



Efecto del hsa-mir-301b en cáncer de próstata: proliferación celular y actividad de sus posibles genes blancos

Tesina de Grado
Licenciatura en Bioquímica

Laboratorio de Interacciones Moleculares (Fac. Ciencias)
Departamento de Genética (Fac. Medicina)

Orientador: **Dra. María Ana Duhagon**

Rafael S. Fort Canobra

Facultad de Ciencias
Universidad de la República
Febrero 2012

Índice

Introducción.....	3
El cáncer.....	3
Desarrollo del cáncer.....	3
<i>Mantenimiento de las señales de proliferación.</i>	<i>4</i>
<i>Evasión de las señales antiproliferativas.....</i>	<i>5</i>
<i>Resistencia a la muerte celular.....</i>	<i>5</i>
<i>Desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal.</i>	<i>6</i>
<i>Adquisición de capacidad invasiva.</i>	<i>7</i>
<i>Desarrollo del PCa.</i>	<i>8</i>
<i>Una visión molecular del PCa.</i>	<i>10</i>
<i>Clínica del PCa.</i>	<i>11</i>
<i>Detección del PCa.</i>	<i>12</i>
Células Madre de Cáncer.....	13
<i>Origen de la teoría de las CSCs.</i>	<i>14</i>
<i>Origen de las CSCs</i>	<i>16</i>
<i>El microambiente de las CSCs.....</i>	<i>18</i>
<i>CSCs y la clínica del cáncer.</i>	<i>19</i>
MicroARNs.....	21
<i>Biogénesis.....</i>	<i>22</i>
<i>Mecanismos de represión génica.</i>	<i>24</i>
<i>MicroARNs y las patologías.....</i>	<i>25</i>
<i>MicroARNs y cáncer.....</i>	<i>26</i>
<i>MicroARNs y cáncer de próstata.</i>	<i>27</i>
<i>MicroARNs y células madre de cáncer.</i>	<i>28</i>
<i>MicroARNs como Biomarcadores.....</i>	<i>30</i>
Antecedentes.....	32
Antecedentes del trabajo.....	32
Antecedentes del hsa-mir-301b.....	38
Objetivo general.....	41
Objetivos específicos.....	41
Hipótesis del trabajo.....	41
Materiales y Métodos:.....	42
Líneas celulares:.....	42
Vector lentiviral:.....	43
Medio de cultivo:.....	44
Descompletación del Suero Fetal Bovino:.....	45

Descongelado de crioviales:	45
Mantenimiento del cultivo:.....	45
Subcultivo o Repique de la monocapa de células:	46
Recuento en cámara de Neubauer:.....	47
Congelado de células en crioviales:	47
Selección de las células transfectantes con el antibiótico Neomicina:.....	48
Prueba de detección de <i>Mycoplasma</i>	48
Detección de <i>Mycoplasma</i> utilizando el <i>kit</i> MycoQuick:.....	49
Detección de <i>Mycoplasma</i> utilizando el <i>kit</i> no comercial:.....	50
Cuantificación del nivel de expresión del hsa-mir-301b en las líneas celulares transfectantes:.....	51
Estudio de la proliferación celular: Recuento de células viables	53
Estudio de la proliferación celular: Ensayo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-yl)-bromato de 2,5-difeniltetrazolium (MTT):	54
Estudio de la proliferación celular: Análisis de citometría de flujo:.....	55
Análisis de la actividad de los posibles genes blancos del hsa-mir-301b.....	56
Análisis del hsa-mir-301b en el programa Diana Lab Mirpath.....	60
Resultados y Discusión.....	62
Selección de las líneas celulares transfectantes de DU145.....	62
Cuantificación del nivel del hsa-mir-301b en las líneas transfectantes.....	63
Extracción de ARN de las líneas transfectantes de DU145 y LNCaP.	63
qRT-PCR.....	64
Ensayo de <i>Mycoplasma</i>	67
Estudio de la proliferación celular.	69
Estudio de Proliferación por recuento de células en el tiempo.	69
Ensayo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-yl)-bromato de 2,5-difeniltetrazolium (MTT). .	73
Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.....	78
Análisis de la actividad de los posibles genes blancos del hsa-mir-301b.....	82
Análisis en Diana MirPath.	99
Conclusiones y Perspectivas.....	106
Bibliografía.....	108
ANEXO.....	118

Introducción.

El cáncer.

Cáncer es un término general utilizado para identificar un amplio número de patologías, que pueden afectar a cualquier órgano o tejido del cuerpo. Específicamente, puede definirse como un grupo heterogéneo de trastornos, caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular (Pierce, Shikes et al. (1978)). El cáncer puede ser hereditario producto de mutaciones que afectan uno o ambos alelos de las células germinales, o esporádico producto de mutaciones espontáneas y de la acción de agentes carcinógenos ambientales. Una gran variedad de factores se encuentran involucrados en el origen del cáncer e influyen en el riesgo de padecerlo. Estos incluyen tanto factores intrínsecos de la célula como factores ambientales (virus, radiaciones o sustancias químicas). Cerca del 80% de los cánceres esporádicos se deben a exposición ambiental (Leon, J., I. Guerrero, et al. (1987)). Es conocido que ciertas infecciones pueden estimular e inducir el desarrollo del cáncer (Uma Devi, P. and M. Hossain (2000), De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2006)). A pesar del intenso esfuerzo internacional destinado al conocimiento acerca de los cambios moleculares y celulares involucrados en el inicio y desarrollo del cáncer, aún continúa siendo este el principal azote a la salud humana. El cáncer es la primera causa de muerte a nivel mundial, alcanzando 7,6 millones de muertes en 2008 (Globocan 2008, IARC, 2010). De hecho, se estima que para el 2030 esta cifra aumente hasta los 11,5 millones afectados. En Uruguay específicamente, se registran más de 14.000 nuevos casos por año, y mueren unas 7.700 personas a causa de esta enfermedad.

Desarrollo del cáncer.

La bibliografía actual acerca de la temática cáncer, reporta que en el transcurso del proceso de carcinogénesis, existen una serie de cambios o alteraciones fenotípicas que resultan ineludibles en el proceso de transformación a células cancerosas. Esta serie de alteraciones pueden resumirse en las mencionadas a continuación: capacidad de autosuficiencia en el desarrollo de señales de crecimiento y mantenimiento de señales

de proliferación, evasión de las señales antiproliferativas, activación y adquisición de capacidad invasiva (metástasis), desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal, inducción de la angiogénesis y resistencia a la muerte celular (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

A continuación, se describe brevemente y conceptualmente las alteraciones o capacidades necesarias (FIGURA 1) en el proceso carcinogénico de transformación a células cancerosas.

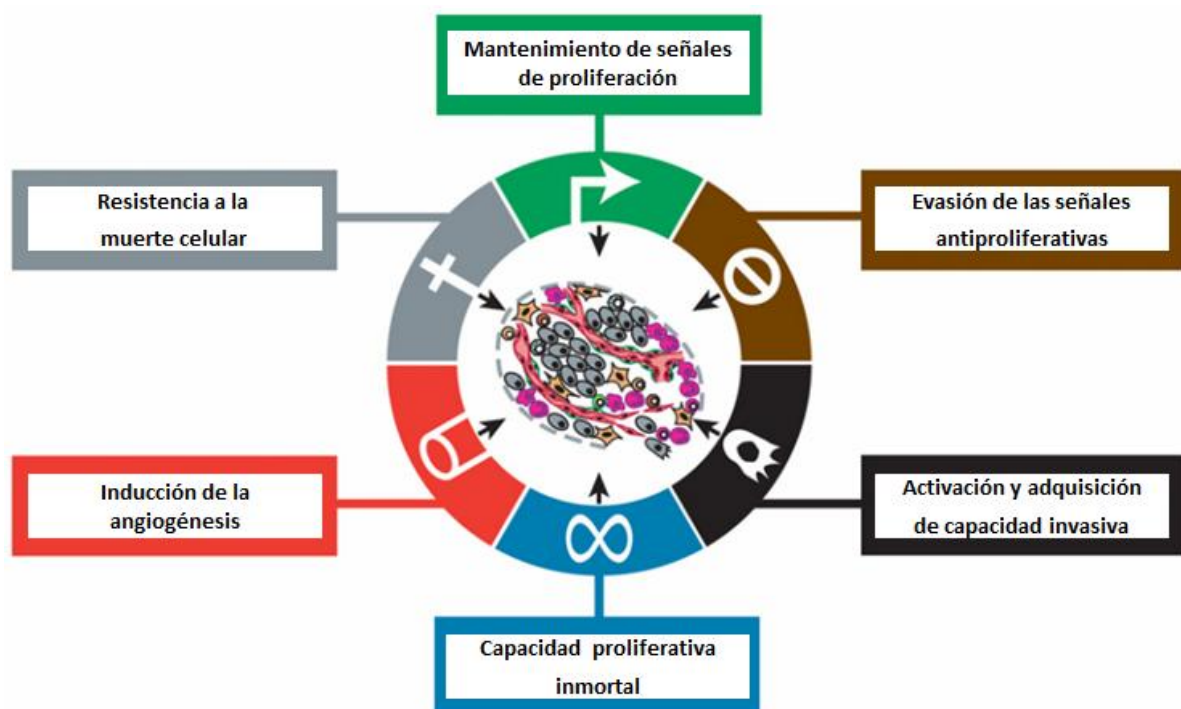


Figura 1. Esquema que resume las diferentes capacidades o alteraciones que debe experimentar una célula normal en el desarrollo del cáncer (carcinogénesis). Imagen modificada, extraída de Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011).

Mantenimiento de las señales de proliferación.

El pasaje de células normales en estado quiescente hacia el estado de proliferación activo, requiere de la estricta integración de señales externas, factores de activación mitótica y de crecimiento. Por lo tanto, las células normales dependen de la continua lectura e interpretación de estas señales y mensajes, para mantener una correcta regulación del ciclo celular. En las células cancerosas, la situación es completamente distinta, durante el transcurso del proceso de transformación hacia células tumorales,

las células desarrollan independencia a las señales externas. Cambios genéticos y epigenéticos, que conllevarán a la modulación de las vías que participan en la producción y recepción de dichas señales. Es interesante señalar, que muchos de los oncogenes y genes supresores reportados en la bibliografía, pertenecen al conjunto de factores que participan en la modulación del ciclo celular. La modulación de estas vías, provoca la conformación de un microambiente interno, que conllevará al mantenimiento de un estado proliferante activo y la adquisición de autonomía de señales de crecimiento. Lo que determina que la célula crezca y prolifere descontrolada e independientemente de las señales externas (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

Evasión de las señales antiproliferativas.

De la misma manera que existe una gran variedad de señales de proliferación y crecimiento celular, igualmente se han reportado una gran variedad de señales de inhibición de la proliferación, que inducen un estado de quiescencia celular. La acción de estas señales, puede derivar en dos tipos de respuestas, una de ellas, la entrada en un estado quiescente en G₀, reversible; la otra, el ingreso a un estado específico de diferenciación post-mitótico, de ausencia de proliferación, irreversible. Se ha reportado que las células tumorales evaden y no responden a estas señales, escapando al ingreso de los estados antiproliferativos que dichas señales provocan (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

Resistencia a la muerte celular

El crecimiento tumoral no solo está gobernado por la tasa de crecimiento, sino que también, por la tasa de muerte celular. La muerte celular programada o apoptosis, es la activación de una serie de mecanismos intrínsecos que desatan la autodestrucción celular. La continua integración de las señales transmitidas a través de los sensores celulares, determina si la célula vive o muere. De este modo, un gran número de señales positivas para la apoptosis, activarán en la célula la apoptosis. Las células tumorales sufren alteraciones genéticas y epigenéticas que les permiten evadir estas

señales y así volverse resistentes a la apoptosis (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

Desarrollo de una capacidad proliferativa inmortal.

La capacidad de autonomía de señales de crecimiento, la insesibilidad a las señales de inhibición de crecimiento y la resistencia a la apoptosis, conllevan al desarrollo de un programa de crecimiento celular independiente de las señales del ambiente. A pesar de esto, las células poseen un programa autónomo que limita el número de divisiones celulares. Un gran número de estudios, muestra que las células pueden desarrollar un número finito de replicaciones. Se denomina senescencia celular, al proceso en que las células interrumpen el estado replicativo y dejan de crecer luego de atravesar un determinado número de divisiones. La mayoría de las células tumorales, durante la carcinogénesis atraviesan un estado crítico producto de la senescencia celular. En este momento, acontece una muerte celular masiva acompañada de un gran conjunto de anomalías cariotípicas (fundamentalmente fusiones de cromosomas por sus extremos). Este fenómeno conllevará a la aparición de una variante celular, que adquiere la habilidad de proseguir con las divisiones celulares, sobreponiéndose a la senescencia celular. Las células deben adquirir la capacidad replicación infinita (inmortalización) como parte del proceso de transformación maligna (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

Inducción de la angiogénesis.

Aunque las células tumorales adquieran las características fenotípicas anteriormente mencionadas, aún no se asegura definitivamente el crecimiento tumoral. La suplementación de nutrientes y de oxígeno, resulta determinante para la funcionalidad y supervivencia de cualquier célula. La vascularización y la formación de nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis), es un proceso que se encuentra bajo estricto control. Es un hecho, que la adquisición de la capacidad angiogénica es una necesidad restrictiva para el desarrollo del tumor. Por lo tanto, es necesaria la acumulación de cambios y mutaciones en las células cancerosas, que resulten en la expresión de factores que induzcan el pasaje de vasos sanguíneos quiescentes a angiogénicos. Lo que permitirá

que continué el desarrollo tumoral (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

Adquisición de capacidad invasiva.

