlación estadísticamente significativa entre el aumento de la expresión de miR-183 y el aumento del grado de Gleason y el PSA preoperatorio (Figura 9-B y -C). Estos datos muestran que miR-183 posee relevancia clínica en PrCa.

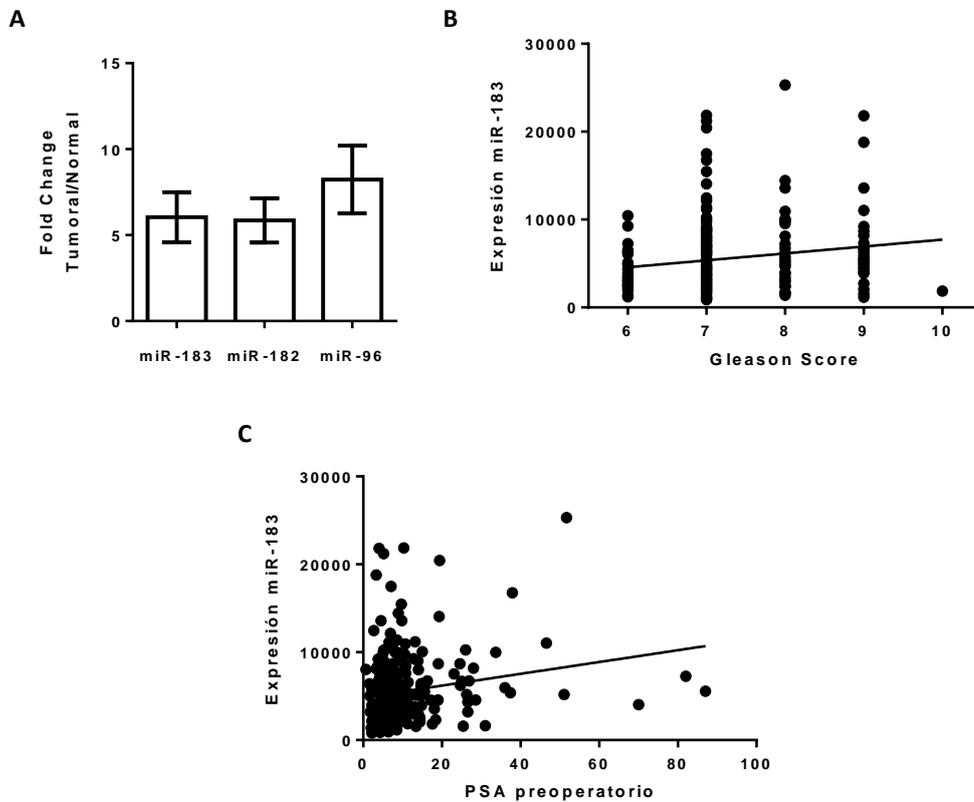


Figura 9. Expresión de miR-183 y variables clínicas en muestras de PrCa de TCGA. A) Cambio en los niveles de miR-183, -182 y -96 en tejido tumoral vs. normal de 50 muestras pareadas de pacientes con PRAD, B) correlación entre los niveles de miR-183 y el grado de Gleason de 255 pacientes con PRAD (Spearman $r = 0,1380$, p -valor= $0,0276$), y C) correlación entre los niveles de miR- y el PSA preoperatorio en suero de 255 pacientes con PRAD (Spearman $r = 0,2005$, p -valor= $0,0013$). Tomado de Ottati et al (Ottati 2015).

Por otro lado, durante la tesis de Ottati, se compararon los perfiles de expresión de miR-183 en líneas celulares de PrCa dependientes, sensibles e independientes de andrógenos (LNCaP, RWPE-2, MDA PCa 2b, 22Rv1, DU145, PC-3), y líneas celulares de próstata no malignas (RWPE-1, WPE-stem y WPE-int). También se analizó el perfil de expresión de miR-183 de tres líneas celulares primarias de pacientes terminales con PrCa tumorigénicas e independientes de andrógenos (denominadas PCSC1, PCSC2 y

PCSC3). Los resultados obtenidos mostraron una tendencia en el aumento de la expresión de miR-183 en las líneas celulares de PrCa, en comparación con la línea normal de próstata. Los niveles más altos (cambios de 20-100 veces) se ven en las líneas LNCaP, MDA-PCa 2b, 22Rv1, DU145 y las tres líneas primarias PCSC1, PCSC2 y PCSC3 (Figura 10).

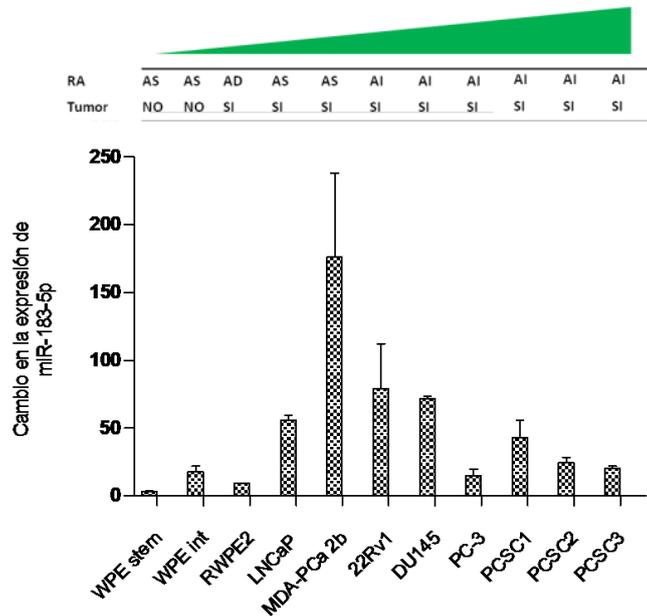


Figura 10. Perfiles de expresión de miR-183 en líneas celulares de PrCa. RA: Respuesta a Andrógenos: AS, andrógeno sensible; AD, andrógeno dependiente; AI, andrógeno independiente; tumor, capacidad de la línea de generar un tumor mediante inoculación por vía subcutánea u ortópica en ratones nude. Las líneas celulares se ordenaron de manera creciente hacia la derecha con respecto al potencial tumorigénico. Tomado de la Tesis de Maestría de Carolina Ottati (Ottati 2014).

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

Con el objetivo de seleccionar un grupo reducido de **genes blancos** candidatos a ser regulados por hsa-miR-183, se realizaron primero estudios bioinformáticos utilizando

diversos algoritmos de predicción de sitios blancos de miRs y meta-análisis de los principales estudios de expresión génica de PrCa publicados hasta 2015, utilizando ONCOMINE (<http://www.oncomine.org/>) (Rhodes, Yu et al. 2004) y del *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org>) (Uhlen, Fagerberg et al. 2015). Además, se realizaron experimentos de expresión génica global utilizando microarreglos de Affymetrix, luego de la transfección transitoria con mimic e inhibidor de miR-183 en las líneas celulares LNCaP y DU145, de manera de identificar también empíricamente posibles genes blanco. El cruzamiento de los resultados obtenidos por los diversos métodos arrojó una lista de 38 genes candidatos a ser blanco de regulación directa de miR-183. El estudio de enriquecimiento de las vías KEGG (KyotoEncyclopedia of Genes and Genomes) identificó 6 vías canónicas en las cuales estaban presentes al menos dos genes de los analizados, y se detallan en la **Tabla 1**. En estos resultados, se hizo evidente que ITGB1 es un gen importante para la definición de muchas de las vías identificadas. Dado que existen diversas clasificaciones de vías de señalización, también utilizamos las de Wikipathway. Como resultado, se identificaron 7 vías canónicas en las cuales estaban presentes al menos dos genes de los analizados, y se detallan en la **Tabla 2**. Puede verse que solo una de ellas resulta compartida con KEGG (citoesqueleto de actina). A su vez, posiciona a IRS1 en primer lugar en el ranking, vinculándolo con la vía de la insulina y la adipogénesis.

Tabla 1. Vías KEGG enriquecidas en los 38 genes seleccionados.

Vías KEGG	Nombre de genes	Datos estadísticos
Regulación del citoesqueleto de actina	EZR CFL2 ITGB1	C=216;O=3;E=0.18;R=16.57;rawP=0.0008;adjP=0.0033
Infección patogénica con E. coli	EZR ITGB1	C=59;O=2;E=0.05;R=40.45;rawP=0.0011;adjP=0.0033
Moléculas de adhesión (CAMs)	CNTNAP2 ITGB1	C=134;O=2;E=0.11;R=17.81;rawP=0.0057;adjP=0.0068
Migración transendotelial en leucocitos	EZR ITGB1	C=118;O=2;E=0.10;R=20.22;rawP=0.0044;adjP=0.0068
Guía de axones	CFL2 ITGB1	C=129;O=2;E=0.11;R=18.50;rawP=0.0053;adjP=0.0068
Vía de señalización de quemoquinas	GNG4 GNB1	C=190;O=2;E=0.16;R=12.56;rawP=0.0111;adjP=0.0111

C: número de genes de referencia en la categoría, O: número de genes en el set de genes y en la categoría, E: número de genes esperados en la categoría, R: proporción de enriquecimiento (O/E), rawP: p valor del test hipergeométrico, y adjP: p valor ajustado por el test de ajuste múltiple. **WebGestalt** (“**WEB**based**GE**ne**SeT**Analysis**Tool**kit”) (Zhang, Kirov et al. 2005). Tomado de Tesis de Maestría de Carolina Ottati (Ottati 2014).

Tabla 2. Vías Wikipathway enriquecidas en los 38 genes seleccionados.

Vías Wikipathway	Nombre de genes	Datos estadísticos
Vía Insulina	IRS1 EGR1	C=160;O=2;E=0.13;R=14.91;rawP=0.0080;adjP=0.0080
Adipogenesis	IRS1 MBNL1	C=133;O=2;E=0.11;R=17.94;rawP=0.0056;adjP=0.0080
Regulación del Calcio en las células cardiacas	GNB1 GNG4	C=148;O=2;E=0.12;R=16.12;rawP=0.0069;adjP=0.0080
Vías de contracción y relajación del miometrio	GNB1 GNG4	C=156;O=2;E=0.13;R=15.30;rawP=0.0076;adjP=0.0080
Vías de señalización de proteínas G	GNB1 GNG4	C=98;O=2;E=0.08;R=24.35;rawP=0.0031;adjP=0.0080
Señalización de estrógenos	GNB1 SIN3A	C=76;O=2;E=0.06;R=31.40;rawP=0.0019;adjP=0.0080
Regulación del citoesqueleto de Actina	EZR CFL2	C=143;O=2;E=0.12;R=16.69;rawP=0.0064;adjP=0.0080

C: número de genes de referencia en la categoría, O: número de genes en el set de genes y en la categoría, E: número de genes esperados en la categoría, R: proporción de enriquecimiento (O/E), rawP: p valor del test hipergeometrico, y adjP: p valor ajustado por el test de ajuste múltiple. Nivel de significación: top10, test estadístico: hipergeometrico, MTC: BH, mínimo: 2 genes. WebGestalt (“WEB-basedGEneSeTAnalysisToolkit”) (Zhang, Kirov et al. 2005). Tomado de Tesis de Maestría de Carolina Ottati (Ottati 2014).

Los análisis de enriquecimiento mostraron que miR-183 modula genes de dos vías principales: la vía de adhesión focal y la vía de la insulina. Hasta el momento, solo hemos analizado el posible efecto de la pérdida y ganancia de función de miR-183 en la proliferación de líneas celulares (Ottati 2014), pero no encontramos ningún cambio, en discrepancia a lo reportado por Ueno (Ueno, Hirata et al. 2013). Por otro lado, hemos validado de manera experimental la interacción directa y sitio específica entre miR-183 y el ARNm del gen PDCD4 (Oliveira-Rizzo 2015), un conocido gen supresor tumoral que inhibe la traducción de ARNms específicos.

En el contexto de esta tesis nos propusimos determinar el efecto de miR-183 en la adhesión celular y validar de manera experimental algunos de los genes blanco involucrados. En virtud de los antecedentes descritos, seleccionamos los genes **ITGB1** (en inglés, *Integrin β 1*), **IRS1** (en inglés, *Insulin Receptor Substrate 1*), **FOXO1** (en inglés, *Forkhead Box O1*) y **MBNL1** (en inglés, *Muscleblind-like1*) para posteriores análisis, puesto que están directa o indirectamente vinculados a la adhesión celular.

Específicamente, ITGB1 es un receptor de membrana que media la interacción de la célula con sustratos específicos de la MEC y que forma parte de las adhesiones focales, por lo que está directamente relacionado a la adhesión celular. Por otro lado, IRS1 es miembro de una familia de proteínas originalmente identificados como involucrados en las vías de insulina, por lo que su estudio se ha centrado predominantemente en su rol en el metabolismo celular. Sin embargo, se ha visto que la expresión ectópica de IRS-1

en células LNCaP produce un descenso de la motilidad celular e incrementa las capacidades de adhesión a fibronectina, colágeno tipo I y laminina (Reiss, Wang et al. 2000, Reiss, Wang et al. 2001). Adicionalmente, se ha visto la interacción entre ITGB1 e IRS-1 en células PC12 y en cultivos primarios de neuronas corticales, lo cual provoca la disminución de la adhesión a colágeno de tipo IV (Wang, Gualco et al. 2007). Incluso, algunas integrinas utilizan a IRS1 como intermediarios en las cascadas de señalización intracelular (Vuori and Ruoslahti 1994, Shaw 2001, Goel, Fornaro et al. 2004). Por lo tanto, IRS1 es un candidato interesante para el estudio de su rol indirecto en la adhesión celular. FOXO1, por otro lado, es un factor de transcripción que se ha visto como el principal efector de las vías de la insulina, por lo que también podría tener un rol indirecto en la adhesión celular. En este sentido, se ha visto que el silenciamiento de FOXO1 incrementa la proliferación, migración e invasión, mientras que la sobre-expresión inhibe la migración y la capacidad de invasión, en células no pequeñas de cáncer de pulmón; y que este efecto se asocia a la regulación de la longitud de las microvellosidades por FOXO1 (Gao, Liu et al. 2018). Adicionalmente, se ha visto que FOXO1 inhibe la movilidad, invasión y metástasis en Carcinoma Hepatocelular (Dong, Zhang et al. 2017). Por último, MBNL1 es una proteína de unión al ARN (en inglés, *RNA binding protein* o RBP) que participa en la regulación del *splicing* de ciertos ARNm. Específicamente, se ha visto que regula el *splicing* alternativo de proteínas que participan Transición Epitelio-Mesenquimal (en inglés, *Ephitelial-Mesenchymal Transition* o EMT) (Venables, Brosseau et al. 2013). Por otro lado, la sobre-expresión de esta proteína promueve la transformación de los fibroblastos a miofibroblastos en modelos de ratones, mediante la regulación de transcritos involucrados en la diferenciación celular y el ensamblaje entre la matriz y el citoesqueleto (Davis, Salomonis et al. 2015). Adicionalmente, se ha descrito su función supresora de tumor en cáncer, inhibiendo la colonización metastásica en cáncer de mama (Fish, Pencheva et al. 2016). Por lo tanto, sería interesante estudiar el rol de MBNL1 en la adhesión celular.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la modulación de la adhesión celular por hsa-miR-183-5p en cáncer de próstata y validar de manera experimental los genes blancos involucrados.

Objetivos específicos

1. Determinar la relevancia clínica de miR-183 y los genes candidatos a ser blancos directos de represión por el este.
2. Validar los genes blancos candidatos.
3. Determinar el efecto de miR-183 en la adhesión celular

MATERIALES Y MÉTODOS

Bases de datos

Los datos disponibles en la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) correspondientes a pacientes con adenocarcinoma de próstata (PRAD) se encuentran disponibles en el UCSC Xena Browser (<https://xena.ucsc.edu/>).

Los datos de expresión de la cohorte de Taylor, et al. 2010 de pacientes con PrCa del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (MSKCC) se encuentran disponibles en el repositorio *Gene Expression Omnibus* (GEO) con el número de acceso GSE21036 (Taylor, Schultz et al. 2010).

Cultivos Celulares

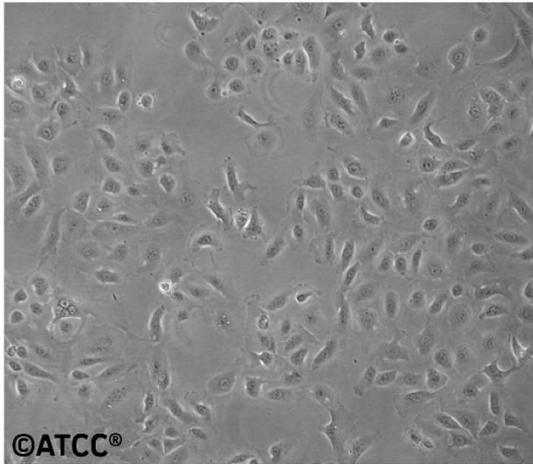
Líneas celulares

La línea celular DU145 ([Figura 11](#)) fue adquirida del repositorio celular de la compañía ATCC (Manassas, Virginia, EEUU). Es una línea celular humana proveniente de un carcinoma de próstata, específicamente de un sitio de metástasis en el cerebro de un hombre adulto caucásico de 69 años. Estas células presentan una morfología de tipo epitelial y son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos. No responden a hormonas y no expresan antígeno prostático (PSA). El análisis citogenético evidencia que sus células son triploides, presentando mayoritariamente 61 y 62 cromosomas (<http://www.iclc.it/listanuova.html>).

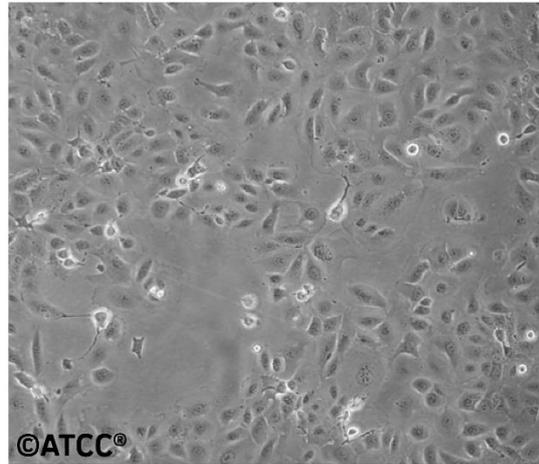
La línea celular LNCaP ([Figura 12](#)) también fue adquirida en ATCC. Es una línea celular humana derivada de un carcinoma de próstata, específicamente de un sitio de metástasis izquierda del nodo linfático de la región supraclavicular. Estas células fueron extraídas en 1977 de un hombre adulto caucásico de 50 años y presentan una morfología de tipo epitelial. Son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos y presentan reactividad positiva para receptor de andrógenos y para receptor de estrógenos, respondiendo a la 5-alfa-dihidrotestosterona con una modulación de su

crecimiento. Se adhieren suavemente al sustrato y acidifican el medio rápidamente. No producen una monocapa uniforme y, generalmente, presentan un crecimiento lento en agrupamientos. El análisis citogenético evidencia que es una línea celular tetraploide donde mayoritariamente las células presentan 84, 86 y 87 cromosomas (<http://www.iclc.it/listanuova.html>).

ATCC Number: **HTB-81**
Designation: **DU145**



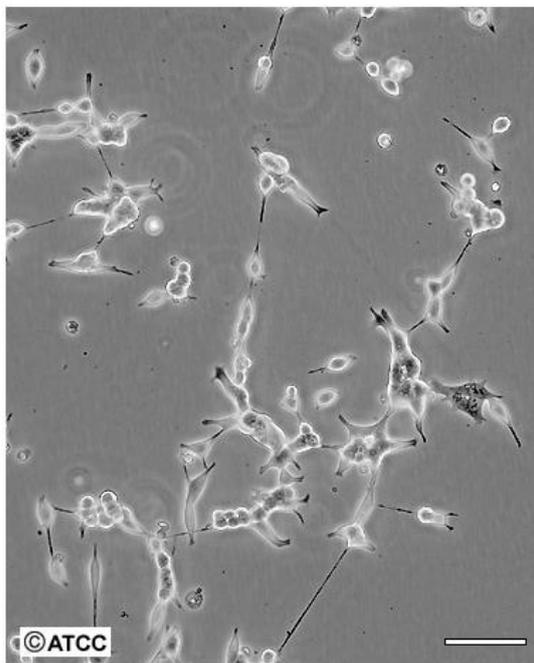
Low Density



High Density

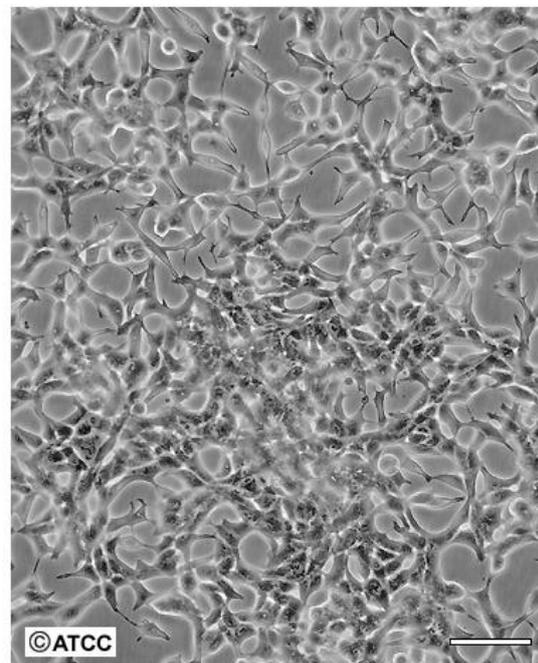
Figura 11. Imagen de microscopía óptica de la línea celular DU145 en alta y baja densidad. Extraído de la página de ATCC.

ATCC Number: **CRL-1740**
Designation: **LNCaP clone FGC**



Low Density

Scale Bar = 100µm



High Density

Scale Bar = 100µm

Figura 12. Imagen de microscopía óptica de la línea celular LNCaP en alta y baja densidad. Extraído de la página de ATCC.

La línea celular PC-3 (**Figura 13**) también fue adquirida en ATCC por Ximena Camacho y gentilmente cedida a nuestro laboratorio. Es una línea celular humana derivada metástasis ósea de un adenocarcinoma de próstata grado IV. Estas células fueron extraídas de un hombre adulto caucásico de 62 años y presentan una morfología de tipo epitelial. Son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos y presentan baja actividad fosfatasa ácida y testosterona-5-alfa reductasa. El análisis citogenético muestra que es una línea celular casi tetraploide, con 62 cromosomas.