En algún momento en el desarrollo del tumor, algunas células experimentarán un cambio fenotípico determinante. Este cambio comprende el pasaje de células inmóviles polarizadas a células móviles migratorias. Esta transición fenotípica implica la salida del foco primario y la invasión a tejidos distantes, donde se establecerán nuevos focos tumorales (metástasis). (revisado en Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000) y Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011)).

Resumidamente, podemos observar que el cáncer es un proceso extremadamente complejo, que implica la integración y desregulación de una gran cantidad de factores internos y externos. Propiciado fundamentalmente por una profunda acumulación de alteraciones dinámicas en el genoma, que desembocan en la desregulación de los sistemas normales del funcionamiento celular. Lo que a su vez permite, que las células cancerosas adquieran una multiplicidad de capacidades especiales determinantes para el avance de la patología. También, es necesario que en conjunto se promueva una modulación no convencional en la interacción y comunicación con otras células del entorno. Lo que finalmente converge en células que desarrollan independencia celular, al escapar a los controles sistémicos que gobiernan la biología normal de las células en el organismo.

Cáncer de Próstata.

Dentro de los tumores sólidos, el cáncer de próstata (PCa) es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia en países occidentales. En nuestro país es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres (Ferlay, J., D. M. Parkin, et al. 2010). De hecho, uno de cada seis hombres será diagnosticado con cáncer de próstata en su vida. El PCa es actualmente reconocido como una enfermedad multifactorial. A pesar de que se reconoce un aporte ambiental al desarrollo del cáncer de próstata, se cree que la predisposición genética cumple el rol importante en el desarrollo de la enfermedad (Kral, M., V. Rosinska, et al. 2010). Una gran variedad de

factores influyen en el riesgo de padecer cáncer de próstata, edad, etnia, estilo de vida e historia familiar. Los hombres mayores de 65 años presentan el mayor riesgo de padecer PCa. Si consideramos las distintas etnias, los afroamericanos son quienes presentan la tasa más alta de riesgo de padecer PCa, presentando un 50% más de probabilidades que los caucásicos de ser diagnosticados con cáncer de próstata (Farkas, A., S. Marcella, et al. (2000) y Zhang, K. Q., S. A. Salzman, et al. (2003)). Los factores ambientales relacionados al PCa son muy diversos, e involucran numerosos aspectos como la actividad sexual, la ingesta de grasa animal, la ingesta de alcohol, el tabaquismo, la obesidad, la ingesta de minerales (calcio, selenio, zinc) y vitaminas D y E (Kral, M., V. Rosinska, et al. 2010).

Desarrollo del PCa.

Una de las características que presenta en cáncer de próstata es la multifocalización, presentándose múltiples sitios de transformación neoplásica en la glándula prostática. Sin embargo, la mayoría de estos focos iniciales darán origen a la forma latente del cáncer de próstata, que no progresará a la enfermedad clínica agresiva (FIGURA 2) (Witte, J. S. (2009)). Aunque aún no está determinado concluyentemente, es ampliamente aceptado que la etapa precursora del cáncer de próstata es la denominada Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN) (Bostwick, D. G. (1989) DeMarzo, A. M., W. G. Nelson, et al. (2003) De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2006)). A nivel histológico en esta etapa se pueden observar algunas características distintivas, expansión del núcleo y nucleolo, aparición de hiperplasia epitelial luminal, estado hiper cromático y atipia del núcleo. Asimismo, a nivel molecular se reportan aumentos en los niveles de los marcadores de proliferación celular (Bostwick, D. G. (1989) Shappell, S. B., G. V. Thomas, et al. (2004)). En el desarrollo del cáncer de próstata, aquellas formas latentes que avancen a la forma clínica, en el 95% de los casos, serán clasificados como adenocarcinoma; siendo mayoritariamente adenocarcinomas acinares, que expresan los receptores de andrógenos (AR). Mientras que el tumor maligno no haya invadido el tejido circundante y se encuentre confinado en la cápsula prostática, se clasificará como carcinoma *in situ*. Si el tumor continúa progresando y comienza a invadir los tejidos circundantes, este pasará a ser considerado invasivo. Sin embargo, si el desarrollo del mismo aún no ha alcanzado otros tejidos y órganos del

cuerpo, se le denominará carcinoma primario. Para que sea clasificado como carcinoma secundario o metastásico, algunas células cancerosas deben trasladarse más allá del sitio original (primario), invadiendo otros órganos donde establecerán un nuevo foco. Las células tumorales invasivas (metastáticos) muestran la adquisición de inestabilidad genómica, que se refleja en los múltiples reordenamientos cromosómicos observados típicamente en los estadios avanzados del cáncer de próstata (Holcomb, I. N., D. I. Grove, et al. (2008), Attard, G., J. F. Swennenhuis, et al. (2009) Leversha, M. A., J. Han, et al. (2009)). Los sitios mas comunes de metástasis en el PCa, suelen ser el tejido óseo (caracterizado por las lesiones osteoblásticas) y los ganglios linfáticos (Bubendorf, L., A. Schopfer, et al. (2000) Logothetis, C. J. and S. H. Lin (2005)). Sin embargo, la relación de las células tumorales y la formación de metástasis, sigue aún sin resolverse. Asimismo, los factores moleculares que promueven y gobiernan la metástasis del PCa al tejido óseo, se encuentran aún mal caracterizados (Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010)).

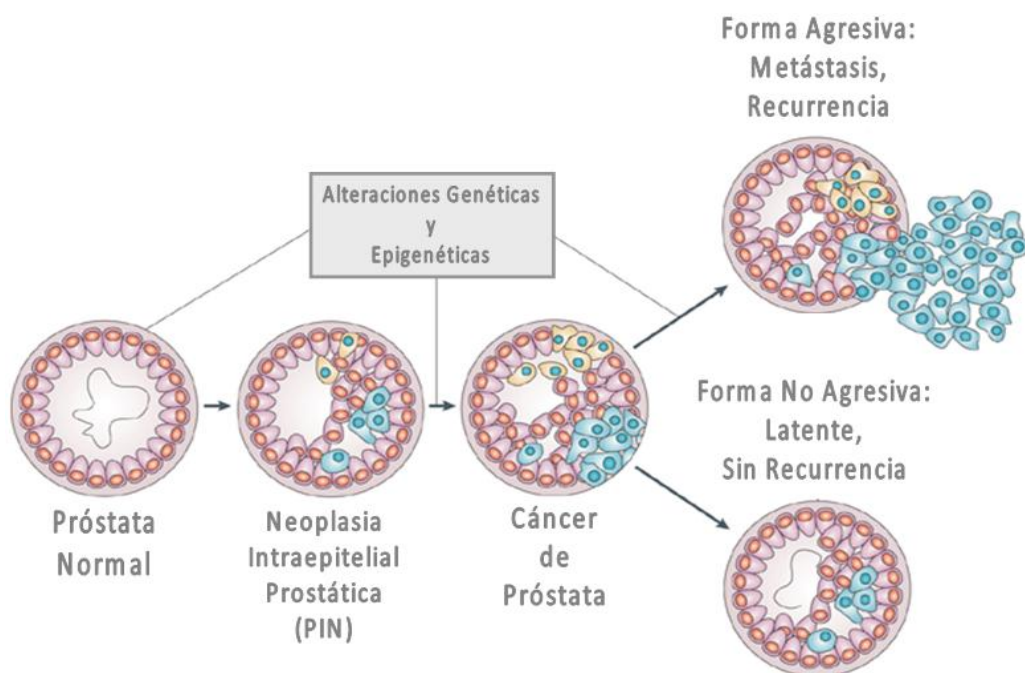


Figura 2. En la imagen apreciamos un esquema representando las etapas principales del desarrollo del cáncer de próstata. Podemos apreciar que a partir de la células normales de próstata, el proceso de desarrollo del PCa posee una etapa característica denominada neoplasia intraepitelial prostática (PIN) que podrá en ultima instancia derivar en dos condiciones. Una latente sin peligro clínico, o desarrollar la variante agresiva metastásica clínicamente peligrosa. La acumulación de alteraciones genéticas y

epigenéticas que encienden y apagan, oncogenes y genes supresores de tumor, respectivamente, juegan un rol en el desarrollo del PCa. Imagen modificada, extraída de Witte, J. S. (2009).

Una visión molecular del PCa.

En la actualidad, en la bibliografía de la temática existen reportados una serie de genes que se encuentran asociados a las distintas etapas de la carcinogénesis del PCa. Estos genes se clasifican según su función como, genes supresores de tumor, oncogenes y genes “caretakers”, y se pueden apreciar en la TABLA 1 (De Marzo, A. M., Y. Nakai, et al. (2007) De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007)). Estudios a nivel molecular, han revelado la presencia de una serie de eventos genéticos que se relacionan diferencialmente con el origen y etapas tempranas del cáncer de próstata, o con las etapas avanzadas y metastáticas de la patología. Los cambios implicados con el origen y las etapas tempranas, comprenden tanto cambios generales, que involucran mutaciones puntuales y alteraciones epigenéticas; o cambios específicos, como la pérdida del gen glutatión-S-transferasa P1, pérdida de heterosigosidad (LOH) del cromosoma 8 y cambios en el número de repetidos CAG en el gen del receptor de andrógenos. Los cambios implicados con las etapas avanzadas y metastáticos, comprenden la pérdida del brazo q del cromosoma 16, perdida del gen supresor de tumor RB, inactivación del gen supresor de tumor p53 y la alteración en la expresión del gen de E-cadherina, entre otros (Zhang, K. Q., S. A. Salzman, et al. (2003)). También, existen mutaciones de genes que no se asocian directamente a una etapa particular, pero que son frecuentemente observados en los tumores de próstata, por ejemplo, este es el caso del gen PTEN (Li, J., C. Yen, et al. (1997)). Por otro lado, las mutaciones asociadas a los genes de receptor de andrógenos están directamente relacionadas con la adquisición de un fenotipo independiente de andrógenos. Que resulta fundamental en la clínica puesto que definirá si la terapia de de privación de andrógenos será efectiva o no.

Gen	Localización	Notas
<i>Genes Supresores de Tumor</i>		
CDKN1B	12p13.1	Codifica el inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas p27. Uno de los alelos es deletado frecuentemente en los tumores primarios.
NKX3.1	8p21.2	Codifica la proteína homeobox restringida a próstata. Suprime el crecimiento de las células prostáticas. Uno de los alelos es deletado frecuentemente en los tumores primarios.
PTEN	10q23.31	Codifica el homólogo de la tensina y fosfatasa, suprime el crecimiento e incrementa la apoptosis. Uno de los alelos es perdido frecuentemente en los tumores primarios.
TP53	17p13.1	Posee muchas funciones supresoras de tumor, induce el arresto del ciclo celular en respuesta a daño en el ADN e induce la apoptosis. Frecuentemente mutado en estados avanzados del cáncer de próstata.
<i>Oncogenes</i>		
MYC	8q24	Factor de transcripción que regula muchos genes blancos involucrados en la proliferación celular, senescencia, apoptosis y metabolismo. Su sobreexpresión conduce directamente a la transformación celular.
ERG	21q22.3	Propuesto como nuevo oncogen del cáncer de próstata. Transcritos fusionados con la porción 5' del gen regulado por andrógenos TMPRSS2, es comúnmente encontrado en todas las fases del cáncer de próstata.
ETV1-4	7p21.3, 19q13.12, 1q21, 17q21.31	Codifica para los factores de transcripción de tipo ETS 1-4. Transcritos fusionados con la porción 5' del gen regulado por andrógenos TMPRSS2, es comúnmente encontrado en todas las fases del cáncer de próstata.
AR	Xq11-12	Codifica para el receptor de andrógenos. Se observa su expresión la mayoría de los cánceres de próstata. Generalmente, su locus se encuentra amplificado o mutado en estados avanzados del cáncer.
Activación de la enzima Telomerasa		Mantiene la función telomérica y contribuye con el estado de inmortalización. Generalmente, se encuentra activada en el cáncer de próstata.
<i>Genes "Caretakers"</i>		
GSTP1	11q13	Codifica la enzima que cataliza la conjugación del glutatión reducido a sustratos electrofílicos. Cumple función detoxificante de carcinógenos. Es epigenéticamente inactivado en mas del 90% de PIN.
Disfunción Telomérica	Extremos cromosómicos	Contribuye a la inestabilidad cromosómica. El acortamiento de los telómeros es encontrado en mas del 90% de PIN.
Anormalidades centrosómicas		Contribuye a la inestabilidad cromosómica.
<i>Otros cambios somáticos</i>		
PTGS2, APC, MDR1, EDNRB, RASSF1α, RARβ2	Varios	Alteraciones epigénéticas son frecuentemente encontradas en las regiones reguladoras. No se conoce aún el significado funcional de estos cambios.

Tabla 1. La tabla muestra un conjunto de genes que se encuentran directamente asociados al desarrollo del PCa. Tabla modificada, extraída de De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007).

Clínica del PCa.