ATCC Number: **CRL-1435**
Designation: **PC-3**

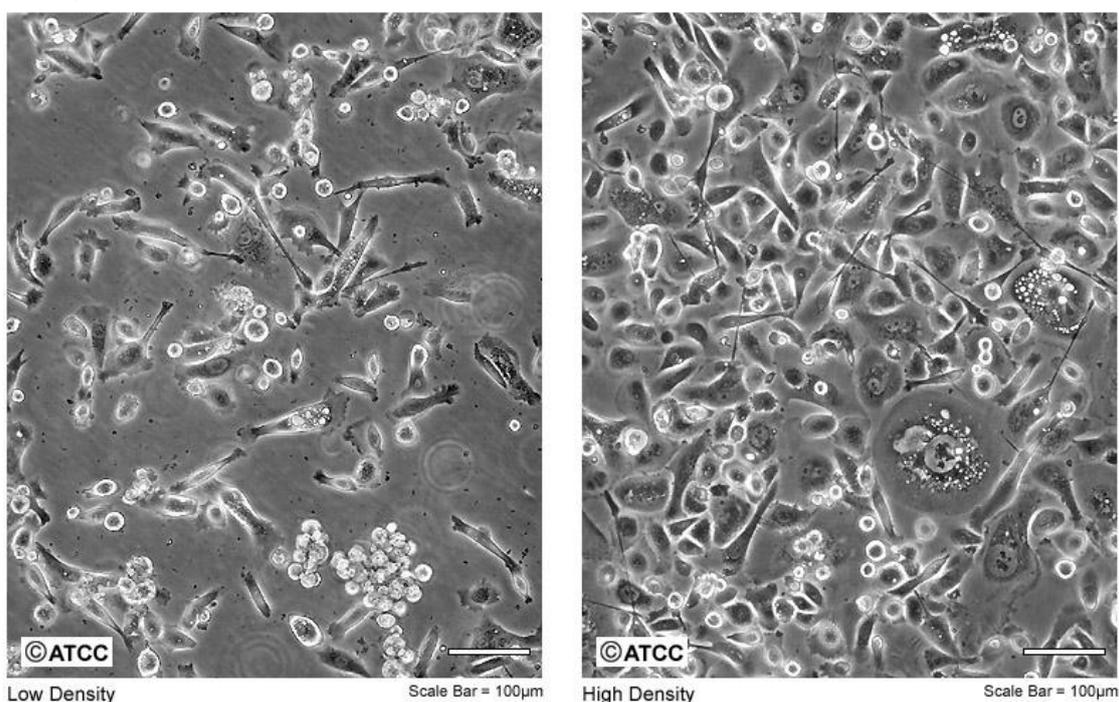


Figura 13. Imagen de microscopía óptica de la línea celular PC-3 en alta y baja densidad. Extraído de la página de ATCC.

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

Todas las líneas celulares utilizadas fueron cultivadas en medio RPMI-1640 obtenido de la compañía Capricorn, suplementado con 10% de Suero fetal Bovino (FBS) descomplementado y con 1% Penicilina y Estreptomina (100U/mL y 100uL/mL,

respectivamente). A este se llamó medio RPMI-1640 completo. Se mantuvo en la heladera a 4°C.

Descomplementación del Suero Fetal Bovino

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

Descongelamiento de crioviales

Las células se encontraban almacenadas en freezer a -140°C en crioviales de 1,4mL en medio RPMI 1640 completo, suplementado con 5% de DMSO y 10% extra de FBS, aproximadamente un millón de células en fase exponencial de crecimiento. El descongelamiento se realizó en baño de agua a 37°C y, rápidamente, el contenido fue trasvasado a tubos estériles de 15mL a los que se le añadió 8mL de medio RPMI 1640 completo precalentado a 37°C. Se centrifugó a 300g durante 5 minutos y luego se removió el medio sobrenadante utilizando una bomba de vacío. Las células fueron resuspendidas en medio fresco RPMI 1640 completo y trasvasado a frascos de cultivo celular estériles de 25cm³. Los frascos se almacenaron horizontalmente en una incubadora a 37°C, a 1 atmósfera de presión, 5% de CO₂ y 95% de humedad.

Mantenimiento de los cultivos

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

Propagación

Una vez que las células alcanzaron un 80% de confluencia aproximadamente, se realizaron sub-cultivos para mantener el cultivo en crecimiento. Brevemente, se aspiró

el medio utilizando una bomba de vacío y se lavó la monocapa de células con 3mL de PBS 1X con el fin de remover trazas de suero que contienen inhibidores de tripsina. Luego, se adicionó una solución de tripsina 0,25% (w/v) y EDTA 0,53 mM en volumen suficiente para cubrir la monocapa celular (entre 0,5mL – 1mL para frascos de 25cm³) y se incubó por 5 a 15 minutos a 37°C. Durante este lapso, se observó bajo el microscopio y, una vez que la monocapa se desprendió completamente, se les adicionó 1,5 volúmenes de medio RPMI 1640 completo para inactivar la tripsina y el EDTA. Se centrifugó a 300g durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante con bomba de vacío y se resuspendieron las células en medio RPMI 1640 completo para deshacer los acúmulos celulares. Finalmente, se tomó una alícuota de la suspensión celular que contiene el número de células que deseamos subcultivar y se llevó a 5mL con medio RPMI 1640 completo en un frasco de cultivo de 25cm³.

Congelamiento de células

Con el fin de generar un stock de células para los ensayos posteriores, se congelaron células en fase exponencial de crecimiento luego del primer pasaje, cuando el cultivo alcanzó un 80% de confluencia, aproximadamente. Para esto, en primera instancia, se verificó por observación bajo el microscopio óptico que el cultivo creció normalmente y se procedió a disociar las células mediante tratamiento con tripsina, tal como se realiza para los sub-cultivos. Luego, se toma una alícuota de la suspensión celular que contenga entre 1 a 2 millones de células y se resuspende en medio de congelamiento, de modo tal que cada vial resulte en un volumen final de 1,4mL aproximadamente. El medio de congelamiento consta de medio RPMI 1640 completo, suplementado con 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO) como agente crioprotector y 10% extra de FBS. Seguidamente, los crioviales se colocan en un recipiente con alcohol isopropílico, que permite la disminución gradual y controlada de la temperatura (1°C/min) y se almacenan en freezer a -80°C. 24 horas después, los crioviales se pasaron a un freezer a -140°C para su almacenamiento prolongado.

Recuento en cámara de Neubauer

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

Transfección transitoria de mimic, inhibidor y controles de hsa-miR-183-5p

Se sembraron diferentes números de células DU145, LNCaP y PC-3 en placas de 24 pocillos, se dejaron adherir hasta el día siguiente y se transfectaron con diferentes concentraciones de los oligonucleótidos detallados en la [Tabla 3](#), pertenecientes al sistema ofrecido por la compañía Dharmacon para el análisis funcional de miRs, conocido como miRIDIAN.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos de ganancia y pérdida de función de miR-183 ofrecidos por la compañía Dharmacon.

Nombre	Descripción
miRIDIAN microRNA Human hsa-miR-183-5p	miRIDIAN microRNA Mimics son oligonucleótidos de ARN doble hebra que fueron diseñados para mimetizar la función del miR maduro endógeno. Presentan la modificación "ON-TARGET" que favorece el reconocimiento de la hebra funcional por el complejo RISC.
miRIDIAN microRNA Negative Control #1	miRIDIAN microRNA Mimic Negative Controls son oligonucleótidos diseñados de manera idéntica a los miRIDIAN microRNA Mimics. El #1 se basa en la secuencia madura de cel-miR-67 (MIMAT0000039), que se ha confirmado que tiene una mínima identidad de secuencia con miRs de humano, ratón y rata. Tampoco se ha visto que produzcan algún efecto en la función de los miRs.
miRIDIAN microRNA Human hsa-miR-183-5p Hairpin Inhibitor	miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors son oligonucleótidos de ARN simple hebra que fueron químicamente modificados para potenciar el secuestro de la hebra madura del miR complementario.

<p>miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Negative Control #1</p>	<p>miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors Negative Controls son oligonucleótidos diseñados de manera idéntica a los miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitors. El #1 se basa en la secuencia madura de cel-miR-67 (MIMAT0000039), que se ha confirmado que tiene una mínima identidad de secuencia con miRs de humano, ratón y rata. Tampoco se ha visto que produzcan algún efecto en la función de los miRs.</p>
---	---

Se utilizó como agente de transfección la **Lipofectamine 3000 (Invitrogen)**, una formulación compuesta por liposomas catiónicos que son capaces de acomplejarse con moléculas de ácido nucleico cargados negativamente, que permite superar la repulsión electrostática de la membrana celular.

Los análisis funcionales se realizaron luego de 48 o 72 horas de la transfección y se detallan a continuación.

Cuantificación de miR-183

Para este ensayo, se sembraron 40.000 y 80.000 células DU145 y PC-3, respectivamente, en placas de 24 pocillos, y se evaluó luego de 72 horas de la transfección con diferentes concentraciones de mimic, inhibidor y controles.

Extracción de ARN

Para la extracción de ARN se utilizó el **kit miRNeasy mini (Qiagen)**, tal como se recomienda. Brevemente, las células transfectadas se homogeneizaron en 700µL de reactivo de lisis QIAzol, que es una solución monofásica de fenol y tiocianato de guanidina diseñada para facilitar la lisis de los tejidos, inhibir las RNAsas y eliminar la mayoría del ADN celular y las proteínas mediante extracción orgánica. Después de la adición de cloroformo, el homogenado se separa en las fases acuosa y orgánica por centrifugación. El ARN se mantiene en la fase acuosa superior, mientras que el ADN y las proteínas se dividen en la interfase y en la fase orgánica inferior. La fase que contiene el ARN se extrae y se le adiciona etanol, que proporciona condiciones de unión apropiadas a todas las moléculas de ARN mayores de 18 nucleótidos. Luego, la solución se añade a la columna RNeasy Mini spin, donde el ARN total se une a la membrana, dejando que el fenol y otros contaminantes se eliminen de manera eficiente. Finalmente, el ARN de alta calidad se eluye en agua libre de RNAsas.

Se cuantificó la cantidad de ARN extraído utilizando un espectrómetro de gota, se evaluó la pureza por la relación 260/280, y se almacenó a -80°C para su uso posterior.

Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó mediante el **kit miScript II RT (Qiagen)** con el **buffer miScript HiSpec**, el cual convierte de manera selectiva miRs maduros y ciertos ARNs nucleares y nucleolares pequeños a cDNA, a partir de una primera etapa de poliadenilación seguida de la transcripción reversa usando cebadores oligo-dT. Se utilizó 1 μg de ARN total extraído y se siguió con el protocolo tal como se recomienda. El cDNA obtenido se almacenó a -20°C .

PCR en tiempo real

La cuantificación de los niveles de miR-183 se realizó con el sistema **QuantiTect SYBR Green PCR (Qiagen)**, utilizando una dilución 1/10 del cDNA, y el equipo Step-One Plus de Applied Biosystems. Se utilizaron los *primers* miScript Primer Assay ofrecidos por la misma compañía, los cuales están previamente testeados para una alta eficiencia de amplificación. Los resultados obtenidos se analizaron por el método de $2^{-\Delta\Delta\text{ct}}$ (Livak and Schmittgen 2001). Para la normalización de los datos se utilizó el gen normalizador U6.

Cuantificación de los niveles de ARNm de los genes blanco seleccionados

Para este ensayo, se sembraron 40.000 y 80.000 células DU145 y PC-3, respectivamente, en placas de 24 pocillos, y se evaluó luego de 72 horas de la transfección con diferentes concentraciones de mimic, inhibidor y controles.

Extracción de ARN

La extracción de ARN se realizó por el método de **TRIzol®**. Brevemente, la monocapa de células fue homogenizada en 500 μL del reactivo de lisis TRIzol®. Este es una solución monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes patentados que disuelven los componentes celulares, manteniendo la integridad del ARN debido a la

inhibición altamente efectiva de la actividad de las RNasas, y que facilita el aislamiento de una variedad de especies de ARN de tamaño molecular variado. Luego del agregado de cloroformo, el homogenado se separa en una capa acuosa superior (que contiene ARN), una interfase y una capa orgánica inferior roja (que contiene el ADN y las proteínas). El ARN se precipita de la capa acuosa con isopropanol, se lava con etanol 75% para eliminar impurezas, y se resuspende en agua libre de RNasas.

Se cuantificó la cantidad ARN extraído utilizando un espectrómetro de gota, se evaluó la pureza por la relación 260/280 y 260/230 y se almacenó a -80°C.

Transcripción reversa

La transcripción reversa se realizó mediante el kit de **SuperScript III (Invitrogen)**, utilizando 100 ng de *random primers* y 300 ng de ARN total, y siguiendo el protocolo tal como lo indica el proveedor.

PCR en tiempo real

La cuantificación de los niveles de ARNm de los genes seleccionados se realizó utilizando el sistema **SensiFast SYBR Hi-Rox (Bioline)** tal como indica el protocolo, con una dilución 1/10 del cDNA y 500nM de los primers, y utilizando el equipo Step-One Plus de Applied Biosystems. Los resultados obtenidos se analizaron por el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen 2001). Para la normalización de la expresión de los genes seleccionados se utilizó el promedio de dos estándares internos: β -actina (BACT) y Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH).

Los *primers* utilizados para ITGB1, IRS1, FOXO1, GAPDH y ACTB fueron diseñados en el marco de la tesis de Ottati et al. 2015 con el sistema de Universal ProbeLibrary de Roche (www.roche-applied-science.com) utilizando el *Probe Finder* (versión 2.49 for Human), tomando en cuenta la variante de *splicing* más representativa en cada tejido (GeneBank) y teniendo en cuenta el *Intron Spanning Assay*. Los *primers* para MBNL1 fueron diseñados en el marco de esta tesis utilizando el programa Primer-BLAST, tomando en cuenta la variante de *splicing* más representativa en el tejido prostático (GTex Portal) (Consortium 2013) lo que nos llevó a diseñar el *primer* directo en el exón 7 y el *primer*

reverso en el exón 11. Las características de estos oligonucleótidos se detallan en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Características de los *primers* utilizados para la cuantificación de los niveles de ARNm de los genes seleccionados.

Gen	Primer	Largo (nt)	Posición	Tm (°C)	GC (%)	Secuencia (5'-3')	Amplicón
ITGB1	Directo	18	977-994	59	50	CGATGCCATCATGCAAGT	71
	Reverso	19	1029-1047	59	58	ACACCAGCAGCCGTGTAAC	
IRS1	Directo	20	3737-3756	60	45	TATGCCAGCATCAGTTTCCA	93
	Reverso	23	3807-3829	59	39	TTTGCTGAGGTCATTTAGGTCTT	
FOXO1	Directo	20	983-1002	60	55	AAGGGTGACAGCAACAGCTC	86
	Reverso	21	1048-1068	59	43	TTCTGCACACGAATGAAGCTTG	
MBNL1	Directo	20	1473-1492	60	60	GAGAGTTCCAGAGGGGGACT	137
	Reverso	19	1591-1609	60	63	GTTCTCCCTGGAGCAACGG	
GADPH	Directo	22	552-573	60	45	CCCCGGTTTCTATAAATTGAGC	127
	Reverso	19	660-678	60	58	CACCTTCCCCTGGGTGTCT	
ACTB	Directo	18	425-442	60	56	CCAACCGCGGAGAAGATGA	97
	Reverso	20	502-521	59	60	CCAGAGGCGTACAGGGATAG	

Se evaluó la eficiencia de amplificación de los *primers* para MBNL1 evaluando la linealidad de los valores de Ct en las diluciones seriadas de las muestras y se calculó con la ecuación:

$$Ef = 10^{\frac{-1}{pendiente}} - 1.$$

Siendo "a" la pendiente de la gráfica Ct vs. Logaritmo de las diluciones seriadas (C₀).

Cuantificación de los niveles de proteína de ITGB1

Para la inmunocitoquímica de ITGB1, 80.000 células DU145 sin transfectar fueron sembradas en un portaobjetos tratado para la adhesión. Pasadas 24 horas, las células fueron fijadas con PFA 4% frío por 10 minutos a temperatura ambiente y se incubaron con un buffer de bloqueo 3% BSA, 2% Glicina y 0,3% Tritón X-100 en PBS 1X por 1 hora a 37°C. Luego, las células se incubaron con una solución conteniendo una dilución 1/200 de anticuerpo monoclonal contra la proteína ITGB1 hecho en ratón (ab24693) en buffer de bloqueo, por 1 hora a 37°C. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío y se incubaron con una solución conteniendo una dilución 1/1000 de un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra conjugado a Alexa Fluor 635 en buffer de bloqueo, con 1/20 de suero normal de cabra (NGS), por 1 hora a 37°C. Se realizaron 3 lavados con

PBS 1X frío y se incubaron con faloidina conjugada a GFP 1/400 en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente, para visualizar el citoesqueleto de actina. Nuevamente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío y las células fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización del núcleo. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío y los preparados fueron montados con el medio de montaje *ProLong Diamond Antifade* (Thermo Scientific). Los preparados fueron visualizados en el microscopio laser confocal ZEISS modelo LSM 800 – AiryScan del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), a 63x de aumento.

Para la citometría, se sembraron 40.000 y 80.000 células DU145 y PC-3, respectivamente, en placas de 24 pocillos, y se transfectaron con 20nM de mimic y control, y 200nM de inhibidor y control. Luego de 72 horas, las células fueron resuspendidas siguiendo el protocolo de disgregación por tripsina convencional y se lavaron con 200uL de PBS-BSA 0,2% mediante centrifugación a 300g por 5 minutos a 4°C. Luego, las células se resuspendieron en 200uL de una solución conteniendo una dilución 1/200 del anticuerpo monoclonal anti-ITGB1 hecho en ratón (ab24693 abcam®) en PBS-BSA 0,2% y se incubaron por 30 min en cámara fría con movimiento. Se realizaron 3 lavados con PBS frío. Luego, las células se resuspendieron en una solución conteniendo una dilución 1/1000 de anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra conjugado a Alexa Fluor 488 y se incubaron por 30 minutos en cámara fría con movimiento. Se realizaron 3 lavados con PBS frío y, finalmente, las células se resuspendieron en 200uL de buffer FAC (PBS-BSA 1% 0,5mM EDTA) para su adquisición en un citómetro de flujo BD Accuri C6 utilizando un láser 488 nm para la excitación y un filtro FL1 (515 ±15 nm) para la emisión.

Construcción del vector reportero con la 3'UTR de ITGB1 wt y mut

Amplificación de la secuencia salvaje de la 3'UTR de ITGB1

La región de la 3'UTR de ITGB1 salvaje se amplificó a partir de ADN genómico humano. Para esto, se diseñaron *primers* (llamados pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 F y R, cuyas características se detallan en la [Tabla 5](#)) teniendo en cuenta los transcritos alternativos

que se expresan en la próstata (ITGB1 1A y 1E) y la ubicación del sitio predicho de unión conservado de miR-183 (Figura 14). A los mismos, se les agregó en los extremos un sitio de reconocimiento para las enzimas XbaI y MspI, para permitir el clonado en el vector reportero, y un sitio de corte interno para la enzima NotI, para facilitar la selección de las colonias. Se utilizó la enzima KAPA HiFi HotStart y el protocolo de ciclado recomendado, con 35 ciclos y un gradiente de temperatura de hibridación entre 60 y 75°C para elegir la que permite la amplificación más eficiente y específica.

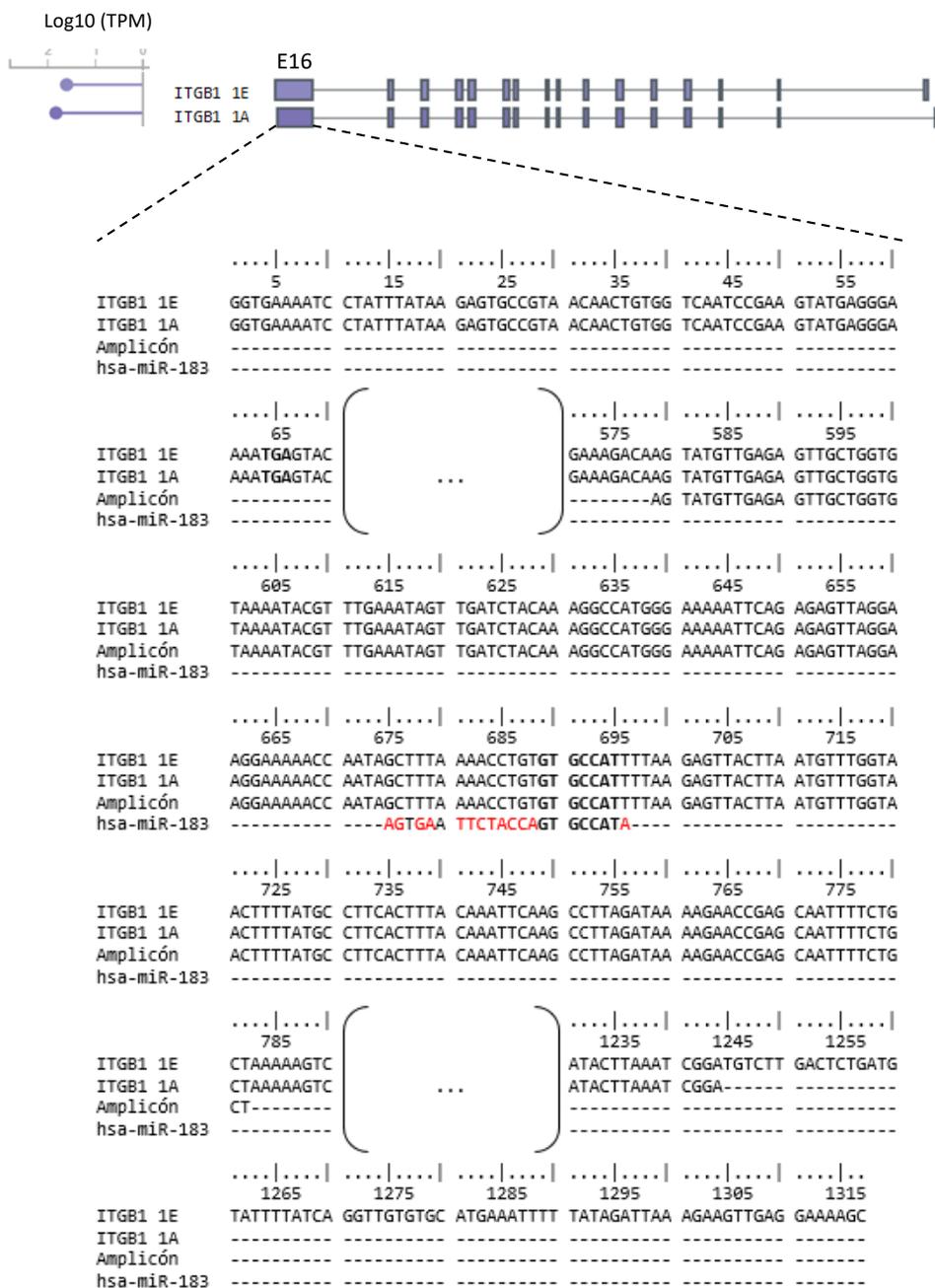


Figura 14. Esquema de la estructura de los transcritos alternativos de ITGB1 que se expresan en la próstata. A) Esquema de los exones que se incluyen en las variantes 1A (ENST00000302278) y 1E (ENST00000396033) de ITGB1 y sus niveles de expresión relativa en la próstata. Extraído y modificado de <https://gtexportal.org/home/gene/ITGB1> (Consortium 2013). B) Alineamiento de las secuencias del último exón de ambas variantes, del amplicón y de la secuencia complementaria de hsa-miR-183-5p, realizado con *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Se resalta en la posición 64-66 el codón stop, en 689-696 la secuencia complementaria a la semilla de miR-183 y en rojo la región no complementaria.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la generación de las secuencias de la 3'UTR de ITGB1 wt y mut. Se señala en rojo el sitio de reconocimiento para la enzima MssI, en verde para NotI y en violeta para XbaI. Se subrayan las mutaciones diseñadas para el sitio de unión predicho de miR-183.