Si el cáncer de próstata es diagnosticado en las etapas iniciales, es potencialmente curable, mediante intervención quirúrgica (prostatectomía radical) y/o radioterapia. Desafortunadamente, el tratamiento del estadio avanzado (hormona-refractario) se

vuelve prácticamente ineficaz. Aproximadamente, el 30% de los hombres al momento del diagnóstico, presentan ya una diseminación del tumor extracapsular o con márgenes positivos, extendiéndose más allá de la glándula prostática. A pesar de que se observa una promisoriosa respuesta de las metástasis, al tratamiento de privación de andrógenos (antiandrógenos, el ketoconazol y la aminoglutetimida, entre otros), el 90% de estos pacientes muere producto de la patología (Meikle, A. W. and J. A. Smith, Jr. (1990), Zhang, K. Q., S. A. Salzman, et al. (2003)).

Un detalle importante de la clínica del PCa, que marca una diferencia en relación a otros tipos de tumores epiteliales, es la falta de una clasificación precisa de subtipos histopatológicos que se relacionen a distintos pronósticos y/o respuesta al tratamiento. Últimamente, los trabajos de genómica están proporcionando el material que permitirá en un futuro cercano, realizar una clasificación a nivel molecular, que permita distinguir los diferentes subtipos y establecer una mejor estratificación del cáncer de próstata (Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, et al. (2008) Palanisamy, N., B. Ateeq, et al (2010) Taylor, B. S., N. Schultz, et al (2010)) Shen, M. M. and C. Abate-Shen (2010))

Detección del PCa.

La detección del cáncer de próstata se basa en una serie de pruebas diagnósticas que incluyen, el examen digital rectal (DRE), ecografía trans-rectal y la cuantificación del antígeno prostático específico (PSA) mediante análisis de sangre (The Cancer Council New South Wales, 2007). El PSA es una serín-proteasa regulada por andrógenos que se produce normalmente por las células epiteliales normales de la próstata, así como, por las células cancerosas de próstata. Existen diferentes factores que generan un aumento de los niveles de PSA en la sangre. El cáncer de próstata es uno de ellos, pero también existen otros, la inflamación de la próstata (prostatitis) y la hiperplasia prostática benigna (HPB). No obstante, el mayor problema que presenta esta prueba diagnóstica, son los falsos positivos, considerando que solo entre el 25 y 30 % de los hombres con altos niveles de PSA en sangre, padecen efectivamente cáncer de próstata (Smith, D. S., P. A. Humphrey, et al. (1997)). Siendo el sobrediagnóstico de pequeñas neoplasias que difícilmente pondrán en riesgo la salud del paciente, un problema asociado al examen de PSA. Finalmente, se termina por someter al paciente

a riesgos innecesarios al adjudicarle un tratamiento indebido. Sumado a que a esta situación conlleva a gastos económicos en el sistema de salud que podrían evitarse (<http://www.cancer.gov/cancertopics/factsheet/detection/PSA>). Por lo tanto, estas pruebas no son del todo certeras y muestran ineficacias en la detección de tumores tempranos. De hecho, existe evidencia reportada que muestra una ligera o nula reducción de la mortalidad por PCa, asociada a las pruebas diagnósticas PSA y tacto rectal (CHLCC, 2007, Schroder, F. H. (2009), Andriole, G. L., E. D. Crawford, et al. (2009)). Por estas razones, resulta imprescindible profundizar en la aplicación de estrategias de base científica, destinadas a la prevención de la enfermedad, reducir la morbilidad, así como a la detección temprana y el tratamiento a tiempo, para reducir y controlar el cáncer (O.M.S en el marco del programa de acción de enfermedades no transmisibles lanzado en 2008, Catalona, W. J., D. R. Miller, et al. (1988), Catalona, W. J., D. S. Smith, et al. (1997), Catalona, W. J., C. G. Ramos, et al. (1999)).

Células Madre de Cáncer.

El desarrollo y avance de la última década en la temática del cáncer, han concedido un sustancial progreso en el desarrollo de la terapéutica de la patología. Asimismo, ha incrementado notoriamente la capacidad de diseñar drogas direccionadas hacia blancos específicos con altísima precisión. Conjuntamente, el perfeccionamiento hacia terapias más específicas ha sido acompañado por una disminución drástica de la toxicidad. Pero a pesar de todos estos desarrollos, si nos referimos a las cuatro formas más comunes de tumores epiteliales (cáncer de pulmón, colon, mama y próstata), observamos que la supervivencia de pacientes con metástasis, no ha disminuido en las últimas décadas (Leaf, C. (2004)). Entonces, surge la siguiente pregunta ¿estaremos apuntando hacia las células correctas? Hoy por hoy, existe evidencia que revela que en la gran mayoría de los tumores, sino es en todos, el desarrollo tumorigénico sería orquestada por un subgrupo de células con características fenotípicas de tipo célula madre (Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006)).

Origen de la teoría de las CSCs.

Últimamente, la teoría de las células madre de cáncer ha tomado relevancia en el mundo científico, pese a que el origen de la misma se remonta al siglo IX. Precisamente, en el año 1875 donde el investigador alemán Julius Cohnheim, propuso que el cáncer no sería mas que el desarrollo descuidado de una célula madre embrionaria, derivando en un proceso neoplásico en el organismo adulto (Huntly, B. J. and D. G. Gilliland (2005), Kucia, M. and M. Z. Ratajczak (2006)). Esta asociación nace de las similitudes existentes entre la biología de las células madre y la biología del cáncer. Explícitamente, la teoría de las Células Madre de Cáncer (CSC, sigla del inglés) propone que en la mayoría de los tumores existe una población de células que ostentan un fenotipo de tipo “célula madre”. Este fenotipo consiste en un tipo celular morfológica y molecularmente menos diferenciado, con capacidad de auto-renovación y diferenciación en diversos tipos celulares. La relativa quiescencia, la capacidad de bombeo de fármacos, la activación de vías anti-apoptóticas, la posesión de una robusta maquinaria de reparación y la capacidad de invasión que exhiben estas células, las convierten en un fenómeno de altísima relevancia para el tratamiento del cáncer.

Las CSC fueron por primera vez identificadas en el año 1994, aislando y estudiando las células que componen la Leucemia Mieloide Aguda (Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994)). Estas células aisladas presentaban una serie de marcadores de superficie muy particular. Pero, la característica más notable que ostentaban estas células, era la capacidad de iniciar tumores, al ser inyectadas en ratones inmuno-deprimidos (NOD/SCID mice) (Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994)). A partir de este espectacular hallazgo, naturalmente surgieron nuevos trabajos en donde fue posible identificar y aislar las células madre de cáncer. En la actualidad, se las ha identificado en los siguientes tejidos: cerebro, páncreas, mamas, hígado, próstata, piel, ovarios, pulmones y colon (Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003) Dontu, G., M. Al-Hajj, et al. (2003). De hecho, se plantea que se encontrarían presentes en todos los tejidos celulares (Maitland, N. J. and A. Collins (2005)). Al igual, que las células madre normales son una pequeña subpoblación dentro del conjunto de células heterogéneas que conforman un tejido normal, las células madre de cáncer lo serían dentro de la población heterogénea de células cancerosas que conforman un tumor. Según la hipótesis de las

CSCs, la capacidad de auto-renovación ofrecería la habilidad de mantener y reestablecer un tumor. Mientras, que el resto de las células cancerosas diferenciadas, que conforman la mayor proporción de un tumor, no presentarían dicha capacidad, encontrándose destinadas a dividirse y morir (Regenbrecht, C. R., H. Lehrach, et al. (2008)).

Hoy en día, se ha reportado evidencia que muestra una gran relación entre las células madre de cáncer y las células madre normales adultas. Como se puede apreciar en la TABLA 2, estas comparten marcadores de superficie (Li, F., B. Tiede, et al. (2007)), la activación de vías de señalización comunes (Notch, Hedgehog y Wnt), un perfil de expresión génica y epigenético similar (Regenbrecht, C., Y. Welte, et al. (2008) Marotta, L. L. and K. Polyak (2009)).

Características	Células Madre Normales	Células Madre de Cáncer
<i>Potencial Replicativo</i>	Extenso	Extenso
<i>Capacidad de Diferenciación</i>	Todos los linajes de un tejido específico	Toda linajes celulares heterogéneos presentes en un tumor
<i>Actividad Metabólica</i>	Baja	Desconocida
<i>Vías de Señalización</i>	Hedgehog, Wnt, Notch y BMP	Desregulación aberrante de Hedgehog, Wnt, Notch, BMP y otras.
<i>Regulación del Ciclo Celular</i>	Ciclado lento, robustamente controlado	Ciclado lento, desconocida
<i>Localización</i>	Nicho: Compartimentado o asociados a la capa del estroma	Desconocidas
<i>Adhesión</i>	Fuertemente Adhesivas	Desconocidas
<i>Potencial Migratorio</i>	Baja migración	Transición Epitelial Mesenquimal

Tabla 2. Tabla comparativa de características presentes en las células madre y células madre de cáncer, fue extraída y modificada de Moore, N. and S. Lyle, (2011).

Se ha observado que muchos de los genes que regulan los procesos y vías de señalización claves en la biología de las células madre, resultan ser reconocidos oncogenes y genes supresores de tumor. Sabemos, que la carcinogénesis, necesita de la acumulación de múltiples “hits” (mutaciones), que provocarán cambios a nivel genético y epigenético, que en último lugar conducirán a células malignizadas. Como mencionamos anteriormente, uno de los procesos normales que desarrollan las células

madre, es la auto-renovación. Las vías que se consideran mayormente involucradas en la regulación de este proceso y que son producto de investigación actualmente son Notch, Hedgehog y Wnt (Regenbrecht, C., Y. Welte, et al. (2008) Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006)). En condiciones estándares, las divisiones de las células madre se limitan a la división asimétrica. En dicho proceso, la célula dará a lugar a dos células hijas, una de ellas idéntica a la de partida, mientras que la otra, que instituirá a las células somáticas de dicho tejido, atravesará sucesivas etapas de división y diferenciación. En paralelo, cuando es necesaria la expansión del conjunto de células madre, estas llevan a cabo el proceso de división simétrica. En dicho proceso, la célula madre sufrirá una división que originará dos células idénticas a la progenie de células madre (Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006), Liu, S., G. Dontu, et al. (2005) Dontu, G., K. W. Jackson, et al. (2004)).

Origen de las CSCs

El origen de las células madre de cáncer, no se encuentra del todo definido, existen diferentes hipótesis que pretenden explicar su origen partiendo de diferentes actores celulares FIGURA 3.

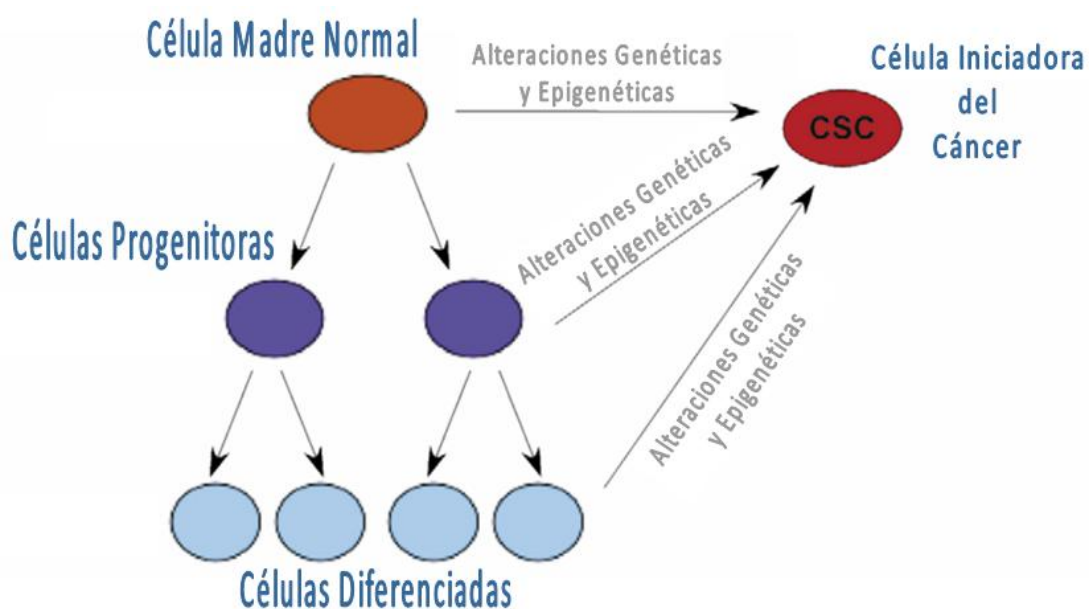


Figura 3. Esquema de los distintos orígenes celulares planteados en las teorías de origen de las CSCs. Se muestra como hoy en día no existe un consenso general, en cuanto al origen de celular de las CSCs, se considera que las alteraciones genéticas y epigenéticas pueden potencialmente dar origen a una CSC

a partir de células madre normales, células de amplificación transitoria progenitoras y células somáticas diferenciadas. Imagen extraída y modificada de Marotta, L. L. and K. Polyak (2009).

La primera de las hipótesis para el origen de las CSCs plantea que las mismísimas células madre normales, serían víctimas de una serie de mutaciones y alteraciones que las malignizaría. Se entiende que como las células madre naturalmente perduran y poseen una vida celular prolongada, facilitaría la acumulación de mutaciones que promoverán la desregulación de la homeostasis celular normal. Como ya mencionamos anteriormente, las células madre poseen características funcionales, que las asocian muy estrechamente con las CSC. Por lo que, serían estrictamente necesarias solo aquellas mutaciones que desencadenen la transformación maligna, y no el surgimiento de las capacidades fenotípicas de una célula madre. Por lo que, las células mantienen las características fenotípicas de célula madre, pero que se encuentran eventualmente malignizadas (Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006)). Existe evidencia contundente a favor de lo mencionado anteriormente, producto de la investigación con sobrevivientes del desastre nuclear de Hiroshima y Nagasaki (Little, M. P., H. A. Weiss, et al. (1999)). Asimismo, se ha evidenciado la presencia de marcadores naturales de las células madre normales, en células madre de cáncer como se aprecia en la TABLA 3.

Órgano	Marcadores de Superficie Celular	
	<i>Células Madre Normales</i>	<i>Células Madre de Cáncer</i>
<i>Hematopoyético</i>	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , Thy1 ⁻ , Lin ⁻	CD34 ⁺ , CD38 ⁻ , Thy1 ⁻ , Lin ⁻
<i>Mama</i>	CD29 ^{alto} , CD24 ⁺ , Lin ⁻	CD44 ⁺ , CD24 ^{-bajo} , ESA ⁺ , Lin ⁻
<i>Cerebro</i>	CD133 ⁺ , Lin ⁻	CD133 ⁺
<i>Pulmón</i>	Sca-1 ⁺ , CD34 ⁺ , Lin ⁻	Sca-1 ⁺ , CD34 ⁺ , Lin ⁻
<i>Piel</i>	CD34 ⁺ , a6-integrina ^{alto}	CD20 ⁺
<i>Próstata</i>	CD133 ⁺ , a2b1 ^{alto}	CD44 ⁺ , α2β1 ^{alto} , CD133 ⁺

Tabla 3. Tabla que muestra los marcadores de células madre y células madre de cáncer comúnmente utilizados para identificarlas y aislarlas de los distintos órganos. Tabla extraída y modificada de Li, F., B. Tiede, et al. (2007).

No obstante, también existen críticas consistentes a esta teoría, basadas en que en el tejido normal las células madre normales, son de hecho muy pocas, lo que tornaría poco probable que acumulen tan fácilmente el número de mutaciones transformantes necesarias. Otra de las teorías propuesta, plantea que serían las células somáticas diferenciadas, el origen de las células madre de cáncer (FIGURA 3). Exponiendo, que al sobrellevar un conjunto crítico de mutaciones, las células somáticas diferenciadas, experimentarían un retroceso en la diferenciación celular y la adquisición de un fenotipo de tipo célula madre (Passegue, E., C. H. Jamieson, et al. (2003) Gudjonsson, T. and M. K. Magnusson (2005)). Aunque las células somáticas son abundantes en los tejidos y acumulan un gran número de mutaciones, las críticas incurren en la complejidad de las mutaciones que conciernen la modulación del número de vías celulares necesarias, para la adquisición de un fenotipo de tipo célula madre. Últimamente algunos investigadores, basándose en la abundancia relativa que presentan las células progenitoras de amplificación transitoria (progenitor inmediato de las células madre), propusieron que sobre estas últimas, recaería el origen de las CSCs (FIGURA 3) Las células progenitoras de amplificación transitoria, se encuentran un escalón mas abajo en la jerarquía celular, que se extiende desde las células madre hasta las células somáticas completamente diferenciadas. Este interesante linaje, parcialmente conserva las mismas características y modulado de las vías celulares presentes en las células madre. Razón por la cual, serían las victimas mas probables de sobrellevar las mutaciones y alteraciones que originarían a las células madre de cáncer. (Li, F., B. Tiede, et al. (2007) Polyak, K. and W. C. Hahn (2006)). Existe evidencia a favor de dicha hipótesis, en estudios sobre el origen de la leucemia mieloide crónica (CML) (Jamieson, C. H., L. E. Ailles, et al. (2004)).

El microambiente de las CSCs.

El nicho o microambiente fisiológico, que circunda a las células madres, se compone de una serie de células y matriz extracelular, que poseen una localización específica y que cumplen funciones de mantenimiento. Este microambiente, no solo le brindará anclaje físico a las células madre, sino que también, por intermedio de moléculas de adhesión y matriz extracelular, suministrará señales esenciales que intervienen en el armonizado de vías de señalización (vías Wnt, Hedgehog, Notch y Ras). Por ende, el nicho concibe

un microambiente fisiológico que define aspectos cruciales como la proliferación, la determinación del destino de diferenciación y el número de células madre (Li, L. and W. B. Neaves (2006)). En suma, la desregulación del nicho natural en que se encuentran inmersas las células madre normales, conducirá a consecuencias dramáticas en la biología de estas células. Ciertos investigadores han reportado trabajos donde se demuestra que la desregulación del nicho natural de las células madre, favorece a la transformación maligna de estas células (Rubio, D., J. Garcia-Castro, et al. (2005) Rubio, D., J. Garcia-Castro, et al. (2005), Li, L. and W. B. Neaves (2006)).

CSCs y la clínica del cáncer.

En la actualidad, teniendo en cuenta todas las características y conceptos acerca de la temática mencionados, se considera determinante la intervención de las CSCs en la biología y clínica del cáncer. Se cree que desempeñan un rol preponderante en diversos aspectos de la enfermedad como quimioresistencia, metástasis y recurrencia (Marotta, L. L. and K. Polyak (2009)). Se ha observado que las CSC presentan mayor resistencia a la quimioterapia en relación al resto de las células mitoticamente mas activas que conforman el tumor. Las CSCs presentan una cinética latente del ciclo celular, asociada tanto a un estado quiescente celular como a un bajo índice de proliferación. Asimismo, se ha reportado la expresión de una gran variedad de proteínas transportadoras del tipo ABC (ATP-binding cassette), que le confieren resistencia fármacos (Kondo, T. (2007)), a la vez que expresan altos niveles de proteínas antiapoptóticas, de la familia Bcl-2, lo que les confiere mayor resistencia a la apoptosis, en comparación con las células diferenciadas (Wang, S., D. Yang, et al. (2003)). Resumidamente, todas las características anteriormente mencionadas, le otorgarían resistencia a las terapias actualmente utilizadas, que apuntan primordialmente a células mitoticamente mas activas (Al-Hajj, M., M. W. Becker, et al. (2004) Zhang, M. and J. M. Rosen (2006)). Si consideramos que las CSCs, presentan resistencia a quimioterápicos y la facultad de regenerar y reconstituir al resto de las células que componen al tumor; entonces si estas células subsisten a la terapia, podran restablecer nuevamente el tumor (FIGURA 4). Actualmente, sabemos que del conjunto

completo de células heterogéneas que conforman un tumor, solo del 0.2 al 1% de estas células, muestran capacidad para regenerar el tumor (Bapat, S. A. (2007)).

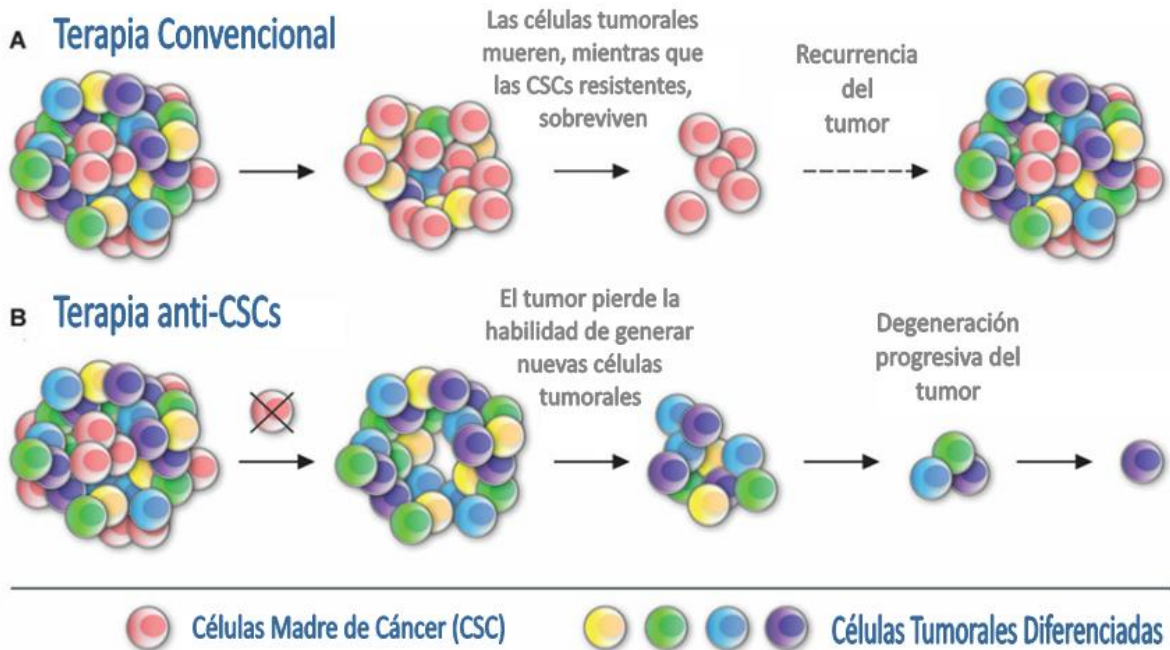


Figura 4. Imagen comparativa de terapias contra el cáncer (Terapia convencional y Terapia anti-CSCs).

A. En el caso de las terapias convencionales que poseen como blanco biológico las células activamente proliferantes, no surtirá efecto sobre la subpoblación de células de CSCs. Estos quimioterápicos producirán una disminución del tumor pero luego de finalizada la administración del quimioterápico, se producirá la recurrencia del tumor por auto-renovación de las CSCs sobrevivientes. **B.** En el caso de las terapias anti-CSCs, estas apuntan directamente a las células CSCs, no afectando drásticamente al resto de las células tumorales. Observamos que si bien no se produce inmediatamente una reducción del tumor, las CSCs han sido eliminadas, conllevando a la degeneración progresiva del tumor, por no existir un suministro de células que regeneren en el tiempo la población de células heterogéneas que conforman un tumor. Imagen modificada, extraída de Schatton, T., N. Y. Frank, et al. (2009).

Otro aspecto complejo de la clínica del cáncer al cual se asocia directamente a las CSCs, es la metástasis. Muchas características presentes en las CSCs, las tornan potenciales candidatas del fenómeno de metástasis. Ya mencionamos la habilidad de iniciar y sustentar un tumor. Asimismo, ostentan una gran plasticidad celular, que facilitaría su adaptación y supervivencia a microambientes distintos. De la misma forma, se considera que la transición epitelial-mesenquimal (EMT), donde una célula polarizada epitelial inmóvil, vira fenotípicamente hacia una célula mesenquimal móvil,

es crucial en el desarrollo de metástasis (Li, F., B. Tiede, et al. (2007), Klarmann, G. J., E. M. Hurt, et al. (2009)). Observaciones recientes, revelan que las características del proceso de EMT y las CSCs están estrechamente relacionados (Raimondi, C., W. Gianni, et al (2010)). Como si fuera poco, experimentos de Xenograft en ratones inmunodeprimidos, han reportado que la subpoblación de CSCs, presenta una mayor capacidad en la generación de tumores en comparación con su contrapartida de células diferenciadas (Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003) Polyak, K. and W. C. Hahn (2006)).

MicroARNs.

El dogma central de la biología molecular fue desafiado cuando hallazgos recientes identificaron un subgrupo de que pequeños fragmentos de ARNs no codificantes, que poseían la capacidad de regular negativamente genes codificantes de proteínas (Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993)). En la actualidad es conocido que estos pequeños fragmentos de ARN no codificantes son los denominados MicroARNs. Los microARNs son pequeñas moléculas de ARN simple hebra de aproximadamente 22 nt de longitud, codificados en el genoma de una diversidad de organismos como plantas, animales, hongos y virus. Es ampliamente aceptado, que los microARNs son moléculas centrales en la regulación post-transcripcional, desempeñando su función como represores de la expresión génica (FIGURA 5) (Liu, J., M. Zheng, et al. (2011)). Específicamente, suprimen la expresión génica a través de una interacción por complementariedad de bases imperfecta principalmente con el 3' UTR de sus respectivos ARN mensajeros blancos. Producto de esta compleja interacción se pueden disparar alguno de tres mecanismos generales de represión de la expresión génica, que incluyen la represión traduccional de la proteína, la degradación del propio ARN mensajero blanco o a la supresión de la expresión mediante metilación del ADN (Kusenda, B., M. Mraz, et al. (2006)). Es interesante, un trabajo publicado en 2005 que menciona que en el genoma humano se hallarían más de 1.000 genes de microARNs (Bentwich, I. (2005)), considerándose que del total de los genes predichos en los animales, aproximadamente entre el 1-5% codificarían para microARNs. Asimismo, se cree que el 30% de los genes que codifican proteínas son blancos de regulación por microARNs (Bartel, D. P. (2004) Kusenda, B., M. Mraz, et al. (2006)). Algunos investigadores

manejan un porcentaje aún mayor, proponiendo que más del 60% de los genes humanos se encuentran bajo control de los microARNs (Friedman, R. C., K. K. Farh, et al. (2009)). Cada vez es mayor el número de investigadores interesados en su estudio, producto del rol esencial que juegan en la regulación de la expresión génica y de la capacidad que poseen para modular la expresión de múltiples ARN mensajeros blancos, determinando cómo y cuándo se encienden y apagan. Asimismo, cada vez es mayor la evidencia que vincula a los microARNs en la regulación de una gran variedad de procesos cruciales en la biología de la célula, incluyendo el crecimiento celular, la apoptosis, el desarrollo y la diferenciación entre otros. (Friedman, J. M. and P. A. Jones (2009))

Biogénesis.