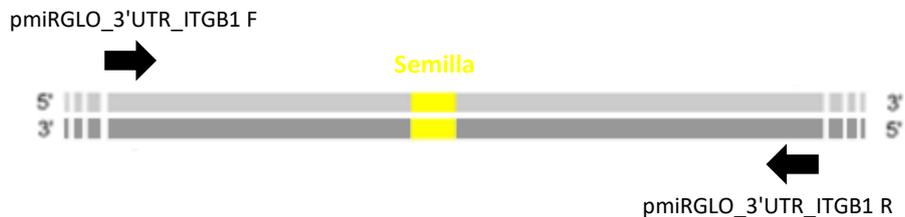
Nombre	Largo (nt)	Tm (°c)	GC (%)	Secuencia (5'-3')
pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 F	39	78,9	51,28	GTTTAAACCGGCCGCAGTATGTTGAGAGTTGCTGGTGT
pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 R	27	65,3	40,74	TCTAGAAGCAGAAAATTGCTCGGTTCT
3'UTR_ITGB1_miR-183mut F	39	71,6	33,33	GCTTTAAAACCTGTGTCCAGTTTTAAGAGTTACTTAATG
3'UTR_ITGB1_miR-183mut R	39	71,6	33,33	CATTAAGTAACTCTTAAAACCTGGACACAGGTTTTAAAGC

Mutagénesis sitio-dirigida del sitio de unión predicho de miR-183

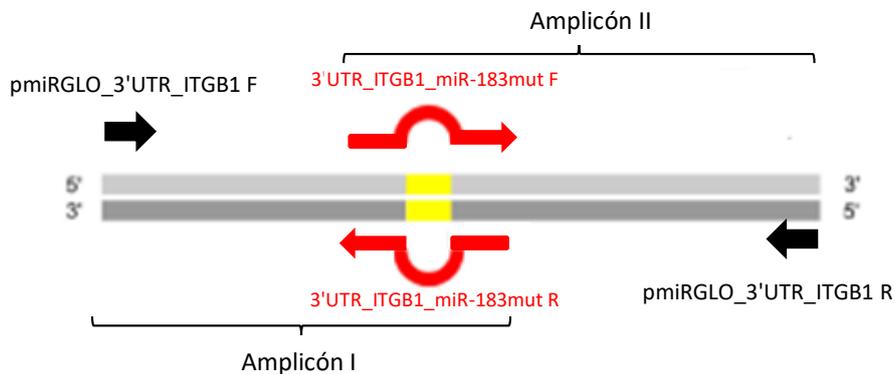
Para realizar la mutagénesis del sitio de unión predicho de miR-183 se utilizó la técnica *Seed Mutagenesis Assembly PCR (SMAP)* que se esquematiza en la **Figura 15** y se detalla a continuación. Todas las reacciones de PCR fueron realizadas con la enzima KAPA HiFi HotStart y con el mismo protocolo de ciclado descrito en el apartado anterior. A partir de la 3'UTR de ITGB1 wt amplificada, se generaron dos amplicones parcialmente solapantes, utilizando *primers* complementarios a la secuencia semilla conteniendo la mutación (llamados 3'UTR_ITGB1_miR-183mut F y R) cuyas características se detallan en la **Tabla 5**. Esto se realizó mediante dos reacciones de PCR utilizando por un lado los *primers* pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 F y 3'UTR_ITGB1_miR-183mut R (amplicón I) y, por otro, los *primers* 3'UTR_ITGB1_miR-183mut F y pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 R (amplicón II). Los amplicones I y II, que tienen un tamaño esperado de 152 y 115pb, respectivamente, se purificaron a partir de gel utilizando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Reaserch) tal como indica el protocolo. Finalmente, el ensamblaje de los amplicones se realizó en dos pasos. En primer lugar, se realizó una reacción de PCR de 15 ciclos, utilizando como molde los amplicones I y II diluïdos 1/50 y 1/100, respectivamente, y en ausencia de *primers*. De esta manera, se reconstituye la secuencia completa de la 3'UTR de ITGB1

extendiendo a partir de los extremos 3' solapantes de los amplicones. Una vez terminada la reacción de extensión, se adiciona una nueva mezcla de PCR conteniendo buffer, dNTPs, Hifi HotStart polimerasa y los *primers* originales (pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 F y R) y se realiza una reacción de PCR que amplifica la secuencia completa de la 3'UTR de ITGB1 con el sitio mutado.

A- Generación del molde



B- Mutación sitio-dirigida



C- Ensamblaje de los amplicones mutados



Figura 15. Esquema de la técnica *Seed Mutagenesis Assembly PCR (SMAP)*. En primer lugar, se genera la región 3'UTR de ITGB1 wt (A) que se va a utilizar como molde para la mutagénesis. Luego, se generan dos amplicones parcialmente solapantes utilizando *primers* que contienen la mutación. El amplicón I se genera con los *primers* pmiRGLO_3'UTR_ITGB F y 3'UTR_ITGB1_miR-183mut R y el amplicón II con los *primers* pmiRGLO_3'UTR_ITGB R y 3'UTR_ITGB1_miR-183mut F (B). Finalmente, los amplicones se ensamblan por extensión de los extremos 3' de las regiones solapantes y se amplifica utilizando los *primers* originales (C).

Clonación de la secuencia de la 3'UTR de ITGB1 wt y mut en el vector pCR2.1-TOPO

Las secuencias salvaje (wt) y mutante (mut) de la 3'UTR de ITGB1 amplificadas se clonaron, en una primera instancia, en el **vector pCR2.1-TOPO** (Figura 16). Este sistema proporciona una estrategia de clonación altamente eficiente para la inserción directa de productos de PCR en un plásmido, sin el requerimiento de una enzima ligasa, procedimientos post-PCR o *primers* que contengan secuencias específicas. Esta estrategia aprovecha la actividad transferasa de ciertas Taq polimerasas que agregan una única adenina (A) en los extremos 3' de los productos de PCR, independientemente del molde. A partir de esto, este vector se diseñó para ser suministrado linealizado con una timidina (T) saliente en los extremos 3' de cada hebra y con la enzima topoisomerasa I unida covalentemente, para permitir la ligación eficiente por complementariedad T-A. La inserción de las secuencia wt y mut de la 3'UTR en este vector facilitaría la digestión con las enzimas de restricción para su posterior clonación en el vector reportero.

Debido a que las secuencias wt y mut de la 3'UTR de ITGB1 fueron amplificadas a partir de una polimerasa de alta fidelidad, se les adicionó adeninas en los extremos 3' a los productos directos de PCR mediante la incubación con 1 unidad de Dream Taq Polimerasa (Thermo Scientific) por tubo a 72°C por 10 minutos. Inmediatamente, se realizó la ligación mediante el protocolo recomendado y utilizando 4 µL del producto de PCR adenilado.

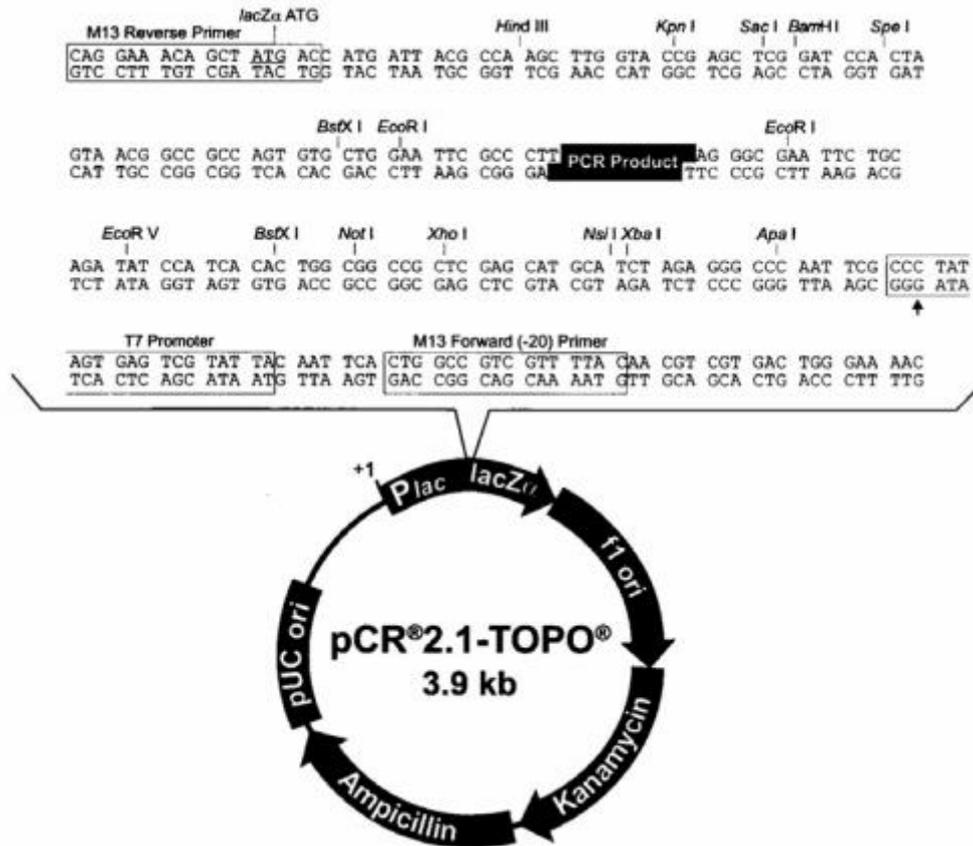


Figura 16. Mapa circular del vector pCR2.1-TOPO. Se detallan: secuencia del promotor y región codificante del gen lacZα (1-547), sitio complementario al *primer* directo M13 (205-221), sitio múltiple de clonado y los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción (234-357), sitio complementario al *primer* reverso M13 (391-406), origen de replicación f1 (548-985), región codificante del gen que otorga resistencia a la kanamicina (1319-2113), a la ampicilina (2131-2991), origen de replicación pUC (3136-3809). Las flechas indican la dirección de la transcripción. Extraído de https://assets.thermofisher.com/TFS.../manuals/topota_man.pdf.

Se realizó la **transformación de bacterias *E. coli* XL-1 químicamente competentes** con los productos de ligación mediante el protocolo de **shock térmico**. Brevemente, 100 µL de las bacterias que se encontraban almacenadas a -80°C se dejaron descongelar en hielo por 10 minutos. Luego, se agregaron los 6 µL totales de la ligación en condiciones de esterilidad y se dejaron 20 minutos en hielo. El shock térmico se dio a 42°C por 90 segundos y luego en hielo por 2 minutos. Finalmente, se adicionaron 4 volúmenes de medio de cultivo Luria Bertani (LB) estéril a temperatura ambiente, se dejó a 37°C durante 1 hora con agitación fuerte y se plaquéó la totalidad de las bacterias en placas de LB Agar con 100 µg/mL de Ampicilina. Las placas se dejaron por 24 horas en estufa a 37°C.

Se realizó un *screening* de las colonias mediante **PCR de colonia**. Brevemente, se picaron 10 colonias por placa, se sumergió cada punta en 100 μ L de agua estéril y se aprovechó para realizar un aislamiento en placas de LB Agar con 100 μ g/mL de Ampicilina. Los tubos se hirvieron a 100°C por 5 minutos, se centrifugaron a 16.000g por 15 minutos a temperatura ambiente y se tomó 10 μ L de molde para la PCR. La reacción se realizó con la enzima Dream Taq Polimerasa (ThermoFisher Scientific) en las condiciones recomendadas y utilizando los primers M13 F y R del vector, que están separados por aproximadamente 200pb. Aquellas colonias que contienen el inserto deberían amplificar un producto de aproximadamente 400pb. Se analizó el tamaño de los productos amplificados por electroforesis en gel de agarosa 2% en buffer TAE 1X, utilizando BrEt para su visualización.

Se realizó la extracción y purificación de los plásmidos con el inserto, a partir de las colonias aisladas, mediante un protocolo casero de **Miniprep de Lisis Alcalina**. Brevemente, se hicieron crecer las colonias hasta fase estacionaria en 1,5mL de LB con 100 μ g/mL de Ampicilina. Las bacterias se centrifugaron a 12.000g por 30 segundos y se resuspendieron agitando con un mezclador de tipo Vortex en 1mL de buffer SET, que contiene 20% sacarosa, 50mM Tris HCl pH=4,6 y 6,5mM EDTA, el cual debilita la pared celular de las bacterias. Luego, se centrifugó a 12.000g por 1 minuto, se resuspendió el pellet en 150 μ L de buffer SET y se agregó 5 μ L de RNasa A agitando con un mezclador de tipo Vortex. Luego, se agregó 350 μ L de Mezcla Lítica, que contiene 1% SDS y 0,2N NaOH, y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos. Este paso solubiliza la membrana celular, degrada el ARN y desnaturaliza el ADN genómico y plasmídico, así como también las proteínas. Pasado el tiempo, se agregaron 250 μ L de NaAc 3M pH=4,8, se agitó levemente por inversión y se dejó en hielo por 30 minutos. Esto permite la rápida renaturalización del ADN plasmídico, que queda en suspensión, mientras que el ADN genómico debido a su gran tamaño precipita junto con el SDS, lípidos y proteínas. Finalizado el tiempo, se separó el ADN plasmídico de los restos celulares mediante centrifugación a 12.000g por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante, que contiene el ADN plasmídico en suspensión se retiró y se precipitó mediante el agregado de un volumen de isopropanol por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó a 12.000 g por 20 minutos a temperatura ambiente, se lavó el pellet con EtOH 70% y

centrifugación a 12.000g por 5 minutos, se dejó secar al aire y se resuspendió en 40 μ L de agua estéril.

Se cuantificó la cantidad ADN plasmídico extraído utilizando un espectrómetro de gota y se evaluó la pureza por la relación 260/280.

Clonación de las secuencias de la 3'UTR de ITGB1 wt y mut en el vector pmiRGLO

El **vector pmiRGLO** (Figura 17) que ofrece Promega fue diseñado para cuantificar la actividad de los miR mediante la inserción de sus sitios blancos en el extremo 3'UTR del gen de luciferasa de una luciérnaga ("*Firefly*" de *Photinus pyralis*). Por otro lado, presenta en el mismo esqueleto el gen que codifica la luciferasa de un cnidario ("*Renilla*" de *Renilla reniforme*) fusionada con el gen que le otorga resistencia a la neomicina (*hRluc-neo*), que actúa como normalizador de la transfección y permite la selección en células de mamífero. La expresión reducida de la luciferasa de *firefly* indica que el miR endógeno o exógeno se ha unido a la secuencia blanco clonada en el vector.

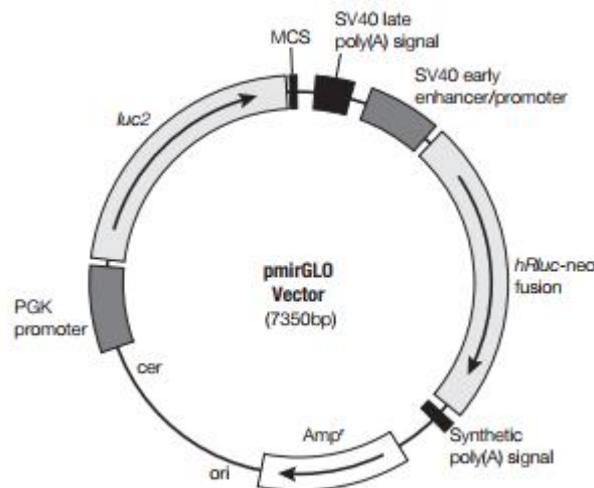


Figura 17. Mapa circular del vector pmiRGLO. Se detallan: señal poli (A) tardía SV40 (106-327); potenciador temprano SV40/promotor (426-844); región codificadora de la proteína de fusión *hRluc-neo* (889-2664); poli (A) sintética (2728-2776); región codificante para β -lactamasa (Amp^r) (3037-3897); origen de replicación derivado de plásmido Co/E1 (4052-4088); promotor fosfoglicerato quinasa de humano (5094-5609); gen reportero *luc2* (5645-7297); sitio de múltiple clonado (7306-7350). Las flechas dentro de *luc2*, *hRluc-neo* fusión y el gen Amp^r indican la dirección de la transcripción. Tomado de Promega (www.promega.com/vectors/).

Con el fin de clonar las regiones 3'UTR de ITGB1 wt y mut, los plásmidos obtenidos fueron sometidos a digestión por las enzimas de restricción XbaI y MspI, que generan extremos cohesivos y romos, respectivamente, junto con el vector vacío pmiRGLO. Para esto, se incubaron 10 µg de plásmido con 2 µL de cada enzima (correspondiente a 2U/µg y 1U/µg de XbaI y MspI, respectivamente) en buffer B a 37°C *over night*, según las condiciones recomendadas por la herramienta *DoubleDigest Calculator—Thermo Scientific* disponible *online*. Los productos de la digestión fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, utilizando BrEt para su visualización. Los insertos liberados correspondientes a las 3'UTR de ITGB1 wt y mut, junto con el vector pmiRGLO linealizado, fueron purificados del gel utilizando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery (Zymo Research).

A fin de evitar la religación del vector pmiRGLO linealizado, 1 µg del mismo fue defosforilado utilizando la enzima FastA Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific), tal como indica el protocolo. Luego, las 3'UTR de ITGB1 wt y mut digeridas se ligaron en 100 ng del vector pmiRGLO linealizado y defosforilado (en una relación equimolar 1:1) utilizando el protocolo para extremos romos de la enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific).

Finalmente, los productos de la ligación se transformaron en bacterias *E. coli* XL-1 siguiendo el protocolo de shock térmico descrito anteriormente y se plaquearon en LB Agar con 100 µg/mL de Ampicilina. Se realizó un *screening* de 10 colonias por placa mediante PCR de colonia utilizando los *primers* pmiRGLO_3'UTR_ITGB1 F y R y se purificaron los plásmidos conteniendo el inserto a partir de colonias aisladas mediante el protocolo casero de Miniprep de Lisis Alcalina, descrito anteriormente.

Se cuantificó la cantidad plásmido extraído utilizando un espectrómetro de gota, se evaluó la pureza por la relación 260/280 y se analizó la composición de la mezcla por electroforesis en gel de agarosa 1% en buffer TAE 1X, utilizando BrEt para su visualización.

Los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar por secuenciación automática de Sanger a la compañía MacroGen (Korea) para confirmar su identidad, solicitando el uso de un primer complementario a la secuencia del gen *luc2*, cuya secuencia es 5'-

GCAAGATCGCCGTGTAATTC-3', y que se encuentra aproximadamente a unas 130 bases de distancia del sitio de unión predicho de miR-183.

Se realizó el análisis de las secuencias mediante el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Tom Hall, Isis Pharmaceuticals).

Ensayos de genes reporteros con la 3'UTR de ITGB1

Para este ensayo, se sembraron 80.000 células DU145 en placa de 24 pocillos y se co-transfectaron 125 ng del plásmido pmiRGLO-3'UTR-ITGB1 wt y mut junto con 5nM de mimic y control, y se evaluó a 48 horas después de la transfección.

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

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

Ensayos de adhesión celular

Para estos ensayos, se sembraron 40.000 células DU145 en placas de 24 pocillos, y se evaluó luego de 72 horas de la transfección con 20nM de mimic y control.

Análisis cuantitativo de adhesión

Las células transfectadas fueron resuspendidas siguiendo el protocolo de disgregación mediante tripsina convencional y se sembraron 20 pocillos con 20.000 células cada uno en una placa de 96, con el fin de evaluar 5 condiciones con 4 réplicas técnicas. Luego de 30, 60, 90 y 120 minutos, las células no adheridas se removieron mediante 3 lavados con medio precalentado fresco y las células remanentes se cuantificaron utilizando el kit *Cell*

Titer GLO de Promega, que mide ATP celular. Los pocillos sin lavar fueron cuantificados de la misma manera para obtener el valor de 100% de células sembradas. El porcentaje de adhesión se calculó como la relación entre la emisión de luminiscencia de las células que quedaron adheridas y la de las células totales sembradas.

Con el fin de evaluar el rol de ITGB1 en el fenotipo observado, se bloqueó la función de ITGB1 con un anticuerpo específico y se realizó el ensayo de adhesión cuantitativo en las mismas condiciones descritas anteriormente. Brevemente, células sin transfectar fueron resuspendidas siguiendo el protocolo de disgregación mediante tripsina convencional. A partir de esto, se prepararon dos soluciones con una concentración de 400.000 células/mL en PBS-BSA 0,2% y se adicionó en una de ellas una dilución 1/200 (5 µg/mL) de anticuerpo IgG1 anti-ITGB1 hecho en ratón (ab24693) y en la otra una dilución 1/20 (5 µg/mL) de anticuerpo IgG1 anti-Twist hecho en ratón (ab50887). Se incubó por 30 minutos a 37°C con agitación gentil y volvieron a resuspender en medio de cultivo RPMI 1640 completo. Finalmente, se sembraron 20.000 células por pocillo en una placa de 96 y se realizó el ensayo cuantitativo siguiendo el mismo protocolo detallado anteriormente.

Análisis de la morfología celular

Las células transfectadas fueron resuspendidas siguiendo el protocolo de disgregación mediante tripsina y se sembraron en portaobjetos de vidrio tratados para la adhesión. Luego de 3 horas, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X y fijadas con PFA 4% frío por 15 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron permeabilizadas y bloqueadas con una solución de 3% BSA, 2% Glicina y 0,3% Tritón X-100 en PBS 1X por 1 hora a 37°C. Para visualizar el citoesqueleto de actina, las células fueron teñidas con faloidina conjugada a GFP diluida 1/400 en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente. Luego, se volvieron a lavar tres veces con PBS 1X y los preparados fueron montados utilizando un medio de montaje casero compuesto por 90% glicerol Tris HCl 0,05M pH=8. Se tomaron fotos de 6 campos representativos por condición con un microscopio de Epifluorescencia Olympus IX81 de la Facultad de Medicina.

Las fotos fueron procesadas de forma automática utilizando el programa ImageJ 1.49v de libre acceso (<http://imagej.nih.gov/ij/>). El procesamiento implicó la aplicación de filtros que permitió al programa identificar de forma automática el borde de las células y cuantificar ciertos parámetros morfológicos como el área, la relación entre los radios menor y mayor, la convexidad y circularidad de las mismas.

Análisis de las adhesiones focales

Las células fueron sembradas y transfectadas en placas de 24 conteniendo un cubreobjetos de vidrio circular de 2mm de diámetro. Luego de 72 horas de la transfección, las células fueron lavadas 3 veces con PBS 1X frío y fijadas con PFA 4% durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, las células fueron permeabilizadas y bloqueadas con el buffer de bloqueo que contiene 3% BSA, 2% Glicina y 0,3% Tritón X-100 en PBS 1X por 1 hora a 37°C. Para visualizar las adhesiones focales, las células se incubaron con una solución conteniendo una dilución 1/100 de un anticuerpo monoclonal contra la proteína vinculina hecho en ratón (Ab18058 clon SPM22) en buffer de bloqueo, por 1 hora a 37°C. Pasado el tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS 1X y se incubaron con una solución conteniendo una dilución 1/500 de un anticuerpo secundario anti-ratón hecho en cabra conjugado a Alexa Fluor 635 en buffer de bloqueo, con 1/20 de suero normal de cabra (NGS). Luego, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío y se incubaron con faloidina conjugada a GFP 1/400 en PBS 1X por 30 minutos a temperatura ambiente, para visualizar el citoesqueleto de actina. Nuevamente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío y las células fueron teñidas con 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para la visualización del núcleo. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS 1X frío y los cubreobjetos fueron retirados de la placa y montados en un portaobjetos con el medio de montaje *ProLong Diamond Antifade* (Thermo Scientific).

Los preparados fueron visualizados en el microscopio confocal espectral Leica modelo TCS SP5 II de la Facultad de Medicina o en el microscopio laser confocal ZEISS modelo LSM 800 – AiryScan del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), a 63x de aumento.