A pesar de que el proceso individual en cada animal puede diferir en algunos detalles específicos, el proceso básico de generación de los microARNs es compartido en animales, plantas y hongos. Este proceso consiste básicamente en la transcripción de moléculas de ARN bicatenario que posteriormente serán procesadas en moléculas de ARN simple hebra más pequeñas. Estas a su vez por complementariedad de bases mediarán el reconocimiento de una secuencia específica en el ARN mensajero blanco conduciendo a la represión de dicho gen (FIGURA 5) (Matzke, M., A. J. Matzke, et al. (2001)). A pesar de que los microARNs y los pequeños ARN de interferencia (siARNs) presentan diferencias en múltiples aspectos, la maquinaria molecular encargada de mediar la biogénesis y la acción de los microARNs, comparte gran parte de sus componentes con la maquinaria molecular correspondiente al ARN de interferencia (iARN). El mecanismo evolutivamente conservado que da lugar al microARN maduro implica dos procesos consecutivos de corte endonucleotídicos precisos, realizados por las enzimas tipo RNasa III Drosha y Dicer (Havens, M. A., A. A. Reich, et al. (2012)). Una vez, generado el transcrito primario por la ARN polimerasa II (principal ARN polimerasa de transcripción de microARNs), los microARNs primarios (pri-miARN) poseen las propiedades estructurales características de los genes de clase II (caperuza en el 5', así como cola poli(A) al 3'). En el siguiente paso en la biogénesis, el complejo microprocesador nuclear enzimático compuesto por Drosha y DGCR8 (proteína de unión a ARN doble hebra (Pasha)), procesa el transcrito primario del microARN,

generando una estructura en forma de horquilla de aproximadamente unos 60-100 nt de longitud. Esta nueva estructura formada producto del primer paso de clivaje, es el llamado microARN precursor (pre-miARN) (Sibley, C. R., Y. Seow, et al. (2012) Macfarlane, L. A. and P. R. Murphy (2010)). En el próximo paso, producto de la interacción del pre-microARN con el factor de exportación nuclear exportina-5 y Ran-GTP, el microARN es transportado al citoplasma donde continuará su transformación en una segunda ronda de clivaje específico catalizado por la enzima Dicer en el complejo con TRBP (proteína de unión a ARN de doble cadena) (Ladomery, M. R., D. G. Maddocks, et al. (2011)). Este evento de escisión dará a lugar a un nuevo fragmento de ARN doble hebra de unos 22 nt, que estará compuesto por una hebra guía el microARN maduro y la hebra* microARN pasajero (Sibley, C. R., Y. Seow, et al. (2012)). Inmediatamente, el microARN maduro será incorporado al gran complejo proteico, denominado complejo silenciador inducido por ARN (RISC), mientras que la hebra de pasajera será degradada. El microARN maduro funcionará como guía del complejo RISC para el reconocimiento específico de un grupo de ARN mensajeros blancos (Macfarlane, L. A. and P. R. Murphy (2010)). RISC podrá inhibir la traducción de aquellos ARN mensajeros blancos que presenten complementariedad parcial con el microARN en el 3'UTR.

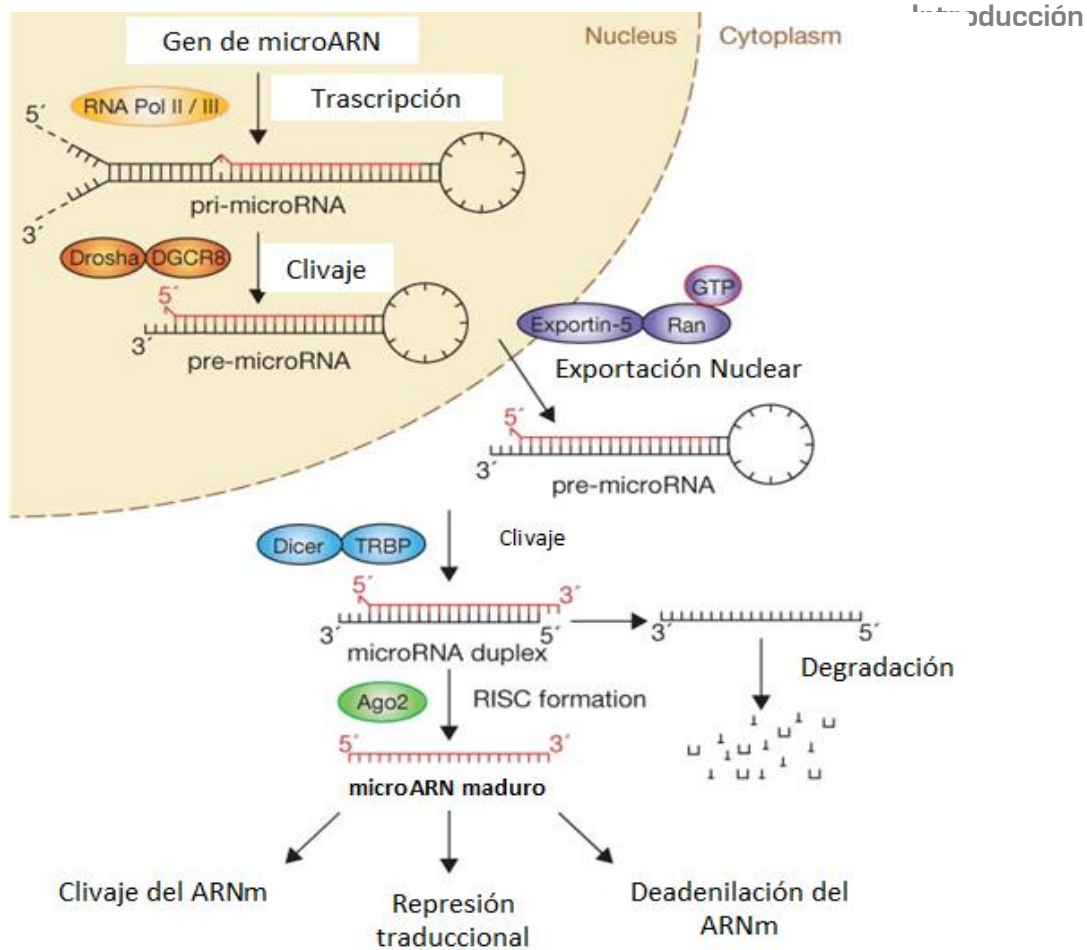


Figura 5. Esquema de la biogénesis de los microARNs, el proceso consiste básicamente en la transcripción de moléculas de ARN bicatenario que posteriormente serán procesadas en moléculas de ARN simple hebra mas pequeñas. Estas a su vez por complementariedad de bases mediarán el reconocimiento de una secuencia específica en el ARN mensajero blanco, conllevando a la represión de la expresión de dicho ARN mensajero. Se pueden apreciar los tres mecanismos básicos de represión. imagen modificada y extraída de Winter, J., S. Jung, et al. (2009)

Mecanismos de represión génica.

Los mecanismos utilizados por los microARNs para regular la expresión génica se encuentran aún en amplia discusión y en pleno estudio. Asimismo, la evidencia existente acerca del tema menciona cuatro mecanismos generales de represión génica mas ampliamente aceptados: degradación cotraduccional de la proteína, inhibición de la elongación de la traducción, terminación prematura de la traducción e inhibición del inicio de la traducción (Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008)). Los distintos modelos de represión propuestos se pueden dividir en dos categorías según ya inicio o no la traducción, mecanismos de regulación que actúan en la iniciación de la traducción y mecanismos de regulación que actúan post iniciación de la traducción.

- Mecanismos de represión que actúan en la iniciación de la traducción.

En estos modelos el microARN interfiere muy tempranamente en la traducción, antes de que se conciba la elongación. Uno de estos modelos propone que el impedimento al inicio de la traducción estaría mediado por la competencia existente entre la proteína Argonauta y el factor de iniciación de la traducción eIF4E para unirse a la estructura de caperuza en el 5' UTR del ARN mensajero blanco. Otra variante de este modelo, implica que la proteína Argonauta recluta específicamente al factor eIF6 y de esta manera, previene la unión de la subunidad mayor del ribosoma con la menor. Otro modelo de represión que actúa al comienzo de la traducción, implica nuevamente a la proteína Argonauta pero esta vez interactuando directamente con el ARN mensajero previniendo la formación de la conocida configuración estructural en loop cerrado, necesaria para dar comienzo a la traducción. Esta variante del modelo plantea que el impedimento de la formación de la configuración en loop cerrado sería acompañada de la deadenilación del ARN mensajero blanco. Finalmente, el último de los mecanismos planteados de regulación al inicio de la traducción, implica el la desestabilización y decaimiento del ARN mensajero inducido por el microARN, producto la deadenilación de la cola poliA y de la eliminación de la caperuza “decapping” al 5' del ARN mensajero blanco (Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008)).

- Mecanismos de represión post iniciación de la traducción.

Los mecanismos de represión post-iniciación de la traducción, implican que el microARN reprime la traducción en la etapa de enlongación. El primer modelo, propone que el microARN reprime la traducción del correspondiente ARN mensajero blanco, mediante el bloqueo de la elongación de la traducción producto de la disociación prematura del ribosoma. Otro modelo implica la degradación cotraduccional de la proteína, aunque la traducción en si no sea inhibida, la cadena polipeptídica naciente es degradada cotraduccionalmente (Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008)). Resulta fundamental definir y entender el mecanismo de acción de los microARNs, para la aplicación y uso potencial en la terapéutica.

MicroARNs y las patologías.

El hecho de que un único microARN presente numerosos ARN mensajeros blancos pertenecientes a una o múltiples vías celulares, sugiere que la expresión desregulada

del mismo, afectará a los procesos en los que participan los productos proteicos de sus ARN mensajeros blancos. Hoy es conocido, que la desregulación de los microARNs afecta múltiples procesos biológicos celulares que desembocan en eventos patológicos complejos, como las enfermedades cardiovasculares, neurodegenerativas, envejecimiento, desordenes metabólicos, así como el inicio y progresión del cáncer (Coppola, V., R. De Maria, et al. (2010) Liang, R., D. J. Bates, et al. (2009)).

MicroARNs y cáncer.

Hoy en día es ampliamente aceptado, que por su gran importancia en la biología normal de la célula, los microARNs juegan un rol esencial en la neoplasia (Turner, J. D., R. Williamson, et al. (2010), Sreekumar, R., B. S. Sayan, et al (2011)). Tal es así, que los microARNs al igual que los genes asociados al cáncer se clasifican según funcionen como oncogenes o como supresores de tumor. Los microARNs oncogénicos (oncomir) se encontraran sobreexpresados en las células tumorales y tendrán por blanco genes supresores de tumor. Lo opuesto sucede con los microARNs supresores de tumor, estos se encontraran subexpresados en el tejido tumoral, y tendrán por blanco oncogenes (Wang, D., C. Qiu, et al. (2010)). Una gran masa de trabajos científicos evidencia la participación y modulación de los microARNs en procesos como el desarrollo, proliferación celular, diferenciación, apoptosis, adhesión celular, migración e invasión, angiogénesis, en otros procesos biológicos. (Yang, W., D. Y. Lee, et al. (2011) Li, M., J. Li, et al. (2010)). Estudios de asociación han encontrado un gran número de microARNs que se ubican cercanos o directamente inmersos en regiones genómicas estrechamente asociadas al cáncer (Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002)). Una gran masa de evidencia biológica experimental en modelos animales, muestra la asociación de niveles anormales de expresión de microARNs asociados con el desarrollo y progresión de canceres humanos. (Takamizawa, J., H. Konishi, et al. (2004)). Particularmente, se ha comprobado que el mal funcionamiento de un único microARN resulta suficiente para causar cáncer en ratones (Costinean, S., N. Zanesi, et al. (2006)). Las nuevas tecnologías genómicas, han facilitado el estudio de perfiles de expresión de microARNs, demostrando una desregulación general de los microARNs en los tumores humanos (Calin, G. A., C. Sevignani, et al. (2004) Calin, G. A. and C. M. Croce (2006)). Ha existido un progreso significativo en estos últimos años en relación a

la asociación entre los microARNs y el cáncer, gracias al gran avance y la disminución de los costos de las tecnologías genómicas. Estudios a gran escala de perfiles genómicos de expresión de microARNs en diversos tipos de tumores, muestran una estrecha asociación entre el perfil de expresión de microARNs y el tumor estudiado. Motivando a que algunos autores lleguen a plantearse la posibilidad de que cada tipo específico de cáncer pueda ser identificado por un perfil o una firma determinada de microARNs que se encuentran desregulados. Así como, una posible clasificación y estratificación de los distintos tipos de cáncer, basándose en los perfiles de expresión particular de microARNs de cada tumor (Lu, J., G. Getz, et al. (2005) Calin, G. A. and C. M. Croce (2006)). Un trabajo muy interesante demuestra que es posible utilizar los microARNs para distinguir entre distintos tumores, en un estudio comparativo entre microARNs y ARN mensajeros, se encontró que utilizando la firma del perfil de expresión de ARN mensajeros se lograba distinguir solo 1 de los 17 carcinomas estudiados, sin embargo, utilizando el perfil de expresión de microARNs se lograba distinguir eficazmente 12 de los 17 carcinomas. Esto pone de manifiesto que efectivamente la utilización del perfil de microARNs posee un gran potencial para la distinción y estratificación de distintos tipos de tumores (Lu, J., G. Getz, et al. (2005) Calin, G. A. and C. M. Croce (2006)), Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006))

MicroARNs y cáncer de próstata.

Recientemente se han reportados varios perfiles de expresión de microARNs en tumores de próstata y todos coinciden en una extensa desregulación global de los mismos (Gandellini, P., M. Folini, et al. (2009)). Además, fue demostrado que los patrones de expresión diferencial de los microARNs en el cáncer de próstata, pueden correlacionarse robustamente con la clínica, utilizándolos como indicadores de diagnóstico y pronóstico (Schaefer, A., M. Jung, et al. (2010)). Existe un gran número de microARNs que han sido hallados expresados anormalmente en cáncer de próstata, asociados directamente al desarrollo del mismo. Muchos microARNs (oncomirs) se encuentran sobreexpresados en el cáncer próstata regulando negativamente muchos genes supresores de tumor, conduciendo al crecimiento tumoral y a la metástasis. Por ejemplo, dos microARNs que presentan una altísima homología de secuencia entre ellos el hsa-mir-221 y hsa-mir-222, han sido reportados sobreexpresados en cáncer de

próstata, encontrándose directamente relacionados con la metástasis y el crecimiento tumoral a través de la represión del gen blanco p27^{kip1} (Mercatelli, N., V. Coppola, et al. (2008) Sun, T., Q. Wang, et al. (2009)). Otro microARN que presenta función oncomir, es el gen hsa-mir-21, este se encuentra sobreexpresado en el cáncer de próstata, participando en el crecimiento tumoral, así como en los procesos de invasión y metástasis. Además, se encuentra reportada la sobreexpresión de este microARN en líneas celulares de cáncer de próstata agresivas como DU145 y PC3. (Li, T., D. Li, et al. (2009)). Por otro lado, el rol tumor supresivo de los microARNs en el cáncer de próstata se encuentra asociado con la habilidad de interferir con la migración celular y la invasión, así como mediar o promover la apoptosis celular. De hecho, la pérdida de microARNs supresores de tumor es un mecanismo bastante común asociado al cáncer de próstata. Por ejemplo, la pérdida del locus del hsa-mir-101 asociado a la sobreexpresión del gen *EZH2*, se encontró en un 37.5% de muestras clínicas de cáncer de próstata localizado y en un 66.7 % de muestras de cáncer de próstata metastásico. Asimismo, la sobreexpresión del hsa-mir-101 se encuentra asociada con niveles bajos de *EZH2*, así como con la supresión del crecimiento y de la invasividad en células de PCa (Varambally, S., Q. Cao, et al. (2008) Pang, Y., C. Y. Young, et al. (2010)). Otro ejemplo de microARN supresor de tumor es el hsa-mir-126, la transfección y sobreexpresión de este microARN en la línea celular LNCaP, conllevó a la reducción significativa de la proteína SLC45A3. Esta proteína es identificada por su capacidad de promover e inducir la motilidad celular y la invasión (Musiyenko, A., V. Bitko, et al. (2008)).

MicroARNs y células madre de cáncer.

Como ya fue mencionado en un apartado anterior, las principales características de las células madre son su capacidad de auto-renovación y diferenciación en múltiples linajes celulares. Asimismo, los mecanismos involucrados en el mantenimiento de la auto-renovación y la diferenciación en las células madre son muy complejos. Como también ya fue comentado, se ha demostrado un rol crucial de los microARNs en una amplia gama de procesos biológicos, sugiriendo que estos también podrían desempeñar un papel esencial en biología de las células madre, específicamente en la auto-renovación y diferenciación. Llamativamente, se ha encontrado que un gran

número de microARNs determinados como oncogénicos en estudios de cáncer, se expresan en condiciones normales en etapas tempranas del desarrollo de células indiferenciadas, al mismo tiempo que se observa que su expresión se encuentra reprimida en el tejido diferenciado. Lo opuesto también sucede para los microARNs supresores de tumor. Una evidencia directa de la importancia de la participación de los microARNs en la diferenciación, es el fenotipo observado al reprimir en ratones la proteína Dicer. La alteración de la función de la proteína Dicer en células madre embrionarias murinas, provocó una profunda alteración en el procesamiento de los microARNs que afectó en gran medida su capacidad para diferenciar. (Murchison, E. P., J. F. Partridge, et al. (2005)) Asimismo, en un trabajo de 2008 donde se realizó la cuantificación de la expresión en todo el genoma de microARNs y ARN mensajeros, en células madre embrionarias de ratón y tejidos embrionarios somáticas; establecieron la existencia de una firma de expresión génica diferencial de microARNs entre las células madre embrionarias de ratón y tejidos diferenciados (Yi, R., M. N. Poy, et al. (2008)). Por otra parte, algunos microARNs se expresan específicamente en las células madre y controlan la auto-renovación y diferenciación mediante la regulación negativa de la expresión de ciertos genes blancos clave. Por ejemplo, el hsa-mir-495 se encuentra subexpresado en las células madre del cáncer de mama promoviendo la oncogénesis y la resistencia a la hipoxia a través de la represión de la E-cadherina y REDD1. (Hwang-Verslues, W. W., P. H. Chang, et al.) Otro ejemplo que evidencia la gran importancia de los microARNs en la CSC, se observó al estudiar el efecto de la sobreexpresión del microARN supresor de tumor hsa-mir-34a, en las células CSC de PCa CD44⁺. Se observó que la sobreexpresión de dicho microARN provoca la inhibición de la expansión clonogénica, así como la regeneración del tumor y la metástasis en las células CSC de PCa CD44⁺. El estudio muestra que el hsa-mir-34a es un regulador negativo de CSC CD44⁺, convirtiéndose en un posible nuevo agente terapéutico contra las células madre cancerosas de próstata. (Liu, C., K. Kelnar, et al. (2011)) En otro trabajo reciente, se estudió la expresión ectópica del hsa-mir-34c, observándose que producto de la sobreexpresión del microARN, se produjo una reducción de la capacidad de auto-renovación y la inhibición de la transición epitelial mesenquimal de las células iniciadoras de tumor de mama. Interesantemente, se identificó un sitio CpG hipermetilado en la región promotora del gen hsa-mir-34c, que contribuye a la

explicación de la represión de la transcripción del microARN supresor de tumor hsa-mir-34c en las células iniciadoras de tumor de mama (Yu, F., Y. Jiao, et al. (2012)). Este trabajo muestra directamente como la alteración epigenética de un microARN, conduce a la adquisición de un fenotipo de tipo célula madre. En otro estudio reciente donde trabajaron con células de carcinoma hepatocelular obtuvieron interesantes resultados. En este estudio se compararon los perfiles diferenciales de microARNs de las subpoblaciones de células CSC CD133⁺ y no CSC CD133⁻ de carcinoma hepatocelular primario. Producto de esta búsqueda encontraron 5 microARNs sobreexpresados en la subpoblación de células no CSC CD133⁻, uno de ellos es el hsa-miR-150. Mediante el estudio de los genes blancos, se estableció que el hsa-mir-150 interactúa directamente con el 3'UTR del ARN mensajero de c-Myb. Asimismo, se demostró que la sobreexpresión del hsa-mir-150 regula la represión del gen c-myb. Además, se comprobó que la sobreexpresión del hsa-mir-150 conduce a una reducción significativa de las células CSC CD133⁺, acompañado de una inhibición significativa del crecimiento celular y de la formación de tumoresferas. En conjunto, estos resultados demuestran que el hsa-mir-150 se encuentra involucrado en el proceso de auto-renovación de las CSC de hígado, mediante la modulación del gen blanco c-Myb. (Zhang, J., N. Luo, et al. (2012)). Resumidamente, la evidencia presentada manifiesta un rol clave de los microARNs en la biología de la CSCs. Asimismo, muestra el potencial que posee un único microARN en la modulación del fenotipo de las células.

MicroARNs como Biomarcadores.

En este complejo escenario, los microARNs surgen como buenos candidatos para su uso como biomarcadores. Para poder utilizarlos como biomarcadores, deberán ser medidores objetivos de características biológicas, que permitan diferenciar entre la situación normal y la patológica, cáncer. Las propiedades que resultan esenciales en un biomarcador son: especificidad, reproducibilidad, sensibilidad, fácil acceso para el muestreo (no invasivo), estabilidad, fácil detección del mismo, así como una correlación robusta con el estado, progreso o respuesta al tratamiento de la enfermedad. Los microARNs poseen las propiedades ideales de un biomarcador. En primer lugar, su expresión se haya frecuentemente desregulada en la mayoría de las patologías humanas. En segundo lugar, numerosos reportes muestran que los

microARNs pueden ser utilizados para la estratificación, seguimiento, pronóstico, e incluso terapéutica del cáncer (Calin, G. A. and C. M. Croce (2006) Lawrie, C. H., S. Gal, et al. (2008), Metias, S. M., E. Lianidou, et al. (2009)). Además, los patrones diferenciales de expresión de los microARN permiten realizar correlaciones a nivel tejido específico (Lu, J., G. Getz, et al. (2005)), y por lo tanto, realizar el diagnóstico diferencial del origen del tumor. En tercer lugar, desde hace poco se sabe que los microARN circulan en el plasma, suero y orina. Esto permitiría monitorear los niveles de microARN en sangre, de manera poco invasiva para el paciente y con bajos costos para el sistema de salud. En cuarto lugar, los niveles de los mismos en sangre se mantienen estables por periodos de tiempo considerables. Múltiples trabajos ofrecen diferentes evidencias que apoyan y explican la estabilidad en sangre reportada para los microARNs. (Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007), Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008)). En quinto lugar, la cuantificación de microARNs es un método estandarizado y de fácil implementación en el laboratorio de biología molecular (Gilad, S., E. Meiri, et al. (2008) Weber, J. A., D. H. Baxter, et al.(2010)). Finalmente, muy recientemente comenzaron a publicarse estudios que demuestran robustas correlaciones entre los niveles de microARNs en sangre con la clínica del paciente (estratificación, pronóstico, respuesta terapéutica) para diversas patologías, evidenciando así el importante valor clínico de los microRNAs circulantes. Además, existen estudios de este tipo ya en fase clínica, relacionados con sepsis, curso clínico y evaluación del pronóstico del paciente (<http://clinicaltrials.gov>). En conclusión, todas las características descritas anteriormente posicionan a los microARNs como prometedores biomarcadores en cáncer y los hacen prometedores blancos de terapéutica.

Antecedentes.

Antecedentes del trabajo.

En el marco de su estadía de formación posdoctoral la Dra. Duhagon trabajó en la identificación de microARNs que intervienen en la diferenciación de células madre en el cáncer de próstata. Con el objetivo de investigar microARNs que regulan la diferenciación de las células madre de cáncer de próstata, utilizó un modelo desarrollado previamente en NCI-Frederick (Duhagon, Hurt et al. 2010) . Este modelo consiste en el aislamiento de células madre de cáncer a partir de líneas celulares y cultivos primarios de pacientes, mediante cultivo en un medio selectivo para “prostatoesferas” que permite su crecimiento en suspensión independientemente de anclaje. La exposición de estas células a suero fetal bovino durante 24h, induce la diferenciación temprana de estas CSCs (FIGURA 6), proceso puede seguirse morfológicamente puesto que provoca la adhesión de las células a la superficie de cultivo.

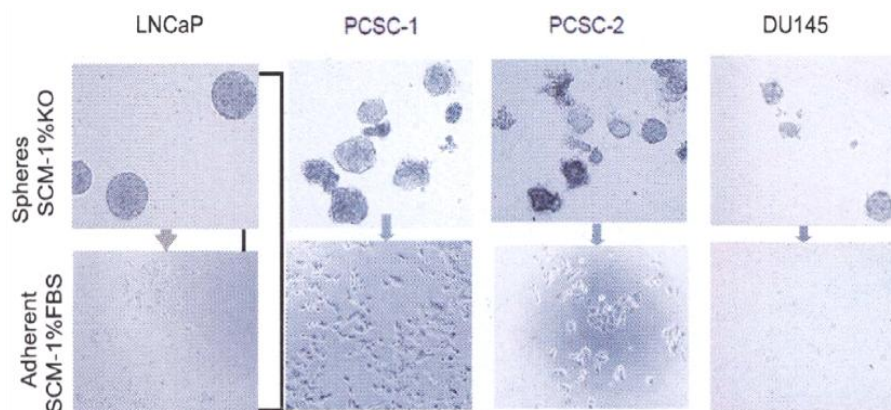


Figura 6. Diferenciación in vitro de CSCs de próstata (prostatoesferas). Se muestran cuatro líneas celulares de próstata creciendo como esferas en medio selectivo para crecimiento de CSCs en los paneles superiores (“Sphere SCM-1%KO”). Los paneles inferiores muestran la diferenciación correspondiente con la adhesión a la superficie del frasco de cultivo luego de 24 horas de exposición a FBS (“Adherent SCM-1%FBS”). Líneas celulares de PCA: LNCaP, DU145 y PCSC-1 y PCSC-2 (líneas primarias de tumores de próstata de dos pacientes terminales).