Análisis Estadísticos

A menos que se indique, todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y las variables correspondientes se expresan como valor promedio \pm desviación estándar. Se utilizó el test no paramétrico de Spearman para probar la significancia estadística de las correlaciones y el test t pareado o no pareado (indicado en cada caso) para los ensayos funcionales. En todos los casos se utilizó del paquete estadístico GraphPad Prism 6.01. Los valores de significancia obtenidos se expresaron mediante el p-valor (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ y **** $p < 0,0001$).

RESULTADOS

Relevancia clínica de los genes blancos candidatos de hsa-mir-183-5p

Debido a que la base de datos *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) se actualizó luego de haber comenzado este trabajo, incorporando más pacientes así como más datos clínicos de los mismos, repetimos los análisis previos e incorporamos nuevos. Al igual que en los análisis anteriores, se encontró que hsa-miR-183-5p está significativamente sobreexpresado en tejido tumoral de pacientes con adenocarcinoma de próstata (PRAD) respecto al tejido normal y que existe una correlación entre el aumento de la expresión de este miR y el grado de Gleason. Como novedad encontramos una asociación significativa entre el aumento de la expresión de este miR y el valor T patológico ($p < 0,0001$) y la recurrencia bioquímica ($p = 0,0404$) (Figura 18), confirmando que este miR tiene relevancia en la clínica del PrCa.

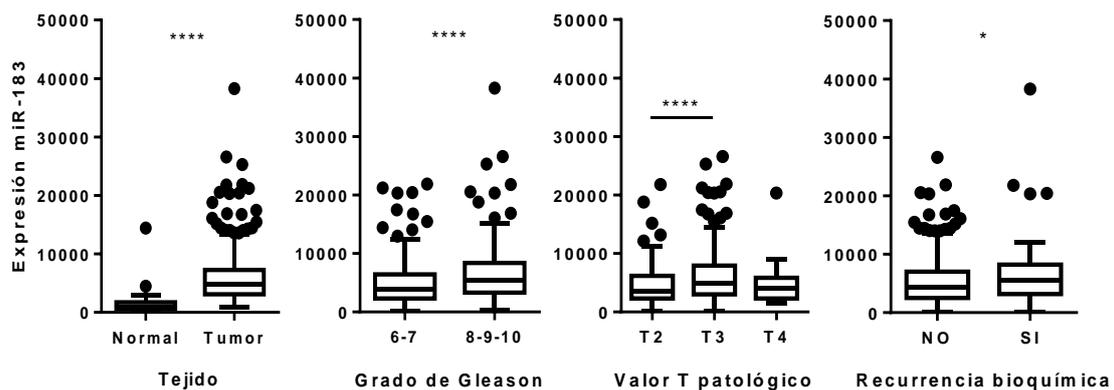


Figura 18. La expresión de miR-183 se asocia a parámetros clínicos del PrCa en la cohorte de PRAD-TCGA. Se muestran los niveles de expresión hsa-miR-183 A) en tejido normal (N=52) y tumoral (N=491), B) agrupados según el Grado de Gleason (6-7 N=334 y 8-9-10 N=210), C) agrupados según el valor T patológico (T2 N=215, T3 N=310 y T4 N=12) y D) agrupados según la recurrencia bioquímica (NO N=52, SI N=491). Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test no paramétrico Mann Whitney. P-valor **** $< 0,0001$, * = 0,0404.

Con el fin de ampliar nuestro estudio a otro set de datos de expresión génica de PrCa, analizamos los datos disponibles del trabajo de Taylor et al. 2010, el cual cuenta con datos de expresión génica de microarreglos de muestras de tejido normal, tumor primario y metástasis, así como también de líneas celulares de PrCa (Taylor, Schultz et al. 2010). Observamos que de hsa-miR-183-5p también se encuentra aumentado en tejido tumoral y metastásico respecto al tejido prostático normal (Figura 19), consistente con un rol oncogénico del miR en PrCa.

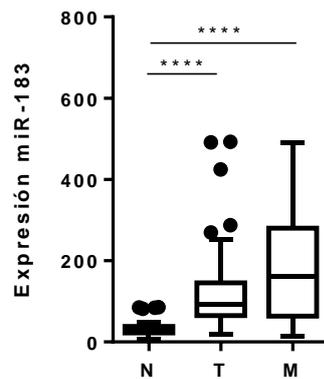


Figura 19. MiR-183 tiene un perfil de expresión oncogénico en la cohorte de Taylor et al. 2010. Se muestran los niveles de expresión en N= tejido normal (N= 28), T= tumor primario (N=99), M= tejido metastásico (N=14). Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test no paramétrico Mann Whitney. P-valor **** < 0,0001.

Por otro lado, se analizaron los datos de expresión de ARNm de los 4 genes seleccionados en ambas cohortes y se encontró que todos están significativamente disminuidos en tejido tumoral respecto al normal en PRAD-TCGA (Figura 20-A) e IRS1 y MBNL1 en Taylor. Asimismo, en los datos de Taylor et al 2010 observamos una reducción de la expresión en tejido metastásico respecto al tumor primario para los cuatro blancos putativos analizados (Figura 20-B). Este perfil de expresión está de acuerdo con el comportamiento de tipo supresor de tumor, lo que coincide con la hipótesis de que miR-183 actúe como oncogén produciendo la represión de estos genes supresores de tumor en PrCa.

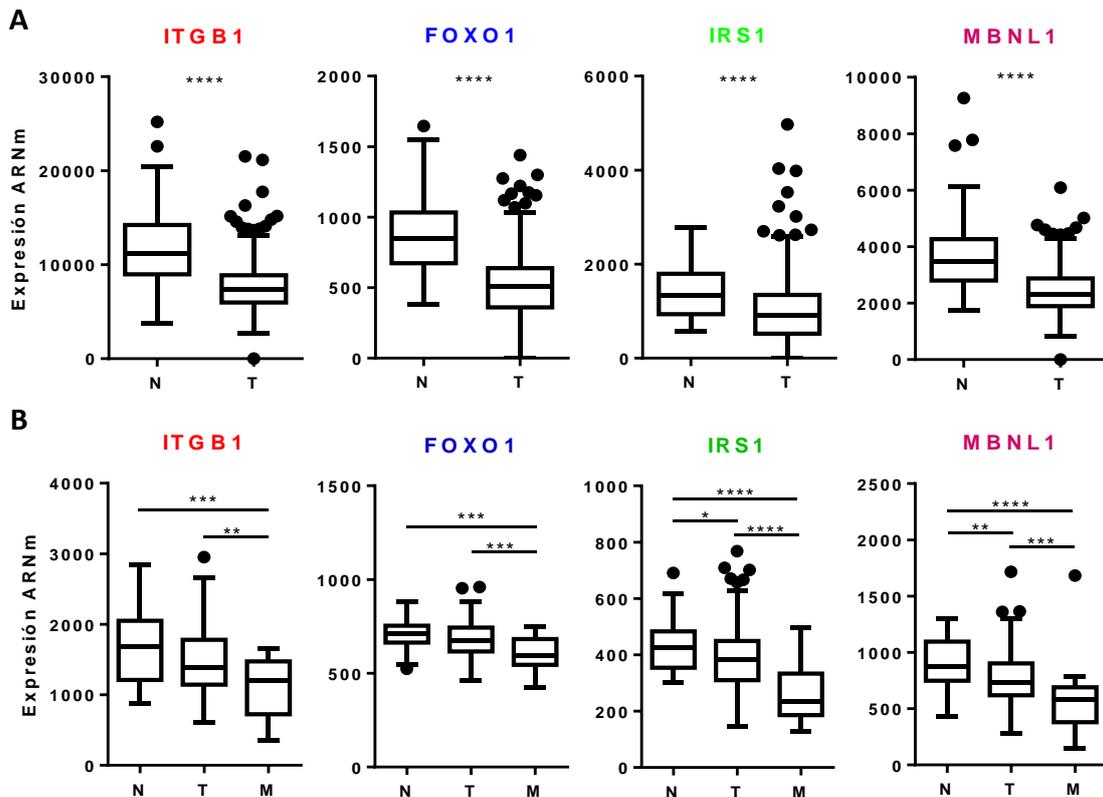


Figura 20. Los genes candidatos a ser blanco directo de represión por miR-183 seleccionados tienen perfil de expresión de tipo supresor tumoral en PrCa. Se muestran los niveles de ARNm en N = tejido normal, T = tumor primario y M = tejido metastásico obtenidos de A) PRAD-TCGA y B) Taylor et al. 2010. Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test no paramétrico Mann Whitney. P-valor **** < 0,0001, *** < 0,001, ** < 0,005, * < 0,05.

Luego, se estudió si la expresión de los genes seleccionados se asocia con parámetros clínicos de la enfermedad. Este análisis se realizó con los datos de expresión de ARNm de los 4 genes y los datos de expresión de la proteína IRS1, debido a que no hay datos de proteína de los otros tres genes. Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la expresión del ARNm de FOXO1 y el Grado de Gleason, la recurrencia bioquímica y el Valor T patológico (Figura 21), donde la disminución de los niveles de transcripto acompaña al aumento de la malignidad.

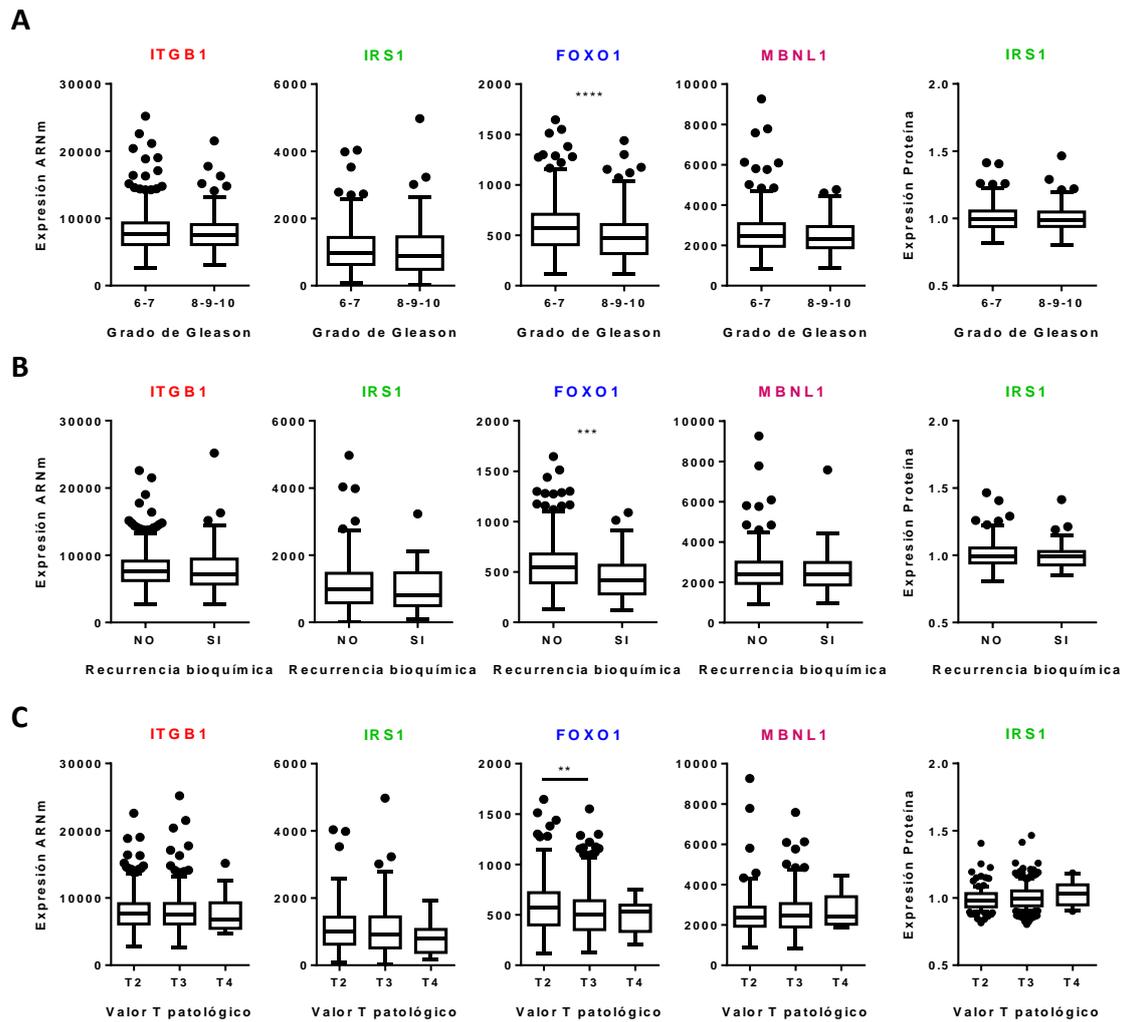


Figura 21. Asociación entre la expresión de los 4 genes candidatos seleccionados y variables clínicas en la cohorte de PRAD-TCGA. Se muestra la expresión de los ARNm y de proteína IRS1 agrupados según A) grado de gleason, B) recurrencia bioquímica y C) valor T patológico. Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test no paramétrico Mann Whitney. P-valor **** < 0,0001, *** < = 0,001, ** < 0,005.

Por otro lado, se estudió la correlación entre los niveles de hsa-miR-183-5p y los de ARNm de los genes seleccionados en las muestras disponibles y se encontró una correlación negativa estadísticamente significativa para todos los genes (Figura 22). Esta correlación apoya una posible acción represiva de miR-183 sobre los transcritos de estos genes en PrCa.

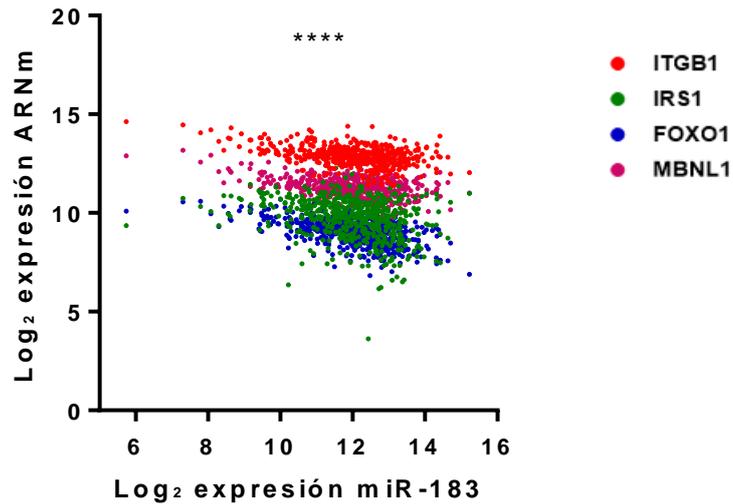


Figura 22. Correlación entre la expresión del ARNm de los genes seleccionados y hsa-miR-183-5p en la cohorte PRAD-TCGA. Para evaluar la significancia estadística se utilizó el test de Spearman. ITGB1 $r = -0,3467$, IRS1 $r = -0,3143$, FOXO1 $r = -0,5246$, MBNL1 $r = -0,3656$. P-valor **** $< 0,0001$.

En suma, estos resultados apoyan el rol oncogénico de hsa-miR-183-5p así como su relevancia en la clínica. Además, el perfil de expresión de los pares miR-blanco analizados es consistente con una interacción represiva del miR sobre los genes supresores de tumor ITGB1, IRS1, FOXO1 y MBNL1 en PrCa.

Validación de genes blanco

Determinación del efecto de la sobre-expresión e inhibición de miR-183 en los niveles de ARNm de los genes seleccionados

Para demostrar la acción de miR-183 sobre los genes blancos seleccionados, modulamos los niveles intracelulares del miR mediante la transfección con el mimic y el inhibidor de miR-183 en líneas celulares de PrCa en cultivo y determinamos los cambios en los niveles de ARNm de dichos genes mediante RT-qPCR con el sistema SyberGreen. En primer lugar, confirmamos la sobre-expresión de miR-183 luego de 72 horas de la transfección con 5 y 20nM de mimic en las líneas celulares DU145 y PC-3. En estas condiciones, encontramos una sobre-expresión (en inglés, *fold change*) de 184 y 246 veces en DU145, y de 19 y 81 veces en PC-3, con cada concentración, respectivamente (Figura 23-A). La

diferencia de *fold change* obtenido en las dos líneas celulares podrían deberse a una mayor eficiencia de transfección en DU145 y no podrían explicarse por una diferencia en los niveles endógenos de miR-183, puesto que la línea celular PC-3 tiene entre 2-3 veces menos que DU145 (Ottati 2014). Por otro lado, se analizó el efecto de la transfección con 75nM de inhibidor en células PC-3 y se observó una reducción pequeña en la cantidad de miR-183 (*fold change* de 0,86) (resultados no mostrados). Dado que no conocemos el mecanismo preciso de acción del inhibidor comercial sobre el miR endógeno no podemos descartar que se una al mismo sin provocar su degradación. Por este motivo, decidimos continuar ensayando el inhibidor a pesar de no poder medir su efecto directo sobre miR-183. En segundo lugar, se determinaron los niveles de ARNm de los genes seleccionados luego de 72 horas de la transfección con 5 y 20nM del mimic y 75 y 200nM del inhibidor (Figura 23-B). En ambos casos se ensayaron las moléculas control específicas en las mismas condiciones.

Las eficiencias de los *primers* para ITGB1, IRS1, FOXO1, GAPDH y BACT habían sido previamente calculadas durante la tesis de maestría de Ottati (Ottati 2014) y resultaron adecuadas. En el contexto de esta tesis, se determinó la eficiencia de los *primers* para MBNL1 en la línea celular DU145 (Figura 24) obteniéndose un valor de 1,02. Asimismo, las derivadas de las curvas de disociación de los productos amplificados para todos los genes ensayados mostraron un único pico, consistente con la amplificación de un único producto, y confirmando la especificidad de la reacción (resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos (Figura 23-B) muestran que la sobre-expresión de miR-183 provoca una disminución clara en la expresión del ARNm de ITGB1 en todas las condiciones ensayadas. Por otro lado, encontramos una disminución leve en la expresión de los ARNMs de IRS1 y MBNL1 en respuesta a la mayor concentración de miR-183, en ambas líneas celulares. Además, observamos una disminución leve en la expresión del ARNm de FOXO1 en respuesta a la mayor concentración de miR-183 en la línea celular DU145, aunque el efecto opuesto en la línea celular PC-3. El efecto del inhibidor sobre los transcritos es prácticamente imperceptible, siendo nuevamente más reproducible para ITGB1, donde se ve un pequeño incremento en la cantidad de transcripto cuando se utiliza la mayor concentración. Si bien la falta de efecto del

inhibidor podría deberse a su ineficacia como bloqueante, no se puede descartar aún qué inhiba la traducción sin interferir con el nivel de ARNm.

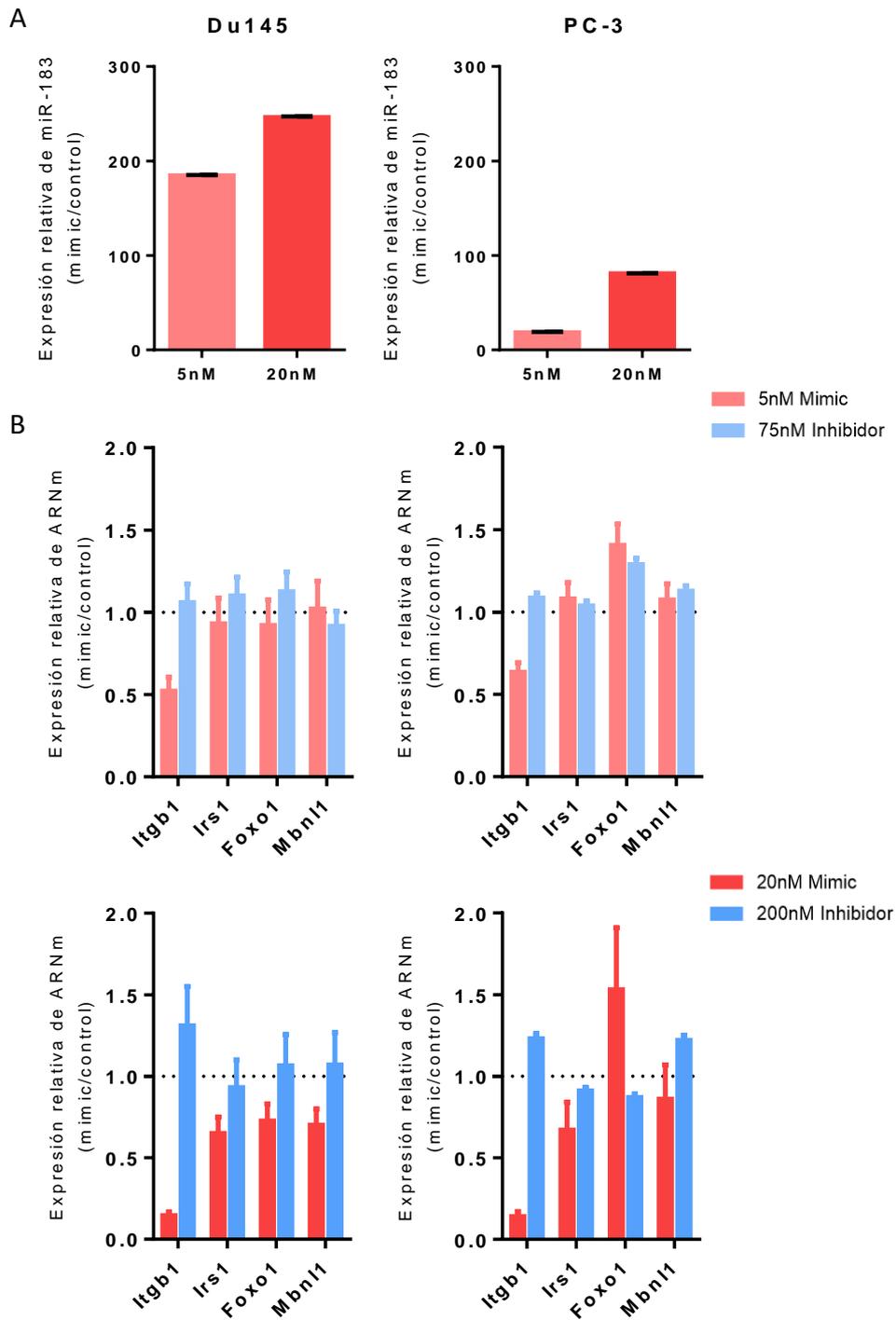


Figura 23. Efecto de la sobre-expresión e inhibición de miR-183 en los niveles de ARNm de los genes blanco seleccionados. A) Cambio (*fold change*) en los niveles de miR-183 luego de 72 horas de la transfección de 5 y 20nM de mimic en relación al control en las líneas celulares DU145 (izquierda) y PC-3 (derecha). B) Cambio (*fold change*) en los niveles de ARNm de los genes seleccionados luego de 72 horas

de la transfección con 5 y 20nM de mimic (rojo claro y oscuro respectivamente) y 75 y 200nM de inhibidor (azul claro y oscuro respectivamente) en relación a los controles en las líneas celulares DU145 (izquierda) y PC-3 (derecha). Las barras de error representan el desvío estándar dos réplicas técnicas de la reacción de qPCR normalizadas con dos genes normalizadores (U6 y BACT y GADPH para la dosificación de miR-183 y los ARNm ensayados respectivamente).