El modelo de diferenciación utilizado fue validado mediante estudios de trasplante subcutáneo en ratones (NOD/SCID) que demostraron que las prostatoesferas son

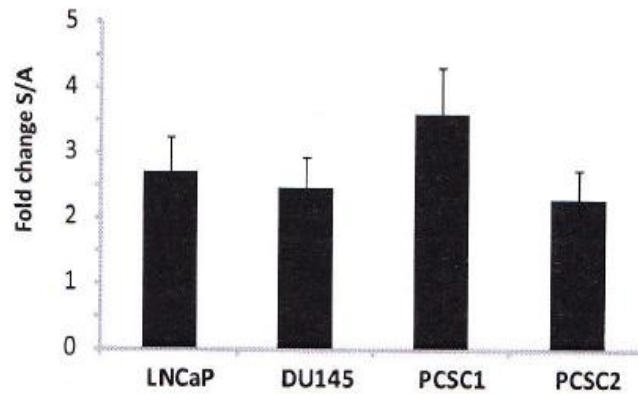


Figura 8. Cuantificación relativa por qRT-PCR ((S) prostatoesferas / (A) células adherentes) del nivel del hsa-mir-301b en las cuatro líneas celulares analizadas.

La sobreexpresión del hsa-mir-301b observada en las CSCs aisladas de LNCaP mediante la utilización de marcadores de superficie de CSCs como CD44 y CD24 (FIGURA 9A), es otra evidencia acerca de la función que cumple este microARN en el estado indiferenciado de las CSCs. Otra evidencia que a favor de hsa-mir-301b como oncomir, es la correlación positiva entre su expresión y la agresividad de la línea celular de PCA (FIGURA 9B).

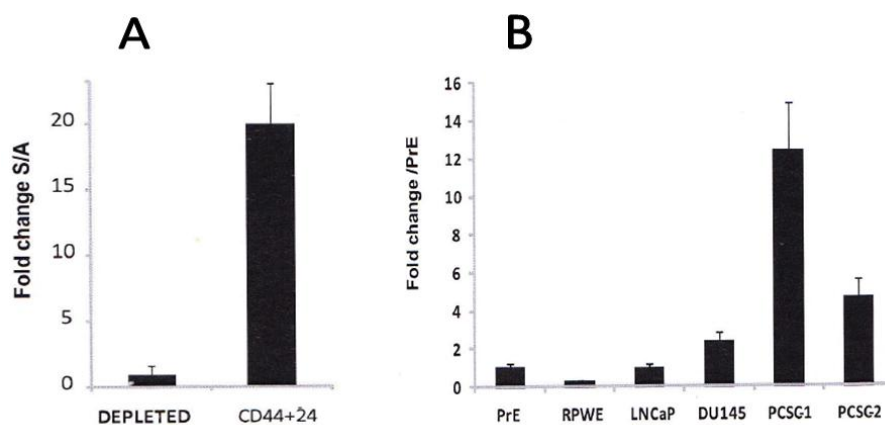


Figura 9. Cuantificación relativa por qRT-PCR (“S” o esferas / “A” o adherentes) del nivel de hsa-mir-301b en (A) La población de células con fenotipo inmunológico CD44+24- que han sido evidenciadas

como CSCs. (B). Diferentes líneas celulares de próstata normal (PrE, RPWE) y tumorales (LNCaP, DU145, PCSC-1 y PCSC-2) ordenadas de izquierda a derecha por grado creciente de malignidad.

Posteriormente, se utilizó la estrategia de estudio de ganancia de función estable, mediante la transfección de vectores que sobreexpresan o inhiben el hsa-mir-301b (FIGURA 10).

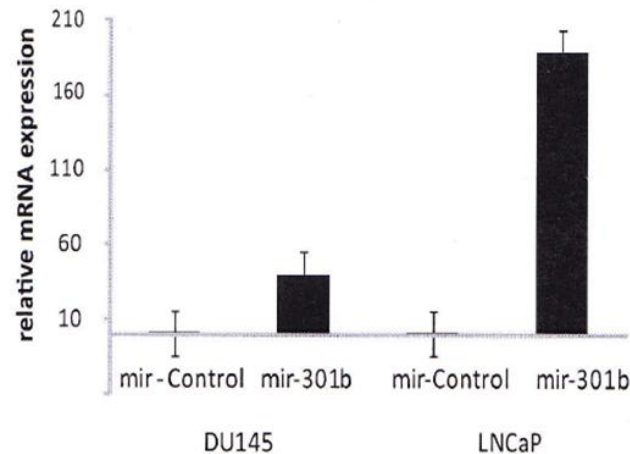


Figura 10. Sobreexpresión del hsa-mir-301b con vectores lentivirales en dos de las líneas de cáncer de próstata LNCaP y DU145. Cuantificación por qRT-PCR utilizando el sistema de MiScript (Qiagen).

Simultáneamente, se ensayó la modulación transitoria por transfección de mimics o siRNA vía el sistema Miridian de Dharmacon. Estos abordajes experimentales permitieron determinar que el hsa-mir-301b efectivamente modula la diferenciación del modo esperado por la hipótesis, es decir, que la sobreexpresión del hsa-mir-301b inhibe la diferenciación de las prostatoesferas (FIGURA 11 A y B).

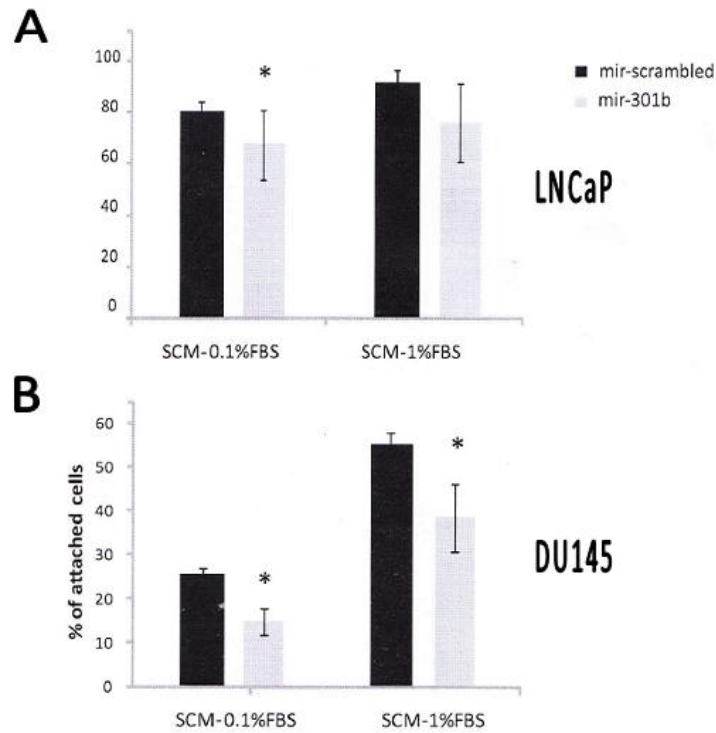


Figura 11. Inhibición de la diferenciación las líneas celulares DU145 y LNCaP cuando se sobreexpresa el hsa-mir-301b.

Por último, mediante ensayos de invasión en cámaras de cultivo (Matrigel™ Matrix Basement Membrane), se determinó que la sobreexpresión del hsa-mir-301b conduce a un notable incremento de la invasividad de las células (FIGURA 12).

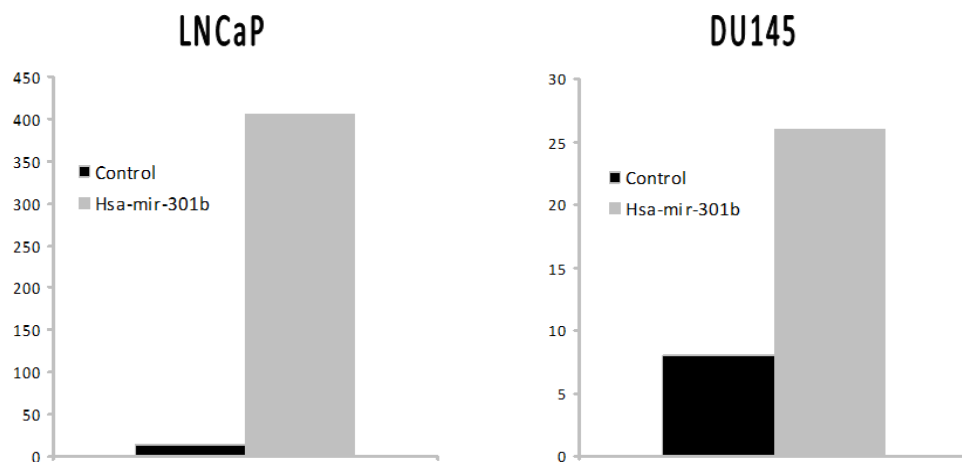


Figura 12. Efecto la sobreexpresión de miR-301b sobre la capacidad de invasión de las células. Se contaron las células invasivas en ensayos in vitro en cámaras de invasión con matrigel. Los nombres de las líneas celulares ensayadas se indican arriba.

En suma, hsa-mir-301b es un microARN que se expresa preferentemente en las células madre de cáncer de próstata y se reprime luego de la diferenciación inducida por suero. Por otro lado, su expresión aumenta con la agresividad de las líneas celulares ensayadas. Finalmente, la inducción de su sobreexpresión da lugar a la inhibición de la diferenciación, y a un incremento importante en la invasibilidad. Tanto los datos de expresión como los fenotipos encontrados lo definen un comportamiento un posible oncogen en PCa. El objetivo de esta Tesina fue continuar el estudio del papel de hsa-mir-301b en PCa.

Antecedentes del hsa-mir-301b.

El hsa-mir-301b es un microARN codificado en el genoma humano (FIGURA 13), fue encontrado en Berezikov, E., G. van Tetering, et al. (2006).

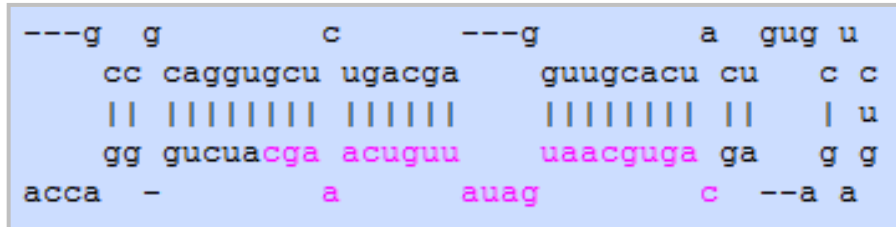


Figura 13. Se muestra la estructura en horquilla del pre-microARN del hsa-mir-301b, en rosado se observa la secuencia del microARN maduro. La imagen fue extraída de la base de datos de microARNs MirBase (<http://www.mirbase.org/>).

Específicamente es un microARN intrónico (miRtron) que forma parte de una de las variantes de corte y empalme (PPIL2-002) de la proteína Peptidil-prolil cis-trans isomerasa tipo 2, PPIL2, específicamente se encuentra ubicado en el primer intrón. En la FIGURA 14 podemos ver la ubicación cromosómica del microARN en el cromosoma 22, además podemos visualizar la ubicación precisa del microARN en el primer intrón del transcripto primario. Esta proteína se encuentra ubicada en el cromosoma 22 brazo q región 11.21. La proteína PPIL2 es miembro de la familia de las ciclofilina isomerasas peptidilprolil. Las ciclofilinas son una familia muy conservada, los miembros de esta familia juegan un papel muy importante en el plegamiento de proteínas.

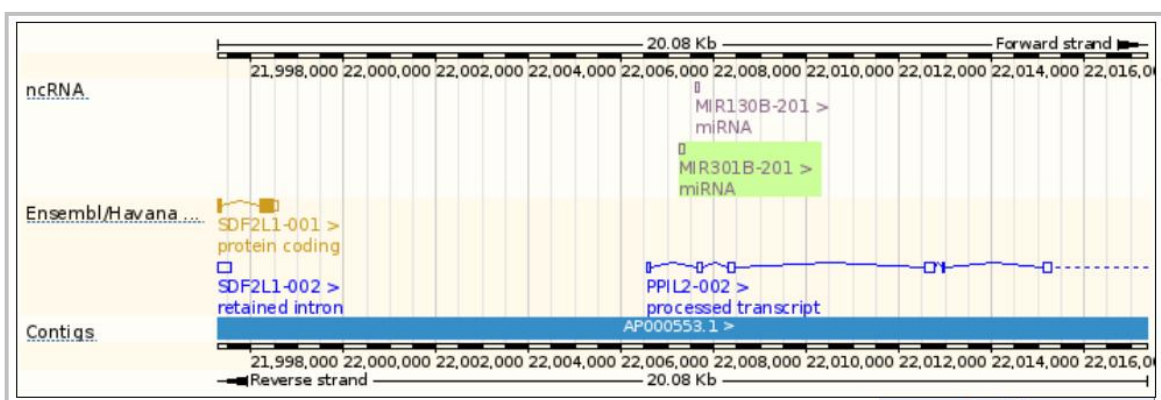


Figura 14. Se muestra la ubicación genómica del gen del hsa-mir-301b, se puede ver resaltado en verde al microARN y en azul se observa al transcripto PPIL2-002. Se puede apreciar como el hsa-mir-

301b forma parte del primer intrón de dicho transcrito. Imagen fue extraída de <http://www.ensembl.org>.