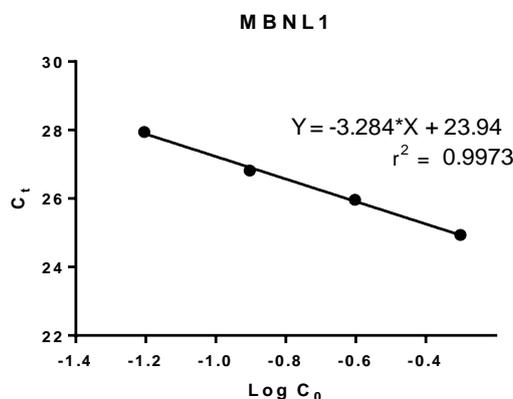


Figura 24. Cálculo de la eficiencia de amplificación de los *primers* para MBNL1. Se detalla la ecuación de la recta y el coeficiente de ajuste (r^2).

Estos resultados sugieren que miR-183 regula la expresión de los genes seleccionados *in vitro*, siendo ITGB1 es el más afectado de entre los genes seleccionados y en las condiciones ensayadas.

Determinación del efecto de la sobre-expresión e inhibición de miR-183 en los niveles de proteína de ITGB1

Dado que ITGB1 es una proteína localizada preferentemente en la membrana plasmática, se utilizó citometría de flujo de células vivas para su cuantificación y de esta manera verificar que la sobre-expresión de miR-183 produzca efectivamente una disminución en los niveles de la misma. Para esto, en primer lugar se corroboró por inmunohistoquímica en células DU145 que la marcación del anticuerpo utilizado corresponda a la descrita para ITGB1 (Figura 25). Las imágenes muestran que ITGB1 se localiza preferentemente en la membrana plasmática, en los contactos célula-célula y célula-superficie de adhesión de la placa. Así mismo, también se observan señales intracelulares en regiones que podrían corresponder a endosomas. Por otro lado, se midieron los niveles de proteína de ITGB1 luego de 72 horas de la transfección de 20nM de mimic y 200nM de inhibidor y controles en las líneas celulares DU145 y PC-3.

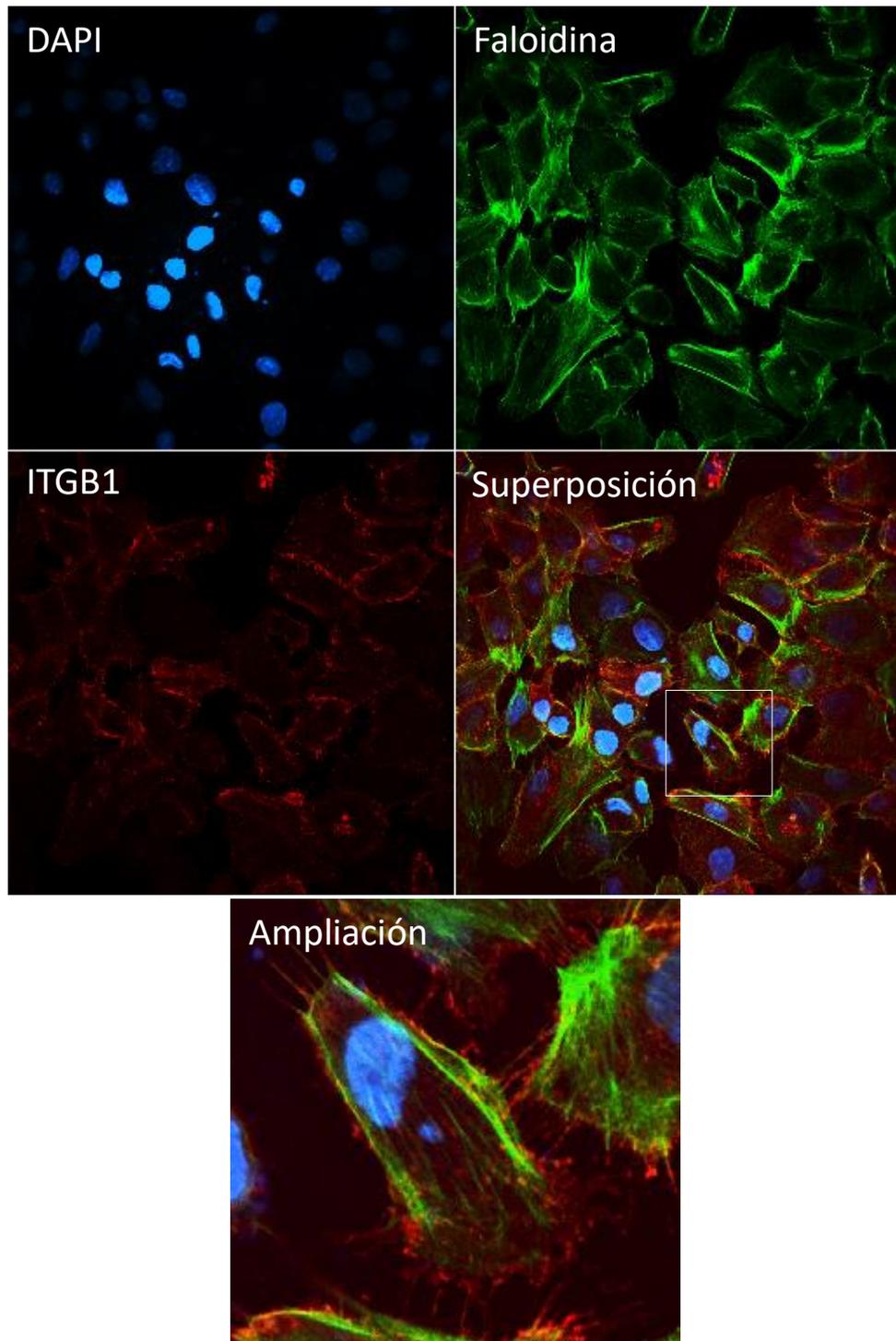


Figura 25. Localización subcelular de ITGB1 en células DU145. Las fotos fueron tomadas en un microscopio confocal a 40x de aumento. Se muestra la tinción con DAPI, Faloidina, ITGB1, la superposición de ellas y el área recuadrada en D magnificada.

Para el análisis citométrico, en primer lugar, se adquirieron células sin transfectar y marcadas solo con anticuerpo secundario (Figura 27-A) y se registró la dispersión de luz lateral (*side*) y directa (*forward*) (SSC-A vs FSC-A), que muestran el tamaño y la

complejidad de las partículas, respectivamente. Esto nos permitió identificar la población de partículas correspondientes a las células, denominada P1, que presenta mayor tamaño y complejidad (es decir, establecer un portón o, en inglés, *gate*). Las partículas que quedaron por fuera de este *gate*, que tienen menor tamaño y complejidad, podrían corresponder a detritos celulares. Luego, para eliminar los dobletes de células, analizamos los eventos de P1 en un gráfico FSC-H vs. FSC-A y seleccionamos una nueva región, llamada P2, correspondiente a aquellas células que muestran una relación lineal de ambos parámetros. Finalmente, registramos la intensidad de fluorescencia de aquellos eventos que se agrupan dentro de la intersección de P1 y P2 y generamos un gráfico de cuentas (*Counts*) vs. fluorescencia (FL1-A), en el cual se estableció el umbral de fluorescencia (en inglés, *cutoff*) inespecífica. Las células marcadas simultáneamente con el anticuerpo primario y secundario, se sitúan por encima de este valor umbral (V1-R). Este análisis se realizó independientemente para cada línea celular ensayada. Hecho esto, analizamos las células transfectadas con mimic, inhibidor y controles, manteniendo los parámetros seleccionados para cada línea celular y adquiriendo 10.000 eventos totales en P1 por muestra (Figura 27-B, -C, -D y-E).

Finalmente, se graficó la media de intensidad de fluorescencia en V1-R obtenida en tres experimentos independientes en cada condición (Figura 26).

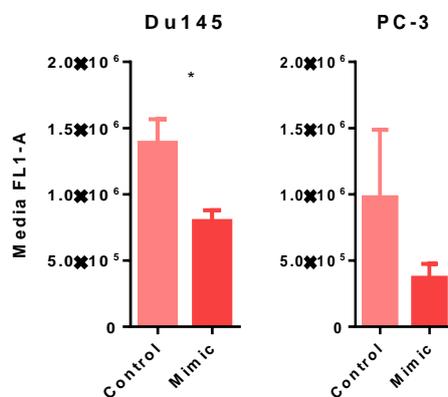
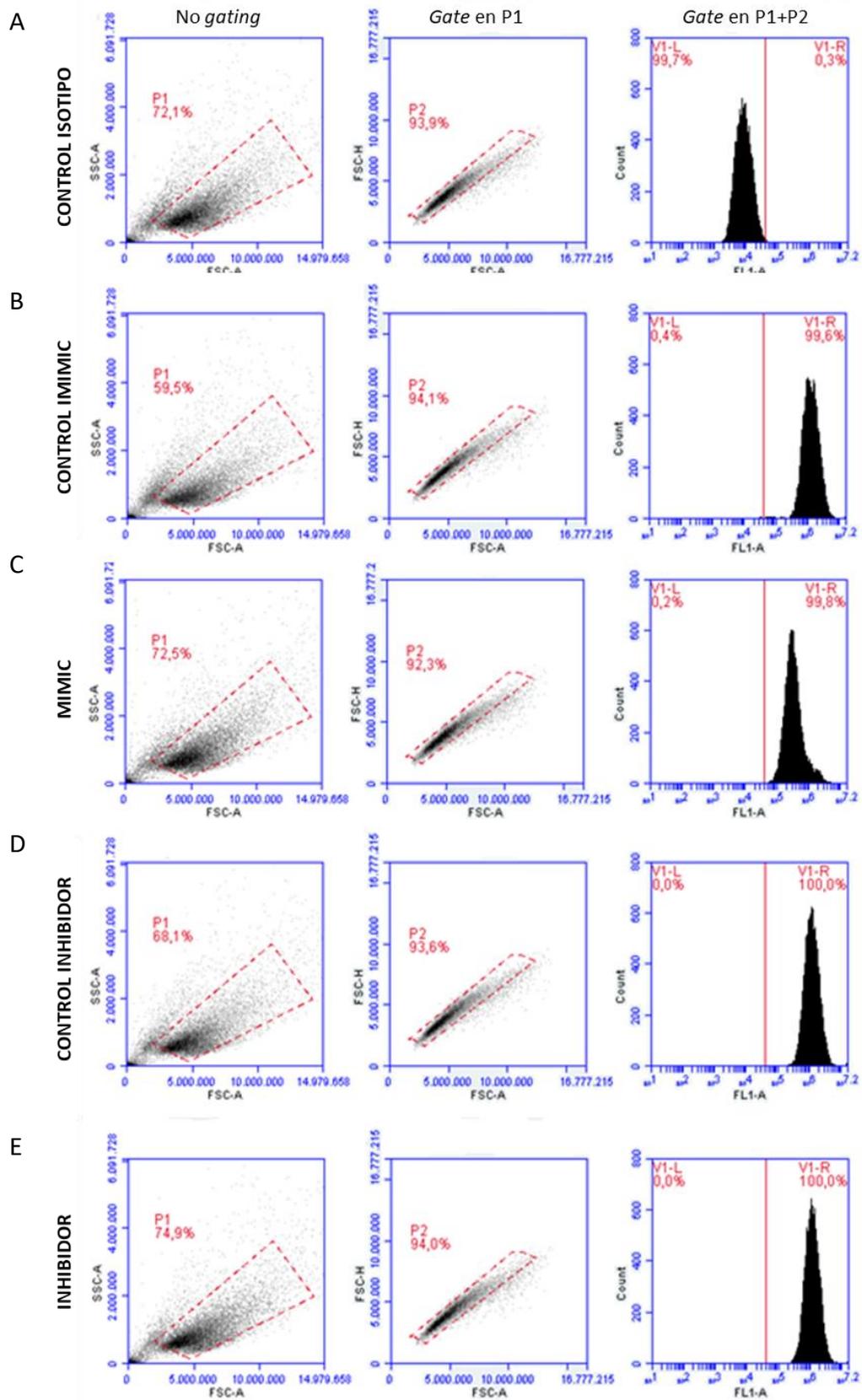


Figura 26. Efecto de la sobre-expresión de miR-183 en los niveles de proteína de ITGB1 en las líneas celulares DU145 y PC-3. Las barras de error corresponden a la desviación estándar de tres experimentos independientes. Para analizar la significancia estadística se utilizó un test t pareado. P-valor * = 0,0135.



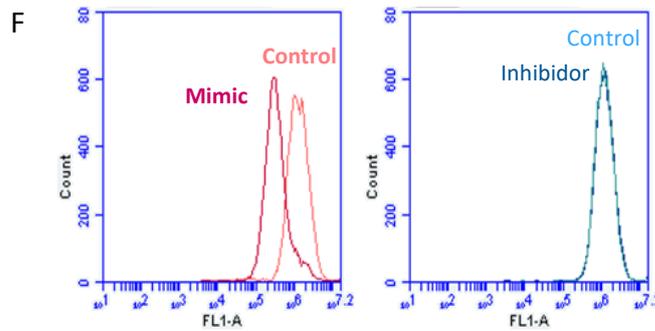


Figura 27. Análisis citométrico de las células para la cuantificación de ITGB1. Se muestran los gráficos SSC-A vs. FSC-A, FSC-H vs. FSC-A y *Counts* vs. FL1-A de un experimento representativo en células DU145 A) sin transfectar y marcadas solo con anticuerpo secundario; y células transfectadas con B) 20nM de control del mimic, C) 20nM de mimic, D) 200nM de control del inhibidor, E) 200nM de inhibidor. En F se muestra la superposición de los gráficos *Counts* vs. FL1-A de las células transfectadas con mimic, inhibidor y controles.

Los resultados muestran una disminución estadísticamente significativa de la proteína ITGB1 en respuesta a la sobre-expresión de miR-183 en la línea celular DU145. Por otra parte, encontramos la misma tendencia en la línea celular PC-3, aunque no es estadísticamente significativa. Por el contrario, no se observa modulación de la proteína ITGB1 en respuesta a la inhibición de miR-183. Con este resultado es evidente que el inhibidor no está ejerciendo efecto sobre miR-183 a ningún nivel, lo que permite sospechar de la eficiencia de bloqueo para este y los otros genes.

En suma, estos resultados muestran que la expresión de ITGB1 es modulada por miR-183 *in vitro*.

Construcción del plásmido reportero con la 3'UTR salvaje y mutante de ITGB1

Con el fin de validar la interacción directa y sitio-específica de miR-183 e ITGB1, construimos plásmidos reporteros con la 3'UTR de ITGB1 salvaje y mutante para el sitio de unión predictivo de miR-183. Para esto, amplificamos la región 3'UTR de ITGB1 wt a partir de ADN genómico humano y mutamos el sitio de unión predictivo de miR-183 mediante la técnica *Seed Mutagenesis Assembly PCR (SMAP)*. Luego, ambas regiones se clonaron, en primer lugar, en un vector TOPO con el fin de aumentar la eficiencia de la digestión de los insertos con las enzimas de restricción y facilitar la clonación en el vector

reportero pmiRGLO. En la **Figura 28** se muestran los geles de agarosa en los cuales se analizaron el producto de amplificación de la 3'UTR de ITGB1 wt a partir de ADN genómico (**Figura 28-A**), los amplicones (AI y AII) generados para la mutagénesis a partir de la 3'UTR de ITGB1 wt (**Figura 28-B**) y el producto mutante ensamblado obtenido a partir de los amplicones AI y AII (**Figura 28-C**). Asimismo, se muestran las digestiones simples y dobles del vector pmiRGLO con las enzimas XbaI y MssI y del vector de clonado pCR2.1-TOPO conteniendo las secuencias wt o mut de la 3'UTRs de ITGB1 (**Figura 28-D**). Las regiones 3'UTR wt y mut liberadas por la digestión de estos vectores fueron ligadas en el vector pmiRGLO linealizado con las mismas enzimas para generar los vectores reporteros pmiRGLO -3'UTR-ITGB1 wt y mut (**Figura 28-E**).

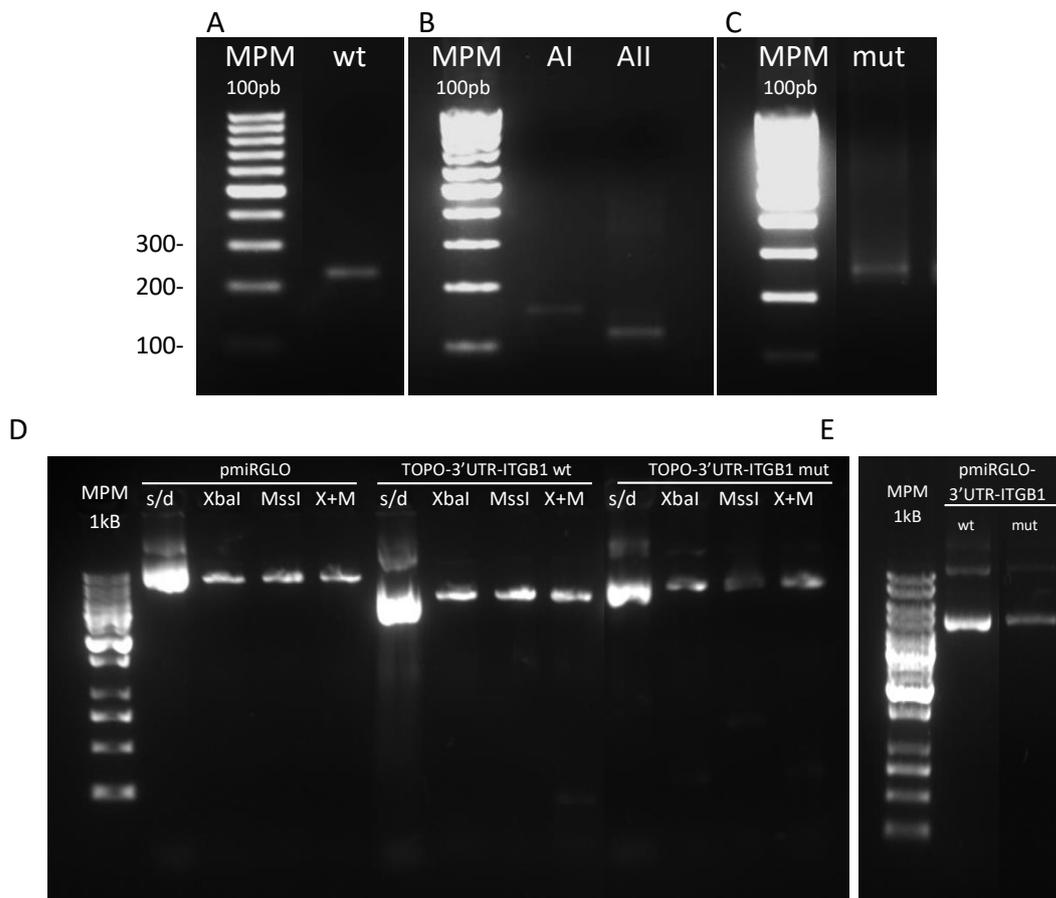


Figura 28. Análisis del procedimiento para la construcción de pmiRGLO-3'UTR-ITGB1 wt y mut. Se muestran geles de agarosa 2% (arriba) y 1% (abajo) teñidos con bromuro de etidio, obtenidos en distintas etapas de la construcción de los plásmidos reporteros. A) región 3'UTR de ITGB1 wt amplificada, en B) amplicones (AI y AII) generados a partir de la 3'UTR de ITGB1 wt, en C) secuencia 3'UTR de ITGB1 mut ensamblada a partir de los amplicones AI y AII, en D) digestiones simples y dobles del vector pmiRGLO con

las enzimas de restricción XbaI y MspI y de los vectores pCR2.1-TOPO conteniendo las 3'UTRs de ITGB1 wt y mut, y E) plásmidos reporteros pmiRGLO-3'UTR-ITGB1 wt y mut purificados.

Para verificar las construcciones de la 3'UTR de ITGB1 wt y mut en el plásmido pmiRGLO, los plásmidos purificados fueron enviados a secuenciar a la compañía MacroGen utilizando el primer *forward* Luc_F, complementario a la secuencia del gen Luciferasa del plásmido pmiRGLO. Las secuencias fueron recibidas en forma de electroferogramas de buena definición (Figura 29-A y -B) y analizadas mediante alineamiento utilizando el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Figura 29-C). La secuencia mutante construida fue la esperada, 5'-GTCCAGT-3', siendo la secuencia wt predicha de unión de miR-183 5'-GTGCCAT-3'.

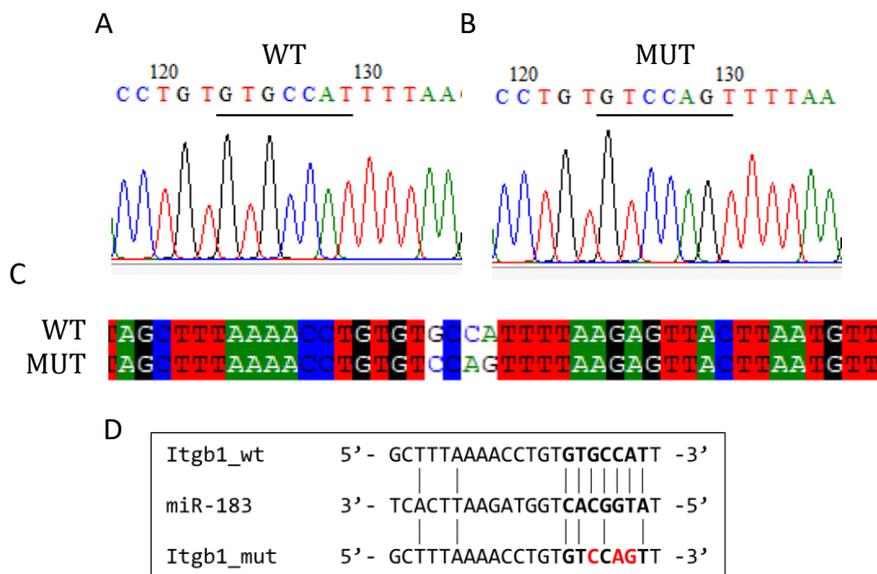


Figura 29. Confirmación de las secuencias de los vectores reporteros pmiRGLO-3'UTR-ITGB1 wt y mut por secuenciación automática de Sanger. A) y B) muestran la región del electroferograma donde se encuentra la secuencia wt complementaria a la semilla de hsa-miR-183-5p y la secuencia mut construida (subrayada), respectivamente. C) muestra el alineamiento de las secuencias donde se ubica el sitio de unión predictivo de miR-183, utilizando el programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. D) Esquema mostrando la complementariedad entre miR-183 y su sitio predictivo de unión en la 3'UTR de ITGB1, indicando los cambios introducidos por mutagénesis.

Confirmamos así la presencia de las secuencias wt y mut de la 3'UTR de ITGB1 en el vector pmiRGLO. En la Figura 29-D se muestra un esquema de la complementariedad entre miR-183 y el sitio predictivo de unión en la 3'UTR de ITGB1, así como los cambios introducidos por mutagénesis.

Ensayos de genes reporteros con los plásmidos pmiRGLO-3'UTR-ITGB1 wt y mut

Con el fin de validar la interacción directa y sitio-específica de miR-183 e ITGB1, co-transfectamos los plásmidos reporteros construidos con el mimic o el control en la línea celular DU145 y medimos la actividad luciferasa por emisión de luminiscencia. Primeramente, se realizó una puesta a punto de las condiciones del ensayo de reportero. Se evaluaron diferentes placas (96 y 24 pocillos), diferentes números de células, concentración de plásmidos, concentración de mimic y control, y diferentes tiempos de análisis (resultados no mostrados). La condición que permitió una mayor reproducibilidad fue la placa de 24 pocillos, sembrando 80.000 células por pocillo, transfectando 125ng de plásmido y 5nM de mimic y control por pocillo, y midiendo la emisión de luminiscencia a 48 horas. El plásmido pmiRGLO codifica para una luciferasa de *Renilla* constitutiva que es usada como control de la eficiencia de transfección, por lo que los resultados se expresan como la relación entre la emisión de luminiscencia de *Firefly* y la de *Renilla*.

Los resultados del ensayo indican que la 3' UTR wt de ITGB1 reduce modestamente la actividad del gen reportero cuando se sobre-expresa miR-183, lo que indica que el gen es regulado negativamente por el miR (Figura 30). Además, la mutación del sitio complementario a la semilla de miR-183 provoca la pérdida de esta represión, sugiriendo que la secuencia predictiva es la responsable de la regulación por miR-183 y que por tanto existe una interacción directa y sitio específica entre ellos. Si bien este resultado fue consistente en tres experimentos independientes, las pruebas estadísticas no alcanzan un nivel de confiabilidad adecuado, debido probablemente a la variabilidad del ensayo y la pequeña magnitud de la diferencia observada. Nos planteamos, como perspectiva, repetir el ensayo más veces para verificar si el cambio observado es confiable estadísticamente.

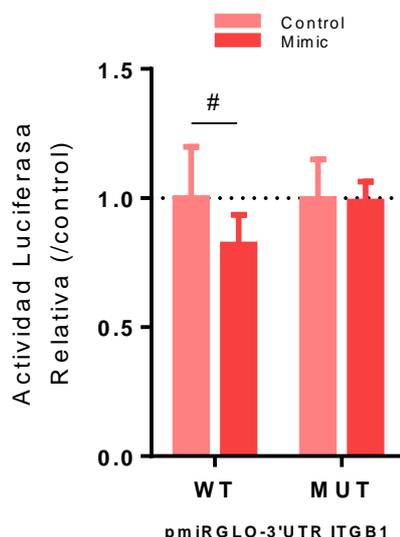


Figura 30. Efecto de miR-183 sobre la actividad luciferasa del gen reportero con la 3'UTR de ITGB1 clonada corriente abajo en DU145. Se muestra la actividad luciferasas de luciérnaga (normalizada con la de *Renilla*) medida en células transfectadas con moléculas control (ctrl) o mimmic expresada como relación con el control. Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes. Para evaluar la significancia estadística se utilizó un test t pareado. P-valor # = 0,1907.

Estudio del efecto de miR-183 en la Adhesión Celular

Ensayo cuantitativo de adhesión celular

Con el fin de evaluar el efecto de miR-183 en la adhesión celular se realizó, en primer lugar, un ensayo cuantitativo midiendo el porcentaje de células que se mantienen adheridas a la placa de cultivo luego de un ciclo de lavados. Se analizaron diferentes tiempos (30, 60, 90 y 120min) y se encontró que a 30 minutos ya se observan cambios entre las células que sobre-expresan miR-183 y que este efecto se deja de observar luego de 90 minutos de adhesión (Figura 31-A para DU145 y resultados similares para LNCaP y PC3 no mostrados). Para evaluar la influencia de ITGB1 en el ensayo de adhesión utilizado, se realizó un experimento similar incubando las células con un anticuerpo contra ITGB1 o un anticuerpo inespecífico (anti-Twist) como control. En este caso el cambio en la adhesión celular provocado por el bloqueo de ITGB1 se observa en todos los tiempos analizados. En virtud de la cinética de adhesión observada para la

sobreexpresión de miR-183 y el bloqueo de ITGB1, decidimos analizar el cambio en el porcentaje de adhesión celular a 30 minutos.

Ensayando las líneas celulares DU145, PC-3 y LNCaP a los 30 minutos de sembrado en la placa encontramos que la sobre-expresión de miR-183 en células DU145 y LNCaP disminuye significativamente la capacidad de adhesión, mientras que las células PC-3 no muestran ningún cambio (Figura 31-C). En la Figura 31-D se muestra que las células DU145 y PC-3 incubadas con el anticuerpo contra ITGB1 presentan menor capacidad de adhesión que las células incubadas con el anticuerpo control (Figura 31-B), sugiriendo que la adhesión de estas células está mediada por ITGB1 en estas condiciones. Por otro lado, a pesar de que encontramos una disminución de la adhesión en las células LNCaP en respuesta a la sobre-expresión de miR-183, no se observa un cambio cuando se bloquea directamente a ITGB1.

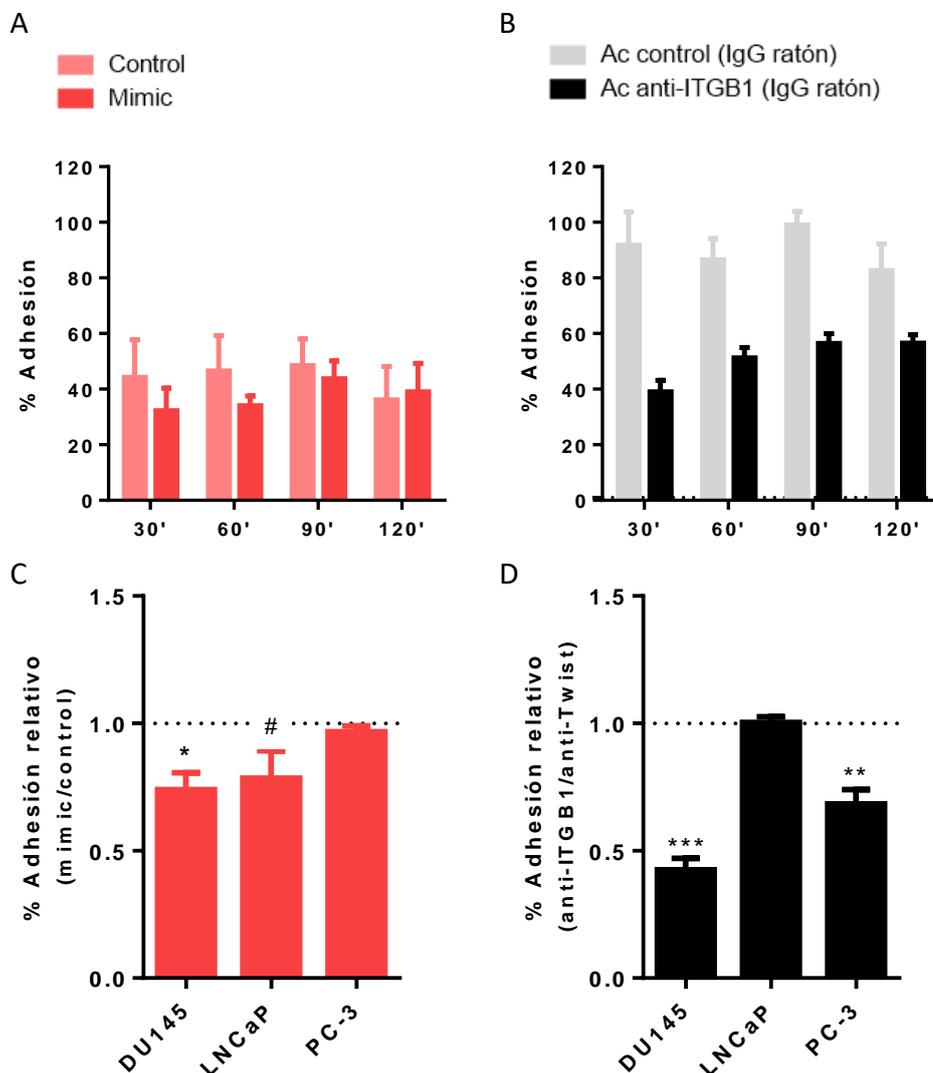


Figura 31. Efecto de miR-183 e ITGB1 en la capacidad de las células de adherirse a la placa de cultivo. Se muestra el porcentaje de adhesión a diferentes tiempos de células DU145 A) luego de 72 horas de la transfección con 20nM de mimic (rojo) y control (rosado) y B) luego de ser incubadas con un anticuerpo específico contra ITGB1 (negro) y con un anticuerpo contra Twist 1 como control (gris). Se muestra el cambio en la adhesión de células DU145, LNCaP y PC-3 C) que sobre-expresan miR-183 relativo a las que no luego de 30 minutos de sembrado y D) cuando incuba con un anticuerpo específico contra ITGB1 relativo a las incubadas con un anticuerpo contra Twist luego de 30 minutos de sembrado. Las barras de error en A y C muestran la desviación estándar de tres experimentos independientes y en B y D 4 réplicas técnicas de un experimento. La significancia estadística se evaluó en C) mediante un test t pareado y en D) mediante un test t no pareado. P-valor *= 0,0207, #= 0,0736, ***= 0,0004, **= 0,0066.

Los resultados muestran que la sobre-expresión de miR-183 produce una disminución en la capacidad de adhesión a la placa de las células DU145 a 30 minutos y que este efecto podría deberse a la represión de ITGB1.

Análisis de la morfología celular

Otra aproximación para estudiar la adhesión celular es analizar la morfología de la célula durante el proceso de adhesión. Para esto, luego de 72 horas de la transfección con 20nM de mimic y control, las células fueron disgregadas mediante tripsina y fueron sembradas en placas de 96 pocillos para permitir la adhesión. Luego de diferentes tiempos, las células fueron fijadas y teñidas con faloidina para analizar los cambios en el citoesqueleto de actina. Si bien empezamos a observar diferencias morfológicas luego de 1 hora y media (resultados no mostrados), decidimos realizar los análisis luego de 3 horas, cuando las diferencias se tornaron más notorias. Para esto, se tomaron fotos de 6 campos representativos con un microscopio de epifluorescencia y se analizaron diferentes parámetros morfológicos de forma automática mediante el programa ImageJ. Los resultados obtenidos a 3 horas de adhesión muestran que las células que sobre-expresan miR-183 se expanden menos sobre la superficie de adhesión, manteniendo una forma circular (Figura 32-A), lo cual puede verse reflejado en los parámetros morfológicos como una disminución en el área y la relación de los radios de las células, así como un aumento en la convexidad y circularidad de las mismas (Figura 32-B).

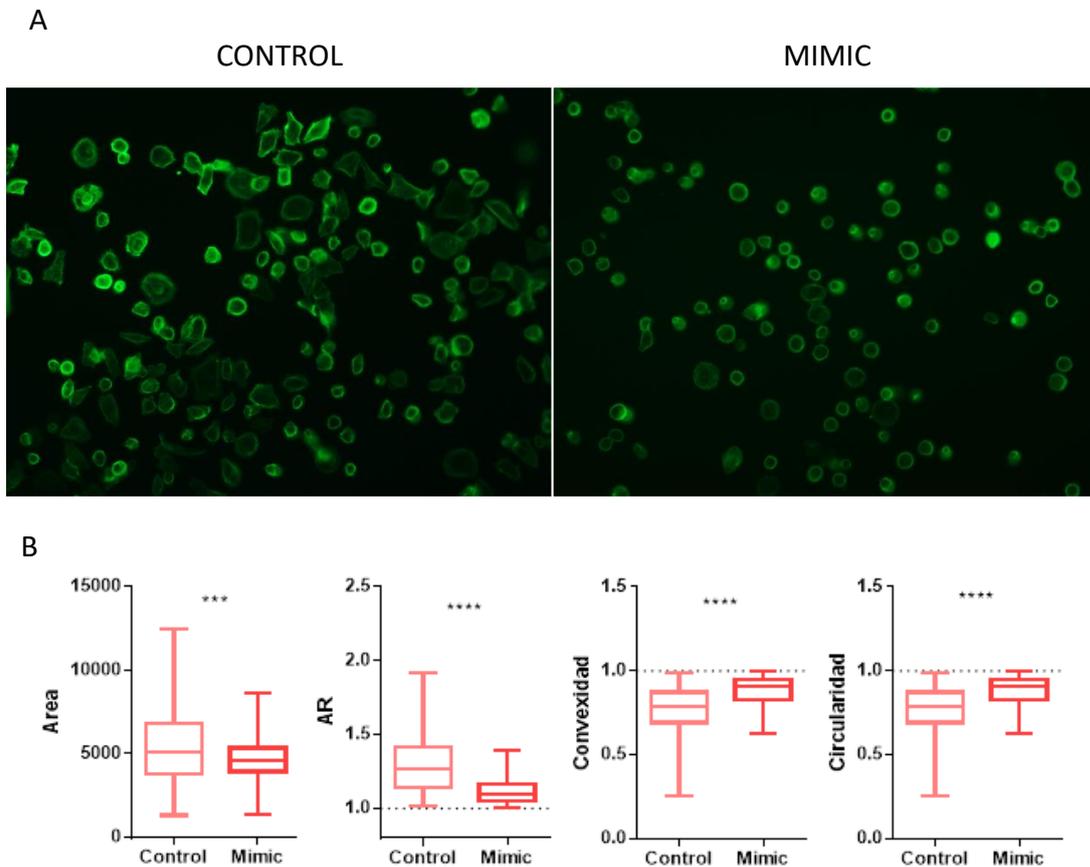


Figura 32. Efecto de miR-183 sobre la morfología celular a 3 horas de adhesión a la placa de cultivo en la línea celular DU145. Se muestra en A) fotos de un campo representativo de células transfectadas con 20nM de mimic y control luego de 3 horas de sembrado y en B) los valores de área, aspecto de los radios (AR), convexidad y circularidad de las células transfectadas, obtenidas con el programa ImageJ. Los gráficos muestran los valores obtenidos de aproximadamente 300 células por condición de un experimento. La significancia estadística se evaluó mediante el test no paramétrico Mann Whitney. *** = 0,0006, **** < 0,0001.

Estos resultados muestran que miR-183 afecta la morfología de las células DU145 durante la adhesión, lo cual es consistente con los resultados obtenidos en el ensayo cuantitativo.

Efecto de miR-183 en las adhesiones focales

Dado que ITGB1 es una proteína que forma parte de las adhesiones focales, nos interesó estudiar el efecto de miR-183 en la capacidad de las células de formar estas estructuras mediante inmunocitoquímica de la proteína vinculina. No se utilizó a ITGB1 como marcador de adhesiones focales dado que, como se muestra en la [Figura 25](#), no se ubica de manera exclusiva en las adhesiones focales. Las células fueron transfectadas en las

mismas condiciones que en los ensayos anteriores y se analizaron luego de 72 horas de la transfección. Las células también se tiñeron con DAPI para visualizar el núcleo de la célula y con faloidina para visualizar el citoesqueleto de actina. Para el análisis, se tomaron fotos de 6 campos representativos con un microscopio confocal a 63x de aumento. En la [Figura 33](#) se muestran fotos de un campo representativo de un experimento tomadas con los filtros para visualizar DAPI, Faloidina y Vinculina y la superposición de las mismas. En primer lugar, observamos cualitativamente que la sobre-expresión de miR-183 produce un cambio en la morfología celular (consistente con los resultados obtenidos en el experimento anterior) a una morfología más redondeada, con un citoesqueleto de actina distribuido de forma cortical y con menor cantidad de haces de actina ([Figura 33](#), indicado con flechas), que corresponden a fibras de estrés ventrales. Estas son estructuras que están unidas en ambos extremos a la membrana plasmática a través de las integrinas de las adhesiones focales anclando la célula a la MEC (Burrige and Guilluy 2016). Por otro lado, mediante procesamiento semi-automático de las fotos ([Figura 34-A](#)), cuantificamos el número de adhesiones focales por célula ([Figura 34-B](#)), y encontramos que aquellas que sobre-expresan miR-183 presentan un menor número de adhesiones focales. Es interesante mencionar que estas características morfológicas, causadas por la sobre-expresión de miR-183, son similares a los cambios ocurridos durante la transición mesenquimal-ameboidal (en inglés, *Mesenchymal-to-Amoeboid Transition* o MAT), un proceso posterior a la Transición Epitelio-Mesenquimal (en inglés, *Ephitelial-to-Mesenchymal Transition* o EMT) en la carcinogénesis, que aumenta la agresividad de las células tumorales (Morley, Hager et al. 2014).

CONTROL

MIMIC

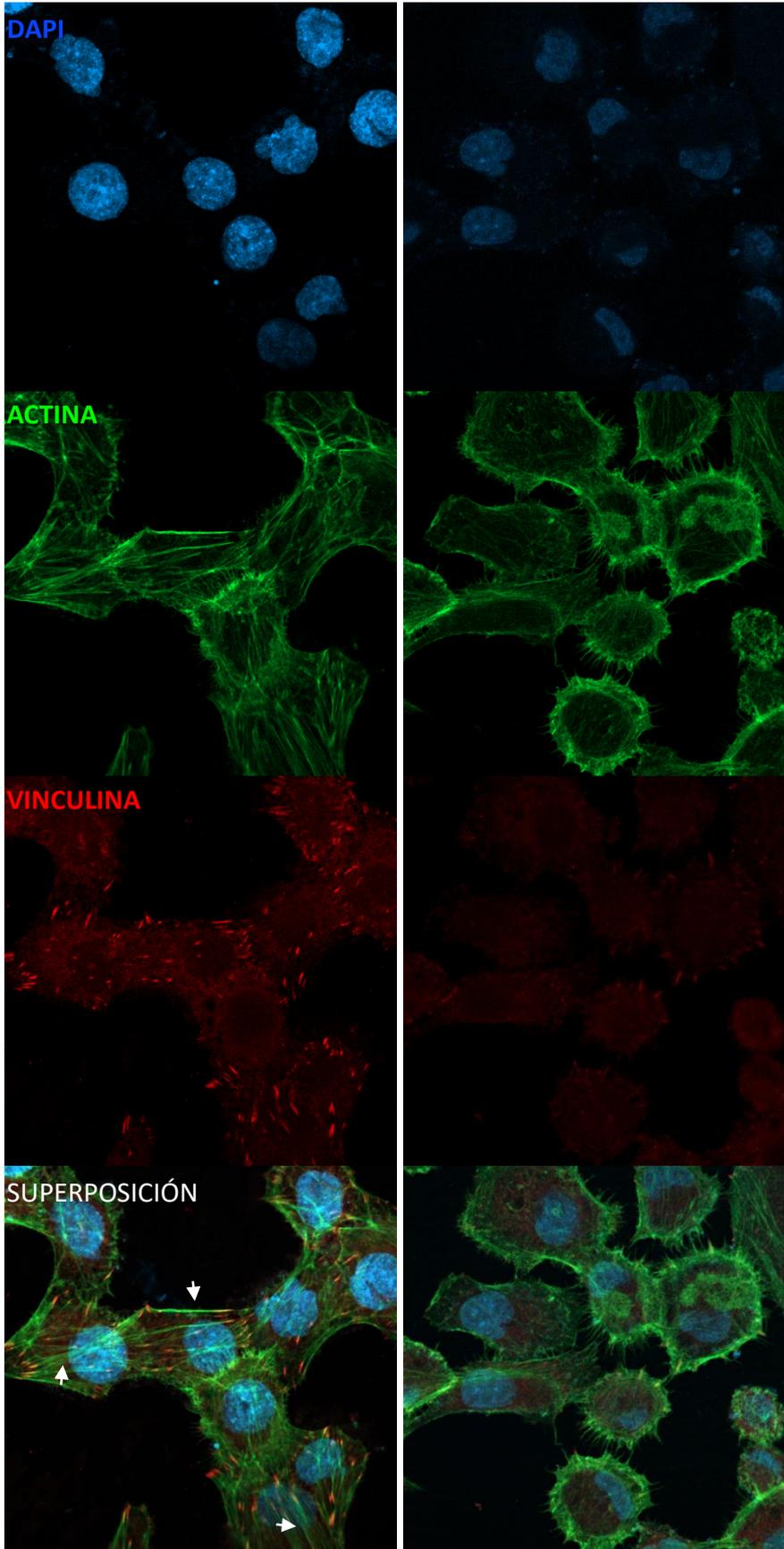


Figura 33. Efecto de miR-183 en las adhesiones focales de células DU145. Se muestran imágenes tomadas con un microscopio confocal a 63x de aumento de campos representativos de células transfectadas con 20nM de mimic y control en azul (DAPI), verde (actina), rojo (vinculina) y la superposición. Las flechas muestran fibras de estrés ventrales típicas.

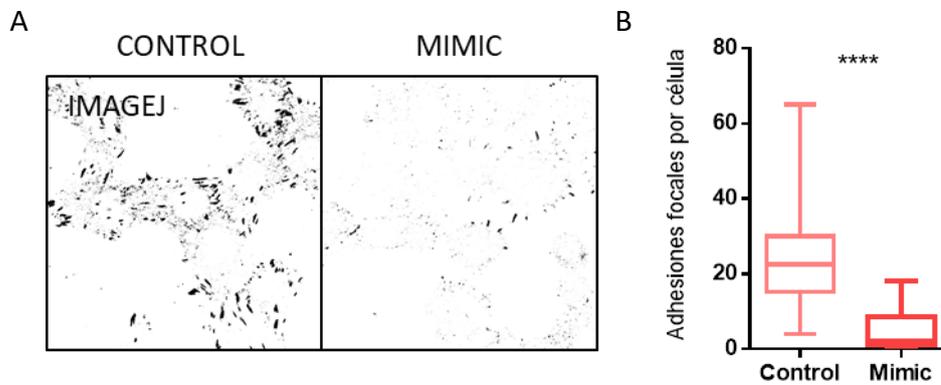


Figura 34. Cuantificación del efecto de miR-183 en las adhesiones focales de células DU145. Se muestra en A) el procesamiento de la imagen de un campo representativo de cada condición mediante el programa ImageJ y en B) la cuantificación del número de adhesiones focales por célula a partir de las imágenes de microscopía confocal obtenidas. El gráfico muestra los valores obtenidos de aproximadamente 50 células en un experimento. La significancia estadística se evaluó mediante el test no paramétrico Mann Whitney. **** < 0,0001.

En suma, las diferentes aproximaciones que utilizamos para estudiar el efecto de miR-183 en la adhesión celular nos permitieron observar que miR-183 afecta la estructura del citoesqueleto de actina resultando en un cambio en la morfología celular y produciendo una disminución en la capacidad de adhesión de las células, y que esto podría estar mediado por la represión directa de ITGB1.

DISCUSIÓN

El Cáncer de Próstata es una de las neoplasias de mayor incidencia en hombres en el mundo y la primera en nuestro país (Ferlay, Shin et al. 2010). A pesar de los esfuerzos internacionales enfocados en entender los mecanismos moleculares que subyacen a la progresión de esta enfermedad, no ha habido una reducción significativa de la tasa de mortalidad. Por el contrario, se piensa que los métodos de tamiz actualmente utilizados para la detección y el tratamiento temprano de esta enfermedad (PSA y examen rectal) han llevado a producir efectos secundarios permanentes en muchos pacientes, así como costos de salud innecesarios (Esfahani, Ataei et al. 2015, Filella and Foj 2015). En este contexto es esencial desarrollar nuevos biomarcadores que permitan el diagnóstico diferencial de pacientes que realmente se beneficiarán del tratamiento de aquellos que no necesitan intervención. En este complejo escenario, los miRs surgen como buenos candidatos a biomarcadores en cáncer debido a su gran estabilidad en plasma, suero y tejidos fijados, y su especificidad, reproducibilidad y consistencia entre individuos (Cannistraci, Di Pace et al. 2014).

El grupo de Schaefer (Schaefer, Jung et al. 2010) en el año 2010 fue el primero en identificar a miR-183 como desregulado en PrCa, y desde entonces han surgido numerosos trabajos de perfiles de expresión de miRs que asocian positivamente su expresión con la malignidad (Mihelich, Khramtsova et al. 2011, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Larne, Martens-Uzunova et al. 2013, Zhang, Sun et al. 2013, Feng, Wu et al. 2017, Li, Hao et al. 2018, Paziewska, Mikula et al. 2018, Song, Chen et al. 2018). Nuestro grupo también ha confirmado la sobre-expresión de miR-183 en muestras clínicas de prostatectomías del Hospital Policial de Montevideo (Ottati 2014) así como la asociación positiva entre su expresión y malignidad de las líneas celulares. En el contexto de este proyecto, interrogamos los datos de pacientes con adenocarcinoma de próstata de la cohorte del TCGA y de Taylor et al y confirmamos un aumento de la expresión de miR-183 en tejido tumoral y metastásico respecto al normal, así como una asociación estadísticamente significativa con **variables clínicas**. Recientemente, Li et al confirma la asociación entre el miR y el valor T patológico y agregan el estudio del valor M clínico en

las muestras de PRAD-TCGA (Li, Hao et al. 2018). En suma, la sobre-expresión de miR-183 en la neoplasia y su asociación positiva con la malignidad están de acuerdo con la hipótesis de que este miR presenta naturaleza oncogénica en esta neoplasia.

Con el fin de profundizar en la función de miR-183 en PrCa, nuestro grupo realizó una **estrategia** de pérdida y ganancia de función en líneas celulares de PrCa por transfección de moléculas moduladoras, seguida del análisis de expresión génica diferencial utilizando microarreglos de expresión génica global. El análisis de enriquecimiento de vías indicó que este miR modula, principalmente, grupos de transcritos de proteínas relacionados con las adhesiones focales y las vías de la insulina. La adhesión celular, que involucra diversas vías de señalización incluyendo las de las adhesiones focales y las de las integrinas, es uno de los principales procesos modulados durante la progresión del PrCa (Gorlov, Byun et al. 2009, Ye, Li et al. 2018), lo que apoya la importancia de estas vías para esta enfermedad. Sin embargo, aunque se ha mostrado que **miR-183** afecta la proliferación (Ueno, Hirata et al. 2013, Dambal, Baumann et al. 2017), la migración (Ueno, Hirata et al. 2013), el metabolismo del Zn (Mihelich, Khramtsova et al. 2011, Dambal, Baumann et al. 2017) y la sensibilidad a quimioterápicos (Gao, Lin et al. 2018) en PrCa, se desconoce aún su rol en la adhesión celular.

En este trabajo nos propusimos estudiar el rol de miR-183 en la **adhesión** a nivel celular y molecular. Dado que un oncomiR reprime a genes supresores de tumor con secuencias complementarias a su región semilla, utilizamos este y otros criterios importantes (datos clínicos y experimentales, antecedentes en la literatura) para seleccionar posibles **genes blanco** candidatos a ser regulados directamente por miR-183. Entre los genes que satisficieron más criterios en el estudio previo se encontraban ITGB1, IRS1, FOXO1 y MBNL1, genes que codifican para proteínas vinculadas directa o indirectamente en la adhesión celular y que mostraron características de genes supresores de tumor en PrCa. Durante esta tesis se extendieron los estudios previos de muestras clínicas a la cohorte de PRAD-TCGA y se realizaron análisis similares en la de Taylor et al, que había sido previamente evaluada por otro método (Ottati 2014). Se encontró que la expresión de los transcritos de los cuatro genes se ve reducida en tejido tumoral o metastásico respecto al normal, lo que apoya una posible función supresora tumoral. También se analizó la asociación de los genes con variables clínicas disponibles en PRAD-TCGA,

donde encontramos que solo la expresión de FOXO1 se asocia significativamente con parámetros clínicos de PrCa, confirmando que este gen tiene un rol conductor muy relevante en esta enfermedad, tal como se ha propuesto en la literatura (Yang, Blee et al. 2017). Por otro lado, encontramos una correlación negativa estadísticamente significativa entre la expresión de miR-183 y el nivel de ARNm de los 4 genes seleccionados. El coeficiente de correlación de Spearman (r) obtenido en todos los casos fue menor a -0,3, similar a la reportada para pares miR-blanco ya validados (Fort, Matho et al. 2018), lo cual es consistente con la existencia de una acción represora de miR-183 sobre ellos en PrCa. Con el fin de validar los resultados obtenidos en los microarreglos en las líneas celulares de PrCa, realizamos ensayos de pérdida y ganancia de función de miR-183 y cuantificamos los niveles de ARNm de los genes seleccionados por RT-qPCR. Los resultados obtenidos nos permitieron posicionar al gen **ITGB1** como el principal gen modulado por este miR entre los seleccionados. Sin embargo, dado que los miRs pueden actuar tanto a nivel de la estabilidad del ARNm como a nivel de la traducción, no podemos descartar que los otros 3 genes candidatos sean modulados por miR-183 a nivel de la traducción exclusivamente. A continuación, mediante citometría de flujo, confirmamos que miR-183 reprime la expresión de ITGB1 también a nivel de proteína. Para determinar el efecto relativo y la dinámica con la que miR-183 modifica la estabilidad y/o la traductibilidad del ARNm de ITGB1 se requerirían estudios adicionales.

Con la finalidad de conocer si la modulación de ITGB1 por miR-183 observada es debido a una **interacción directa y sitio-específica**, construimos un plásmido reportero con la 3'UTR de ITGB1 clonada corriente debajo del gen luciferasa y mutamos el sitio de unión predictivo de miR-183. Los resultados obtenidos mostraron que miR-183 produce una disminución de la actividad reportera cuando se encuentra bajo el control de la 3'UTR de ITGB1, y que este efecto se revierte cuando se muta el sitio predictivo para miR-183. A pesar de que los resultados no son confiables estadísticamente, la tendencia observada está de acuerdo con una acción represora de miR-183. El sistema de reportero que utilizamos en este ensayo recomienda la clonación de un fragmento de 20 nt aproximadamente, mientras que nosotros clonamos una región de 200nt, ya que consideramos importante evaluar el sitio de unión en su contexto de secuencia. Dado que no conocemos por completo los fundamentos del diseño de este vector y que no

hay un consenso en la literatura al respecto, sería interesante ensayar otro sistema reportero, como el de los vectores pGL3 y pGL4, los cuales son ampliamente utilizados en la literatura para testar regiones UTRs largas. Por otro lado, ITGB1 presenta dos sitios predictivos adicionales de unión de miR-183 poco conservados que aquí no los evaluamos, pero podrían ser responsables de la represión por miR-183 en la UTR endógena, pudiendo incluso hacerlo en forma sinérgica. La interacción directa entre miR-183 e ITGB1 también fue reportada en diversos tipos celulares, incluyendo fibroblastos (Li, Luna et al. 2010), cáncer cervical (Zhang, Zhang et al. 2018), cáncer de endometrio (Chen, Gu et al. 2015), melanoma (Sun, Cheng et al. 2017), lo que apoya la existencia de esta regulación en PrCa.

Por último, realizamos diferentes abordajes experimentales con el fin de estudiar el **rol de miR-183 en la adhesión celular**. En primer lugar, demostramos que la sobre-expresión de miR-183 en células DU145 y LNCaP produce una disminución en la **capacidad de adhesión** de estas células a la placa de cultivo, mientras que en células PC-3 no observamos ningún efecto. Por otro lado, observamos que el bloqueo de ITGB1 mediante un anticuerpo específico produce un efecto similar en células DU145 y PC-3, sugiriendo que la adhesión de estas células podría estar mediada en parte por ITGB1 en estas condiciones. Si bien no se observa cambio en la adhesión de las células PC-3 en respuesta a la sobre-expresión de miR-183, el bloqueo de ITGB1 sí lo produce. Asumiendo que miR-183 reprime la expresión de ITGB1 en esta línea celular, esto podría estar indicando que la represión ejercida por miR-183 sobre ITGB1 no es suficiente para modificar la adhesión celular en estas condiciones. Por otro lado, a pesar de que encontramos una disminución de la adhesión en las células LNCaP en respuesta a la sobre-expresión de miR-183, no observamos cambio cuando se bloquea directamente a ITGB1. Estos resultados podrían indicar que estas células presentan otros mecanismos preponderantes de adhesión en estas condiciones y que miR-183 podría estar afectándolos por una vía independiente de ITGB1. De hecho, según los datos de Taylor et al (Taylor, Schultz et al. 2010) y de la base de datos *Expression Atlas* disponible *online* (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>), la línea celular DU145 es la que presenta mayor expresión de ITGB1, seguida de PC-3 y por último LNCaP, lo que apoya esta interpretación y la relevancia diferencial de esta molécula en la adhesión de estas

células. Por otro lado, sería interesante estudiar el efecto de miR-183 en la adhesión de células normales de próstata, como RPWE-1, o utilizar una matriz extracelular monocomponente para evaluar directamente el efecto de miR-183 en la adhesión a un sustrato específico de ITGB1, como el colágeno de tipo IV.

Otra aproximación para estudiar la adhesión celular es analizar la **morfología** de las células durante el proceso de adhesión, ya que la misma es resultado de la acción concertada de diversas vías de señalización relacionadas. Por esto, mediante la tinción con faloidina, analizamos el efecto de miR-183 en el citoesqueleto de actina de células DU145 a 3 horas de adhesión a la placa de cultivo. Los resultados obtenidos mostraron que las células que sobre-expresan miR-183 presentan una menor área y relación de los radios, así como una mayor convexidad y circularidad respecto a las células control, indicando que miR-183 disminuye la expansión de las células sobre el sustrato durante la adhesión. Por otro lado, mediante microscopía confocal observamos que la sobre-expresión de miR-183 modifica la morfología de la célula tornándola más redondeada, produciendo una distribución del citoesqueleto de actina de forma cortical y disminuyendo la cantidad de fibras de estrés ventrales. Por último, mediante inmunocitoquímica de la proteína vinculina, encontramos que las células que sobre-expresan miR-183 presentan menor número de **adhesiones focales**. En conjunto, estos hallazgos indican que miR-183 disminuye la capacidad de adhesión de las células, probablemente por la represión directa de ITGB1 y produciendo un cambio en la morfología celular que podría promover la progresión del PrCa.

En contraste al rol supresor tumoral de ITGB1 que proponemos en este trabajo, también se le ha propuesto un rol oncogénico de esta proteína en PrCa, promoviendo la proliferación, migración e invasión (Kurozumi, Goto et al. 2016), la transición epitelio-mesenquimal (en inglés *Epithelial-Mesenchymal Transition*, EMT) (Pellinen, Blom et al. 2018) y la resistencia a la radioterapia (Broustas and Lieberman 2014). De hecho, la mayoría de los estudios sobre las integrinas en cáncer las proponen como oncogénicas, debido a que se observan sobre-expresadas en varios tipos de cáncer y a que son claves en la migración de las células con fenotipo mesenquimal (Bianconi, Unseld et al. 2016, Hamidi and Ivaska 2018). Sin embargo, recientemente se ha descrito que, bajo ciertas influencias microambientales, las células tumorales con fenotipo mesenquimal pueden

encuentran las proteínas Vimentina, N-Cadherina, Snail, Slug, Twist 1, ZEB1 y ZEB2. El análisis de la expresión de estos marcadores en PRAD-TCGA muestra una correlación negativa con miR-183, que sugiere que este miR no promueve la EMT (resultados no mostrados). En contraste, los mecanismos moleculares que promueven la MAT no se conocen del todo bien. Se sabe que durante esta transición, las células disminuyen la expresión de las integrinas y las adhesiones focales. Además, pasan de tener una morfología de tipo “huso” a una más redondeada con estructuras en la membrana similares a burbujas (en inglés, *blebs*), sin fibras de estrés, con una actina cortical altamente contráctil que permite deformar la MEC sin la necesidad de actividad proteolítica. Las interacciones de corta duración y relativamente débiles con la MEC permiten que estas células presenten una velocidad de migración entre 10 y 30 veces mayor respecto a las células mesenquimales *in vivo*, aumentando la posibilidad de metástasis de las células tumorales y, por lo tanto, la agresividad del tumor (Friedl 2004, Lammermann and Sixt 2009). Si bien no se ha descrito una firma molecular característica de esta transición, se ha visto que la activación de la vía de Rho/Rock y el silenciamiento del gen DIAPH3 promueve la MAT en PrCa (Hager, Morley et al. 2012, Morley, Hager et al. 2014). Por otro lado, se ha visto que diferentes factores microambientales, como la composición y la rigidez de la MEC, también influyen en el modo de migración que adopta la célula (Liu, Le Berre et al. 2015). Además, tanto la EMT como la MAT son mecanismos reversibles por lo que permiten a la célula tumoral adaptarse al microambiente con el que se encuentra durante la metástasis.

La similitud del fenotipo ameboidal con la morfología observada de las células DU145 en respuesta a la sobre-expresión de miR-183 nos permite postular que este miR podría promover la MAT, posiblemente en parte por la represión directa de ITGB1. Sería interesante estudiar otros aspectos de esta transición para confirmar esta hipótesis.

En suma, aquí mostramos por primera vez que miR-183 puede alterar la adhesión celular en PrCa, provocando un cambio a nivel del citoesqueleto de actina y las adhesiones focales. Asimismo, presentamos diversas evidencias que posicionan a ITGB1 como un blanco directo posible de represión por miR-183, pudiendo mediar los cambios fenotípicos

observados. Estos hallazgos nos llevan a proponer la hipótesis de que miR-183 pueda promover la transición mesenquimal-ameboidal en PrCa mediante la represión directa de ITGB1.

Como perspectivas, nos proponemos estudiar más en profundidad la contribución de los dos blancos que hemos validado, ITGB1 y PDCD4, al fenotipo adhesivo. Por un lado, podríamos utilizar siRNAs para determinar si estos genes por sí mismos contribuyen a la adhesión. Por otro lado, podríamos utilizar moléculas protectoras de blancos (en inglés, *Target Protectors*) o la sobre-expresión forzada de los genes para evaluar si el efecto producido por miR-183 es causado por la represión de estos genes. Asimismo, sería interesante analizar el cambio de las adhesiones focales mediante inmunocitoquímica con una co-marcación de vinculina e ITGB1. Por otro lado, nos proponemos determinar si miR-183 efectivamente promueve la MAT estudiando otras características de esta transición, tal como la activación de la vía de señalización de Rho/Rock así como la velocidad de migración e invasión independiente de proteólisis. Por último, sería interesante extender los estudios a líneas celulares benignas y otras líneas malignas de próstata.

BIBLIOGRAFÍA

- Acunzo, M., G. Romano, D. Wernicke and C. M. Croce (2015). "MicroRNA and cancer--a brief overview." Adv Biol Regul **57**: 1-9.
- Bader, A. G., D. Brown and M. Winkler (2010). "The promise of microRNA replacement therapy." Cancer Res **70**(18): 7027-7030.
- Barczyk, M., S. Carracedo and D. Gullberg (2010). "Integrins." Cell Tissue Res **339**(1): 269-280.
- Bianconi, D., M. Unseld and G. W. Prager (2016). "Integrins in the Spotlight of Cancer." Int J Mol Sci **17**(12).
- Bostrom, P. J., A. S. Bjartell, J. W. Catto, S. E. Eggener, H. Lilja, S. Loeb, J. Schalken, T. Schlomm and M. R. Cooperberg (2015). "Genomic Predictors of Outcome in Prostate Cancer." Eur Urol **68**(6): 1033-1044.
- Broustas, C. G. and H. B. Lieberman (2014). "RAD9 enhances radioresistance of human prostate cancer cells through regulation of ITGB1 protein levels." Prostate **74**(14): 1359-1370.
- Burrige, K. and C. Guilluy (2016). "Focal adhesions, stress fibers and mechanical tension." Exp Cell Res **343**(1): 14-20.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15524-15529.
- Cáncer, R. N. d. C. d. I. C. H. d. L. c. e. (2018). "Situación epidemiológica del Uruguay en relación al cáncer."
- Cannistraci, A., A. L. Di Pace, R. De Maria and D. Bonci (2014). "MicroRNA as new tools for prostate cancer risk assessment and therapeutic intervention: results from clinical data set and patients' samples." Biomed Res Int **2014**: 146170.
- Consortium, G. T. (2013). "The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project." Nat Genet **45**(6): 580-585.
- Costa, P. M. and M. C. Pedroso de Lima (2013). "MicroRNAs as Molecular Targets for Cancer Therapy: On the Modulation of MicroRNA Expression." Pharmaceuticals (Basel) **6**(10): 1195-1220.
- Crawford, D. V., K.; D. Shore, N. (2015). "New Biomarkers in Prostate Cancer." Oncology Journal.
- Chen, C., H. Xiang, Y. L. Peng, J. Peng and S. W. Jiang (2014). "Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway by targeting LRP6." Cell Signal **26**(6): 1155-1165.

Chen, J., L. Gu, J. Ni, P. Hu, K. Hu and Y. L. Shi (2015). "MiR-183 Regulates ITGB1P Expression and Promotes Invasion of Endometrial Stromal Cells." Biomed Res Int **2015**: 340218.

Cheng, H. H., M. Plets, H. Li, C. S. Higano, C. M. Tangen, N. Agarwal, N. J. Vogelzang, M. Hussain, I. M. Thompson, Jr., M. Tewari and E. Y. Yu (2018). "Circulating microRNAs and treatment response in the Phase II SWOG S0925 study for patients with new metastatic hormone-sensitive prostate cancer." Prostate **78**(2): 121-127.

Dai, R., S. McReynolds, T. Leroith, B. Heid, Z. Liang and S. A. Ahmed (2013). "Sex differences in the expression of lupus-associated miRNAs in splenocytes from lupus-prone NZB/WF1 mice." Biol Sex Differ **4**(1): 19.

Dai, R., Y. Zhang, D. Khan, B. Heid, D. Caudell, O. Crasta and S. A. Ahmed (2010). "Identification of a common lupus disease-associated microRNA expression pattern in three different murine models of lupus." PLoS One **5**(12): e14302.

Dambal, S., B. Baumann, T. McCray, L. Williams, Z. Richards, R. Deaton, G. S. Prins and L. Nonn (2017). "The miR-183 family cluster alters zinc homeostasis in benign prostate cells, organoids and prostate cancer xenografts." Sci Rep **7**(1): 7704.

Dambal, S., M. Shah, B. Mihelich and L. Nonn (2015). "The microRNA-183 cluster: the family that plays together stays together." Nucleic Acids Res **43**(15): 7173-7188.

Dang, C. V. (1999). "c-Myc target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism." Mol Cell Biol **19**(1): 1-11.

Davis, J., N. Salomonis, N. Ghearing, S. C. Lin, J. Q. Kwong, A. Mohan, M. S. Swanson and J. D. Molkenstein (2015). "MBNL1-mediated regulation of differentiation RNAs promotes myofibroblast transformation and the fibrotic response." Nat Commun **6**: 10084.

Djuranovic, S., A. Nahvi and R. Green (2012). "miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay." Science **336**(6078): 237-240.

Dong, T., Y. Zhang, Y. Chen, P. Liu, T. An, J. Zhang, H. Yang, W. Zhu and X. Yang (2017). "FOXO1 inhibits the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by reversing ZEB2-induced epithelial-mesenchymal transition." Oncotarget **8**(1): 1703-1713.

Esfahani, M., N. Ataei and M. Panjehpour (2015). "Biomarkers for evaluation of prostate cancer prognosis." Asian Pac J Cancer Prev **16**(7): 2601-2611.

Fabian, M. R. and N. Sonenberg (2012). "The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC." Nat Struct Mol Biol **19**(6): 586-593.

Farkas, A., S. Marcella and G. G. Rhoads (2000). "Ethnic and racial differences in prostate cancer incidence and mortality." Ethn Dis **10**(1): 69-75.

Feng, F., J. Wu, Z. Gao, S. Yu and Y. Cui (2017). "Screening the key microRNAs and transcription factors in prostate cancer based on microRNA functional synergistic relationships." Medicine (Baltimore) **96**(1): e5679.

- Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.
- Filella, X. and L. Foj (2015). "Emerging biomarkers in the detection and prognosis of prostate cancer." Clin Chem Lab Med **53**(7): 963-973.
- Filella, X. and L. Foj (2017). "miRNAs as novel biomarkers in the management of prostate cancer." Clin Chem Lab Med **55**(5): 715-736.
- Fish, L., N. Pencheva, H. Goodarzi, H. Tran, M. Yoshida and S. F. Tavazoie (2016). "Muscleblind-like 1 suppresses breast cancer metastatic colonization and stabilizes metastasis suppressor transcripts." Genes Dev **30**(4): 386-398.
- Forbes, S. A., D. Beare, H. Boutselakis, S. Bamford, N. Bindal, J. Tate, C. G. Cole, S. Ward, E. Dawson, L. Ponting, R. Stefancsik, B. Harsha, C. Y. Kok, M. Jia, H. Jubb, Z. Sondka, S. Thompson, T. De and P. J. Campbell (2017). "COSMIC: somatic cancer genetics at high-resolution." Nucleic Acids Res **45**(D1): D777-D783.
- Fort, R. S., C. Matho, C. Oliveira-Rizzo, B. Garat, J. R. Sotelo-Silveira and M. A. Duhagon (2018). "An integrated view of the role of miR-130b/301b miRNA cluster in prostate cancer." Exp Hematol Oncol **7**: 10.
- Frank, S., P. Nelson and V. Vasioukhin (2018). "Recent advances in prostate cancer research: large-scale genomic analyses reveal novel driver mutations and DNA repair defects." F1000Res **7**.
- Friedl, P. (2004). "Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration." Curr Opin Cell Biol **16**(1): 14-23.
- Friedl, P. and K. Wolf (2003). "Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms." Nat Rev Cancer **3**(5): 362-374.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." Genome Res **19**(1): 92-105.
- Gao, W., S. Lin, C. Cheng, A. Zhu, Y. Hu, Z. Shi, X. Zhang and Z. Hong (2018). "Long non-coding RNA CASC2 regulates Sprouty2 via functioning as a competing endogenous RNA for miR-183 to modulate the sensitivity of prostate cancer cells to docetaxel." Arch Biochem Biophys.
- Gao, Z., R. Liu, N. Ye, C. Liu, X. Li, X. Guo, Z. Zhang, X. Li, Y. Yao and X. Jiang (2018). "FOXO1 Inhibits Tumor Cell Migration via Regulating Cell Surface Morphology in Non-Small Cell Lung Cancer Cells." Cell Physiol Biochem **48**(1): 138-148.
- Goel, H. L., M. Fornaro, L. Moro, N. Teider, J. S. Rhim, M. King and L. R. Languino (2004). "Selective modulation of type 1 insulin-like growth factor receptor signaling and functions by beta1 integrins." J Cell Biol **166**(3): 407-418.
- Gokhale, A., R. Kunder, A. Goel, R. Sarin, A. Moiyadi, A. Shenoy, C. Mamidipally, S. Noronha, S. Kannan and N. V. Shirsat (2010). "Distinctive microRNA signature of medulloblastomas associated with the WNT signaling pathway." J Cancer Res Ther **6**(4): 521-529.

- Gorlov, I. P., J. Byun, O. Y. Gorlova, A. M. Aparicio, E. Efstathiou and C. J. Logothetis (2009). "Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data." BMC Med Genomics **2**: 48.
- Gregory, P. A., C. P. Bracken, A. G. Bert and G. J. Goodall (2008). "MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition." Cell Cycle **7**(20): 3112-3118.
- Guttilla, I. K. and B. A. White (2009). "Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells." J Biol Chem **284**(35): 23204-23216.
- Hager, M. H., S. Morley, D. R. Bielenberg, S. Gao, M. Morello, I. N. Holcomb, W. Liu, G. Mouneimne, F. Demichelis, J. Kim, K. R. Solomon, R. M. Adam, W. B. Isaacs, H. N. Higgs, R. L. Vessella, D. Di Vizio and M. R. Freeman (2012). "DIAPH3 governs the cellular transition to the amoeboid tumour phenotype." EMBO Mol Med **4**(8): 743-760.
- Hamidi, H. and J. Ivaska (2018). "Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis." Nat Rev Cancer **18**(9): 533-548.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." Cancer Cell **21**(3): 309-322.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hanke, M., K. Hoefig, H. Merz, A. C. Feller, I. Kausch, D. Jocham, J. M. Warnecke and G. Sczakiel (2010). "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer." Urol Oncol **28**(6): 655-661.
- Hayes, J., P. P. Peruzzi and S. Lawler (2014). "MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy." Trends Mol Med **20**(8): 460-469.
- Hickman, E. S., M. C. Moroni and K. Helin (2002). "The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer." Curr Opin Genet Dev **12**(1): 60-66.
- Hirata, H., K. Ueno, V. Shahryari, G. Deng, Y. Tanaka, Z. L. Tabatabai, Y. Hinoda and R. Dahiya (2013). "MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer." PLoS One **8**(1): e55502.
- Jiang, L., P. Mao, L. Song, J. Wu, J. Huang, C. Lin, J. Yuan, L. Qu, S. Y. Cheng and J. Li (2010). "miR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patient survival." Am J Pathol **177**(1): 29-38.
- Kent, O. A. and J. T. Mendell (2006). "A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes." Oncogene **25**(46): 6188-6196.
- Khanmi, K., S. Ignacimuthu and M. G. Paulraj (2015). "MicroRNA in prostate cancer." Clin Chim Acta.
- Kral, M., V. Rosinska, V. Student, M. Grepl, M. Hrabec and J. Bouchal (2011). "Genetic determinants of prostate cancer: a review." Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **155**(1): 3-9.

- Kretschmer, A. and D. Tilki (2017). "Biomarkers in prostate cancer - Current clinical utility and future perspectives." Crit Rev Oncol Hematol **120**: 180-193.
- Kurozumi, A., Y. Goto, R. Matsushita, I. Fukumoto, M. Kato, R. Nishikawa, S. Sakamoto, H. Enokida, M. Nakagawa, T. Ichikawa and N. Seki (2016). "Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer." Cancer Sci **107**(1): 84-94.
- Kye, M. J., E. D. Niederst, M. H. Wertz, C. Goncalves Ido, B. Akten, K. Z. Dover, M. Peters, M. Riessland, P. Neveu, B. Wirth, K. S. Kosik, S. P. Sardi, U. R. Monani, M. A. Passini and M. Sahin (2014). "SMN regulates axonal local translation via miR-183/mTOR pathway." Hum Mol Genet **23**(23): 6318-6331.
- Lammermann, T. and M. Sixt (2009). "Mechanical modes of 'amoeboid' cell migration." Curr Opin Cell Biol **21**(5): 636-644.
- Larkin, S. E., B. Zeidan, M. G. Taylor, B. Bickers, J. Al-Ruwaili, C. Aukim-Hastie and P. A. Townsend (2010). "Proteomics in prostate cancer biomarker discovery." Expert Rev Proteomics **7**(1): 93-102.
- Larne, O., E. Martens-Uzunova, Z. Hagman, A. Edsjo, G. Lippolis, M. S. den Berg, A. Bjartell, G. Jenster and Y. Ceder (2013). "miQ--a novel microRNA based diagnostic and prognostic tool for prostate cancer." Int J Cancer **132**(12): 2867-2875.
- Lawrie, C. H., S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A. H. Banham, F. Pezzella, J. Boultonwood, J. S. Wainscoat, C. S. Hatton and A. L. Harris (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma." Br J Haematol **141**(5): 672-675.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
- Leidinger, P., M. Hart, C. Backes, S. Rheinheimer, B. Keck, B. Wullich, A. Keller and E. Meese (2016). "Differential blood-based diagnosis between benign prostatic hyperplasia and prostate cancer: miRNA as source for biomarkers independent of PSA level, Gleason score, or TNM status." Tumour Biol **37**(8): 10177-10185.
- Leon, J., I. Guerrero and A. Pellicer (1987). "Differential expression of the *ras* gene family in mice." Mol Cell Biol **7**(4): 1535-1540.
- Li, D., X. Hao and Y. Song (2018). "Identification of the Key MicroRNAs and the miRNA-mRNA Regulatory Pathways in Prostate Cancer by Bioinformatics Methods." Biomed Res Int **2018**: 6204128.
- Li, G., C. Luna, J. Qiu, D. L. Epstein and P. Gonzalez (2010). "Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183." J Biol Chem **285**(8): 5461-5471.
- Li, J., H. Fu, C. Xu, Y. Tie, R. Xing, J. Zhu, Y. Qin, Z. Sun and X. Zheng (2010). "miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells." BMC Cancer **10**: 354.

- Li, J., S. Liang, H. Jin, C. Xu, D. Ma and X. Lu (2012). "Tiam1, negatively regulated by miR-22, miR-183 and miR-31, is involved in migration, invasion and viability of ovarian cancer cells." Oncol Rep **27**(6): 1835-1842.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe and K. Hemminki (2000). "Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland." N Engl J Med **343**(2): 78-85.
- Lin, H., T. Dai, H. Xiong, X. Zhao, X. Chen, C. Yu, J. Li, X. Wang and L. Song (2010). "Unregulated miR-96 induces cell proliferation in human breast cancer by downregulating transcriptional factor FOXO3a." PLoS One **5**(12): e15797.
- Lin, H. M., K. L. Mahon, C. Spielman, H. Gurney, G. Mallesara, M. R. Stockler, P. Bastick, K. Briscoe, G. Marx, A. Swarbrick and L. G. Horvath (2017). "Phase 2 study of circulating microRNA biomarkers in castration-resistant prostate cancer." Br J Cancer **116**(8): 1002-1011.
- Liu, A. M., T. J. Yao, W. Wang, K. F. Wong, N. P. Lee, S. T. Fan, R. T. Poon, C. Gao and J. M. Luk (2012). "Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study." BMJ Open **2**(2): e000825.
- Liu, J., M. Zheng, Y. L. Tang, X. H. Liang and Q. Yang (2011). "MicroRNAs, an active and versatile group in cancers." Int J Oral Sci **3**(4): 165-175.
- Liu, Y. J., M. Le Berre, F. Lautenschlaeger, P. Maiuri, A. Callan-Jones, M. Heuze, T. Takaki, R. Voituriez and M. Piel (2015). "Confinement and low adhesion induce fast amoeboid migration of slow mesenchymal cells." Cell **160**(4): 659-672.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
- Lodrini, M., I. Oehme, C. Schroeder, T. Milde, M. C. Schier, A. Kopp-Schneider, J. H. Schulte, M. Fischer, K. De Preter, F. Pattyn, M. Castoldi, M. U. Muckenthaler, A. E. Kulozik, F. Westermann, O. Witt and H. E. Deubzer (2013). "MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma." Nucleic Acids Res **41**(12): 6018-6033.
- Loster, K. and R. Horstkorte (2000). "Enzymatic quantification of cell-matrix and cell-cell adhesion." Micron **31**(1): 41-53.
- Lowery, A. J., N. Miller, R. M. Dwyer and M. J. Kerin (2010). "Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells." BMC Cancer **10**: 502.
- Lu, Y. Y., J. Y. Zheng, J. Liu, C. L. Huang, W. Zhang and Y. Zeng (2015). "miR-183 induces cell proliferation, migration, and invasion by regulating PDCD4 expression in the SW1990 pancreatic cancer cell line." Biomed Pharmacother **70**: 151-157.
- Lynam-Lennon, N., S. G. Maher and J. V. Reynolds (2009). "The roles of microRNA in cancer and apoptosis." Biol Rev Camb Philos Soc **84**(1): 55-71.

Malumbres, M. and M. Barbacid (2003). "RAS oncogenes: the first 30 years." Nat Rev Cancer **3**(6): 459-465.

Martens-Uzunova, E. S., S. E. Jalava, N. F. Dits, G. J. van Leenders, S. Moller, J. Trapman, C. H. Bangma, T. Litman, T. Visakorpi and G. Jenster (2012). "Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer." Oncogene **31**(8): 978-991.

Mihelich, B. L., S. Dambal, S. Lin and L. Nonn (2016). "miR-182, of the miR-183 cluster family, is packaged in exosomes and is detected in human exosomes from serum, breast cells and prostate cells." Oncol Lett **12**(2): 1197-1203.

Mihelich, B. L., E. A. Khramtsova, N. Arva, A. Vaishnav, D. N. Johnson, A. A. Giangreco, E. Martens-Uzunova, O. Bagasra, A. Kajdacsy-Balla and L. Nonn (2011). "miR-183-96-182 cluster is overexpressed in prostate tissue and regulates zinc homeostasis in prostate cells." J Biol Chem **286**(52): 44503-44511.

Monteys, A. M., R. M. Spengler, J. Wan, L. Tecedor, K. A. Lennox, Y. Xing and B. L. Davidson (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." RNA **16**(3): 495-505.

Morley, S., M. H. Hager, S. G. Pollan, B. Knudsen, D. Di Vizio and M. R. Freeman (2014). "Trading in your spindles for blebs: the amoeboid tumor cell phenotype in prostate cancer." Asian J Androl **16**(4): 530-535.

Myatt, S. S., J. Wang, L. J. Monteiro, M. Christian, K. K. Ho, L. Fusi, R. E. Dina, J. J. Brosens, S. Ghaem-Maghami and E. W. Lam (2010). "Definition of microRNAs that repress expression of the tumor suppressor gene FOXO1 in endometrial cancer." Cancer Res **70**(1): 367-377.

Nwosu, V., J. Carpten, J. M. Trent and R. Sheridan (2001). "Heterogeneity of genetic alterations in prostate cancer: evidence of the complex nature of the disease." Hum Mol Genet **10**(20): 2313-2318.

Ohtsuka, M., H. Ling, Y. Doki, M. Mori and G. A. Calin (2015). "MicroRNA Processing and Human Cancer." J Clin Med **4**(8): 1651-1667.

Oliveira-Rizzo, C. (2015). Estudio de la Interacción entre el oncomir hsa-miR-183-5p y el supresor de tumor PDCD4 en Cáncer de Próstata. Grado, Facultad de Ciencias UdelaR.

Ottati, C. C., Santiago; Fort, Rafael; Oliveira, Carolina; Sotelo, José; Duhagon, María Ana (2015). MOLECULAR BASIS OF HSA-MIR-183-5P ONCOGENIC ACTION IN PROSTATE CANCER. 23rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology. Foz do Iguçu, PR, Brazil.

Ottati, M. (2014). Estudio de hsa-miR-183-5p en Cáncer de Próstata e identificación de sus blancos de acción. Maestría, Facultad de Ciencias.

Paziewska, A., M. Mikula, M. Dabrowska, M. Kulecka, K. Goryca, A. Antoniewicz, J. Dobruch, A. Borowka, P. Rutkowski and J. Ostrowski (2018). "Candidate diagnostic miRNAs that can detect cancer in prostate biopsy." Prostate **78**(3): 178-185.

Pellinen, T., S. Blom, S. Sanchez, K. Valimaki, J. P. Mpindi, H. Azegrouz, R. Strippoli, R. Nieto, M. Viton, I. Palacios, R. Turkki, Y. Wang, M. Sanchez-Alvarez, S. Nordling, A. Butzow, T. Mirtti, A. Rannikko, M. C. Montoya, O. Kallioniemi and M. A. Del Pozo (2018). "ITGB1-dependent upregulation of Caveolin-1 switches TGFbeta signalling from tumour-suppressive to oncogenic in prostate cancer." Sci Rep **8**(1): 2338.

Pierce, G. B., R. H. Shikes and L. M. Fink (1978). Cancer: A Problem of Developmental Biology, Prentice-Hall.

Porkka, K. P., M. J. Pfeiffer, K. K. Waltering, R. L. Vessella, T. L. Tammela and T. Visakorpi (2007). "MicroRNA expression profiling in prostate cancer." Cancer Res **67**(13): 6130-6135.

Pritchard, C. C., H. H. Cheng and M. Tewari (2012). "MicroRNA profiling: approaches and considerations." Nat Rev Genet **13**(5): 358-369.

Ragan, C., M. Zuker and M. A. Ragan (2011). "Quantitative prediction of miRNA-mRNA interaction based on equilibrium concentrations." PLoS Comput Biol **7**(2): e1001090.

Reiss, K., J. Y. Wang, G. Romano, F. B. Furnari, W. K. Cavenee, A. Morrione, X. Tu and R. Baserga (2000). "IGF-I receptor signaling in a prostatic cancer cell line with a PTEN mutation." Oncogene **19**(22): 2687-2694.

Reiss, K., J. Y. Wang, G. Romano, X. Tu, F. Peruzzi and R. Baserga (2001). "Mechanisms of regulation of cell adhesion and motility by insulin receptor substrate-1 in prostate cancer cells." Oncogene **20**(4): 490-500.

Ren, L. H., W. X. Chen, S. Li, X. Y. He, Z. M. Zhang, M. Li, R. S. Cao, B. Hao, H. J. Zhang, H. Q. Qiu and R. H. Shi (2014). "MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4." Br J Cancer **111**(10): 2003-2013.

Rhodes, D. R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey and A. M. Chinnaiyan (2004). "ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform." Neoplasia **6**(1): 1-6.

Sanchez-Mora, C., J. A. Ramos-Quiroga, I. Garcia-Martinez, N. Fernandez-Castillo, R. Bosch, V. Richarte, G. Palomar, M. Nogueira, M. Corrales, C. Daigre, N. Martinez-Luna, L. Grau-Lopez, C. Toma, B. Cormand, C. Roncero, M. Casas and M. Ribases (2013). "Evaluation of single nucleotide polymorphisms in the miR-183-96-182 cluster in adulthood attention-deficit and hyperactivity disorder (ADHD) and substance use disorders (SUDs)." Eur Neuropsychopharmacol **23**(11): 1463-1473.

Sarver, A. L., A. J. French, P. M. Borralho, V. Thayanithy, A. L. Oberg, K. A. Silverstein, B. W. Morlan, S. M. Riska, L. A. Boardman, J. M. Cunningham, S. Subramanian, L. Wang, T. C. Smyrk, C. M. Rodrigues, S. N. Thibodeau and C. J. Steer (2009). "Human colon cancer profiles show differential microRNA expression depending on mismatch repair status and are characteristic of undifferentiated proliferative states." BMC Cancer **9**: 401.

Schaefer, A., M. Jung, H. J. Mollenkopf, I. Wagner, C. Stephan, F. Jentzmik, K. Miller, M. Lein, G. Kristiansen and K. Jung (2010). "Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma." Int J Cancer **126**(5): 1166-1176.

Sharma, N. and M. M. Baruah (2018). "The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer." Clin Transl Oncol.

Shaw, L. M. (2001). "Identification of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) and IRS-2 as signaling intermediates in the alpha6beta4 integrin-dependent activation of phosphoinositide 3-OH kinase and promotion of invasion." Mol Cell Biol **21**(15): 5082-5093.

Song, C. J., H. Chen, L. Z. Chen, G. M. Ru, J. J. Guo and Q. N. Ding (2018). "The potential of microRNAs as human prostate cancer biomarkers: A meta-analysis of related studies." J Cell Biochem **119**(3): 2763-2786.

Song, L., L. Liu, Z. Wu, Y. Li, Z. Ying, C. Lin, J. Wu, B. Hu, S. Y. Cheng, M. Li and J. Li (2012). "TGF-beta induces miR-182 to sustain NF-kappaB activation in glioma subsets." J Clin Invest **122**(10): 3563-3578.

Souza, M. F., H. Kuasne, M. C. Barros-Filho, H. L. Ciliao, F. A. Marchi, P. E. Fuganti, A. R. Paschoal, S. R. Rogatto and I. M. S. Colus (2017). "Circulating mRNAs and miRNAs as candidate markers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer." PLoS One **12**(9): e0184094.

Srivastava, A., H. Goldberger, A. Dimtchev, M. Ramalinga, J. Chijioke, C. Marian, E. K. Oermann, S. Uhm, J. S. Kim, L. N. Chen, X. Li, D. L. Berry, B. V. Kallakury, S. C. Chauhan, S. P. Collins, S. Suy and D. Kumar (2013). "MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214." PLoS One **8**(10): e76994.

Stephan, C., M. Jung, S. Rabenhorst, E. Kilic and K. Jung (2015). "Urinary miR-183 and miR-205 do not surpass PCA3 in urine as predictive markers for prostate biopsy outcome despite their highly dysregulated expression in prostate cancer tissue." Clin Chem Lab Med **53**(7): 1109-1118.

Stuopelyte, K., K. Daniunaite, A. Bakavicius, J. R. Lazutka, F. Jankevicius and S. Jarmalaite (2016). "The utility of urine-circulating miRNAs for detection of prostate cancer." Br J Cancer **115**(6): 707-715.

Sun, Y., H. Cheng, G. Wang, G. Yu, D. Zhang, Y. Wang, W. Fan and W. Yang (2017). "Deregulation of miR-183 promotes melanoma development via lncRNA MALAT1 regulation and ITGB1 signal activation." Oncotarget **8**(2): 3509-3518.

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

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

Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T.

Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers and W. L. Gerald (2010). "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." Cancer Cell **18**(1): 11-22.

Tomlins, S. A., J. R. Day, R. J. Lonigro, D. H. Hovelson, J. Siddiqui, L. P. Kunju, R. L. Dunn, S. Meyer, P. Hodge, J. Groskopf, J. T. Wei and A. M. Chinnaiyan (2016). "Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment." Eur Urol **70**(1): 45-53.

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

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

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

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

Uhlen, M., L. Fagerberg, B. M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C. A. Szigartyo, J. Odeberg, D. Djureinovic, J. O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P. H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J. M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen and F. Ponten (2015). "Proteomics. Tissue-based map of the human proteome." Science **347**(6220): 1260419.

Venables, J. P., J. P. Brosseau, G. Gadea, R. Klinck, P. Prinos, J. F. Beaulieu, E. Lapointe, M. Durand, P. Thibault, K. Tremblay, F. Rousset, J. Tazi, S. Abou Elela and B. Chabot (2013). "RBFox2 is an important regulator of mesenchymal tissue-specific splicing in both normal and cancer tissues." Mol Cell Biol **33**(2): 396-405.

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

Vuori, K. and E. Ruoslahti (1994). "Association of insulin receptor substrate-1 with integrins." Science **266**(5190): 1576-1578.

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

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

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

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

Wang, J. Y., E. Gualco, F. Peruzzi, B. E. Sawaya, G. Passiatore, C. Marcinkiewicz, I. Staniszewska, P. Ferrante, S. Amini, K. Khalili and K. Reiss (2007). "Interaction between serine phosphorylated IRS-1 and beta1-integrin affects the stability of neuronal processes." J Neurosci Res **85**(11): 2360-2373.

Wang, S. Y., J. E. Cowan, K. C. Cary, J. M. Chan, P. R. Carroll and M. R. Cooperberg (2014). "Limited ability of existing nomograms to predict outcomes in men undergoing active surveillance for prostate cancer." BJU Int **114**(6b): E18-E24.

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

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

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

Wilczynska, A. and M. Bushell (2015). "The complexity of miRNA-mediated repression." Cell Death Differ **22**(1): 22-33.

Winograd-Katz, S. E., R. Fassler, B. Geiger and K. R. Legate (2014). "The integrin adhesome: from genes and proteins to human disease." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(4): 273-288.

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

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

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

- Xu, X. M., J. C. Qian, Z. L. Deng, Z. Cai, T. Tang, P. Wang, K. H. Zhang and J. P. Cai (2012). "Expression of miR-21, miR-31, miR-96 and miR-135b is correlated with the clinical parameters of colorectal cancer." *Oncol Lett* **4**(2): 339-345.
- Yamada, Y., H. Enokida, S. Kojima, K. Kawakami, T. Chiyomaru, S. Tatarano, H. Yoshino, K. Kawahara, K. Nishiyama, N. Seki and M. Nakagawa (2011). "MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology." *Cancer Sci* **102**(3): 522-529.
- Yan, Z., J. Wang, C. Wang, Y. Jiao, W. Qi and S. Che (2014). "miR-96/HBP1/Wnt/beta-catenin regulatory circuitry promotes glioma growth." *FEBS Lett* **588**(17): 3038-3046.
- Yang, C. L., X. L. Zheng, K. Ye, H. Ge, Y. N. Sun, Y. F. Lu and Q. X. Fan (2018). "MicroRNA-183 Acts as a Tumor Suppressor in Human Non-Small Cell Lung Cancer by Down-Regulating MTA1." *Cell Physiol Biochem* **46**(1): 93-106.
- Yang, Y., A. M. Blee, D. Wang, J. An, Y. Pan, Y. Yan, T. Ma, Y. He, J. Dugdale, X. Hou, J. Zhang, S. J. Weroha, W. G. Zhu, Y. A. Wang, R. A. DePinho, W. Xu and H. Huang (2017). "Loss of FOXO1 Cooperates with TMPRSS2-ERG Overexpression to Promote Prostate Tumorigenesis and Cell Invasion." *Cancer Res* **77**(23): 6524-6537.
- Ye, Y., S. L. Li and S. Y. Wang (2018). "Construction and analysis of mRNA, miRNA, lncRNA, and TF regulatory networks reveal the key genes associated with prostate cancer." *PLoS One* **13**(8): e0198055.
- Yu, H., Y. Liu, L. Bai, A. Kijlstra and P. Yang (2014). "Predisposition to Behcet's disease and VKH syndrome by genetic variants of miR-182." *J Mol Med (Berl)* **92**(9): 961-967.
- Zhang, B., S. Kirov and J. Snoddy (2005). "WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts." *Nucleic Acids Res* **33**(Web Server issue): W741-748.
- Zhang, Q. H., H. M. Sun, R. Z. Zheng, Y. C. Li, Q. Zhang, P. Cheng, Z. H. Tang and F. Huang (2013). "Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues." *Gene* **527**(1): 26-32.
- Zhang, W., M. Zhang, L. Liu, D. Jin, P. Wang and J. Hu (2018). "MicroRNA-183-5p Inhibits Aggressiveness of Cervical Cancer Cells by Targeting Integrin Subunit Beta 1 (ITGB1)." *Med Sci Monit* **24**: 7137-7145.
- Zhang, X. L., S. H. Pan, J. J. Yan and G. Xu (2018). "The prognostic value of microRNA-183 in human cancers: A meta-analysis." *Medicine (Baltimore)* **97**(26): e11213.
- Zhong, X. and F. J. Rescorla (2012). "Cell surface adhesion molecules and adhesion-initiated signaling: understanding of anoikis resistance mechanisms and therapeutic opportunities." *Cell Signal* **24**(2): 393-401.
- Zhou, L., W. G. Zhang, D. S. Wang, K. S. Tao, W. J. Song and K. F. Dou (2014). "MicroRNA-183 is involved in cell proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating Bmi-1." *Oncol Rep* **32**(4): 1734-1740.

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

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