El hsa-mir-301b se encuentra en un cluster constituido con el hsa-mir-130b, este se encuentra corriente arriba en el mismo gen de PPIL2, formando parte de un exón. El microARN hsa-mir-301b es miembro de la familia de microARNs mir-130, esta familia en el humano esta compuesta por los microARNs hsa-mir-130a, hsa-mir-130b, hsa-mir-301a y el hsa-mir-301b. A partir del alineamiento de las secuencias del precursor de microARNs de los microARNs de la familia mir-130 realizado en el programa ClustalW (resultados no mostrados), podemos observar que con el miembro de la familia con el que posee mayor homología en la secuencia del microARN maduro, es con el hsa-mir-301a, específicamente varían en dos bases. Teniendo en cuenta que los microARN reconocen a sus genes blancos moleculares por complementariedad de bases, es muy probable que con el gen hsa-mir-301a comparta genes blancos. De hecho, en la búsqueda de genes blancos con el predictor de genes blancos de microARNs Target Scan (<http://www.targetscan.org/> (Garcia, D. M., D. Baek, et al. (2011))), se observó que estos dos microARNs presentan una gran cantidad de genes predictivos blancos compartidos (resultados no mostrados). Es interesante mencionar que no existe, prácticamente evidencia relacionada a este microARN en la bibliografía. Específicamente, existen solo dos trabajos publicados asociados a este microARN. Uno de ellos trabajaron en la búsqueda de diferentes perfiles de expresión entre células de cáncer de colon sin metástasis linfática y células control, mediante la utilización de ensayos de microarreglos validados por qRT-PCR. Como resultado de este estudio encontraron 14 microARNs involucrados con el cáncer de colon. Entre estos se encuentra el hsa-mir-301b, específicamente se encuentra sobreexpresado en cáncer de colon. (Wang, Y. X., X. Y. Zhang, et al., (2010)). Interesantemente, este resultado se encuentra en concordancia con los resultados reportados en los antecedentes de este trabajo, donde se propone que el hsa-mir-301b actuaría como oncomir. No obstante, otro trabajo reciente del 2011 muestra evidencia contraria, marcando una función tumor supresora del hsa-mir-301b. Específicamente, en el estudio se comparan los perfiles de expresión de microARNs entre linfoma folicular e hiperplasia folicular. Como resultado de este análisis hallaron al hsa-mir-301b subexpresado en asociación

con el linfoma folicular. (Wang, W., M. Corrigan-Cummins, et al. (2011)). La falta de trabajos acerca de este microARN no permiten identificarlo definitivamente asociado con una función como oncomir o tumor supresor.

Objetivo general.

Comprender el rol del hsa-mir-301b desregulado en cáncer de próstata en el origen y el mantenimiento del fenotipo tumoral.

Objetivos específicos.

1. Determinar el efecto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b en la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de próstata (DU145 y LNCaP).
2. Identificar posibles genes blancos de acción del hsa-mir-301b vinculados con el cáncer de próstata.

Hipótesis del trabajo.

El microARN hsa-mir-301b se encuentra desregulado en el cáncer de próstata, contribuyendo al desarrollo y mantenimiento del fenotipo de tipo célula madre, en las células madre de cáncer de próstata.

Materiales y Métodos:

Líneas celulares:

Las líneas celulares de cáncer próstata (PCa) seleccionadas para realizar este trabajo, son LNCaP y DU145.

La línea celular LNCaP fue adquirida del repositorio celular de la compañía ATCC (Manassas, Virginia, EEUU). Es una línea celular humana derivada de un carcinoma de próstata, específicamente de un sitio de metástasis de la región supraclavicular izquierda del nodo linfático. Estas células fueron extraídas en 1977 de un hombre adulto caucásico de 50 años. Estas células presentan una morfología de tipo epitelial (FIGURA 15) y son tumorigénicas en ratones inmunodeprimidos. Presentan reactividad positiva para receptor de andrógenos y para receptor de estrógenos, respondiendo a la 5-alfa-dihidrotestosterona con una modulación de su crecimiento. El análisis citogenético evidencia que es una línea celular tetraploide donde mayoritariamente las células presentan 84, 86 y 87 cromosomas (<http://www.iclc.it/listanuova.html>).

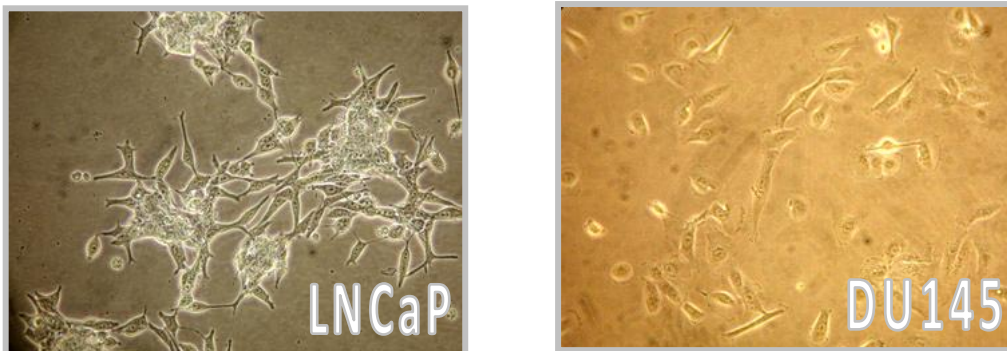


Figura 15. Imagen de microscopía óptica de las dos líneas celulares elegidas para el desarrollo del trabajo (<http://www.iclc.it/listanuova.html>). Aumento 20x.

La línea celular DU145 fue también adquirida en ATCC. Es una línea celular humana proveniente de un carcinoma de próstata, específicamente, de un sitio de metástasis en el cerebro. Fue extraída de un hombre adulto caucásico de 69 años. Estas células presentan una morfología de tipo epitelial (FIGURA 15) 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>).

Vector lentiviral:

Las líneas celulares transfectantes utilizadas en este trabajo (LNCaP y DU145) fueron generadas por la Dra. Duhagón, utilizando un vector lentiviral (FIGURA 16) obtenido de forma comercial en GeneCopoeia (miExpress precursor expression clones, pEZXR-MR01). Este es un vector diseñado para dirigir la expresión de ARNs precursores del microARNs. Contiene además el gen reportero de la proteína verde fluorescente eucariótica (eGFP), que es útil para el monitoreo de la transducción y el seguimiento de las células en diversas aproximaciones experimentales. El microARN precursor del hsa-mir-301b de aproximadamente 60 nucleótidos fue clonado dentro del vector. Para controlar los experimentos realizados con este vector, utilizamos un vector control idéntico al descrito anteriormente, excepto por la sustitución de la secuencia del precursor de hsa-mir-301b por una de 60 nucleótidos al azar que no se encuentra codificada en el genoma. Tanto la expresión del precursor del hsa-mir-301b como la del control, se encuentra gobernada por el promotor del gen para la histona H1. Este es un promotor fuerte que asegura su expresión constitutiva. Además, este vector presenta un gen de resistencia al antibiótico Neomicina, que permite realizar la selección específica de las líneas celulares transfectantes, así como asegurar la selección de aquellas líneas que hayan integrado el vector de forma estable. Esta construcción se integra en el genoma de forma estable, permitiendo la expresión constitutiva del microARN en estudio. La transfección estable nos permitió realizar ensayos de más de una semana, manteniendo la expresión del microARN dirigida por el vector.

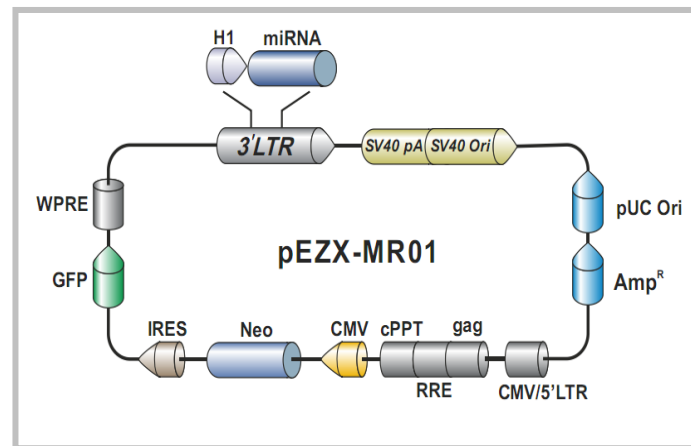


Figura 16. Esquema del vector lentiviral con el cual fueron transfectadas las líneas celulares de cáncer de próstata (<http://www.genecopoeia.com/product/mirna/precursor.php>).

Medio de cultivo:

Para el cultivo de las líneas celulares de PCa LNCaP y DU145 utilizadas para este estudio, se seleccionó el medio de cultivo comercial RPMI 1640 R7755, tal como lo indica el repositorio celular ATCC y la literatura. Al mismo se le adicionó 2.0 g/L de Bicarbonato de Sodio, 0.3 g/L Glutamina, 10% de Suero Fetal Bovino (F.B.S.) descomplementado, 1% de Penicilina y Estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente). Se ajustó el pH dentro del rango de $\text{pH} = 6.9 \pm 0.3$. Al medio de cultivo RPMI 1640 R7755 mas lo suplementado, le llamamos medio RPMI 1640 completo. Para preparar un litro del medio RPMI 1640 completo, se pesó 10.3 g de RPMI 1640 R7755, 0.3 g de L-Glutamina y 2.0 g de Bicarbonato de Sodio. Esta mezcla fue disuelta en 890 mL de H₂O mQ mediante mezclado con pastilla magnética. A continuación, se midió el pH de la solución con pH-metro. En caso de presentar un pH dentro del rango de 6.9 ± 0.3 , pasábamos al siguiente paso. En el caso contrario, procedíamos a llevar el pH de la solución dentro del rango de pH deseado. El pH era corregido adicionando soluciones de HCl 1N o NaOH 1N. Luego, en condiciones de esterilidad en campana de flujo laminar, se procedió a filtrar la solución con una premembrana de 0.8 µm y posteriormente en membrana 0.22 µm. Consecutivamente, se agregó 100 mL Suero Fetal Bovino descomplementado y 10 mL de antibiótico

Penicilina y Estreptomicina (100 U/mL y 100 µg/mL respectivamente). Finalmente, el medio de cultivo RPMI 1640 completo se almacenó y mantuvo en la heladera a 4°C.

Descompletación del Suero Fetal Bovino:

Para inactivar los factores del complemento presentes en el suero fetal, se descongeló una botella de suero a 37°C, luego se aumentó la temperatura del baño de agua hasta 56°C; una vez alcanzada esta temperatura, se incubó durante 45min. A continuación, se enfrió la botella en baño de hielo y se alicuotó convenientemente para almacenar en freezer a -20°C.

Descongelado de crioviales:

Para almacenar células por largos períodos de tiempo, se utilizaron crioviales de 1.4 mL con medio RPMI 1640 completo, suplementado con un 10% de DMSO y un millón de células en fase exponencial de crecimiento. Para descongelar células almacenadas a -80°C o en nitrógeno líquido, se colocó el criovial en baño de agua a 37°C. Una vez descongelados los crioviales, el contenido es inmediatamente trasvasado a tubos estériles de 15 mL, a los que se añade 5 mL de medio RPMI 1640 completo, precalentado a 37°C. Se centrifuga a 1200 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos. Luego, se aspira el medio utilizando una bomba de vacío, cuidando de no arrastrar el pellet. A continuación, se resuspende el pellet en 9 mL de medio RPMI 1640 completo y se trasvasa a frascos de cultivo celular estériles de 25 cm², con la superficie tratada para adhesión. Finalmente, se colocan los frascos horizontalmente en una incubadora a 37°C, a una atmósfera de presión, con una concentración de CO₂ del 5% y 95% de humedad.

Mantenimiento del cultivo:

Rutinariamente, se observó y evaluó al microscopio el crecimiento y apariencia de las células en cultivo. Se realizaron cambios del medio cultivo, una vez cada 2 o 3 días, en función de la densidad celular del cultivo y del color del medio que contiene un indicador colorimétrico de pH. El medio RPMI 1640 completo pasa del color rosado-rojo (rojo fenol pH 7.4), a un tono naranja amarillento pH alrededor de 6.5.

Subcultivo o Repique de la monocapa de células:

Una vez alcanzado un 80% de confluencia en la monocapa celular, se realizaron subcultivos para mantener el cultivo en crecimiento. En primera instancia, se observó al microscopio óptico el correcto crecimiento y apariencia de las células en la botella de cultivo, que para estas células consiste en la formación de una monocapa continua y uniforme. Con una pipeta de 1 mL y una bomba de vacío, se descartó el medio de cultivo de la botella. Seguidamente, se realizaron 2 o 3 lavados con 5 mL de PBS 1X y se adicionó una solución de tripsina 0.25% en cantidad suficiente para cubrir la monocapa celular. En un lapso de entre 5 y 15 minutos, se aprecian los signos de desprendimiento celular de la monocapa por observación al microscopio; inmediatamente, se agregan 5 mL de medio RPMI 1640 completo para inactivar a la tripsina. Posteriormente, se pipetea enérgicamente para deshacer los acúmulos celulares no deseados, se transfiere todo el contenido a un tubo estéril de 15 mL y se centrifuga a 1200 rpm durante 5 minutos. A continuación, se descarta el medio sobrenadante con una pipeta estéril conectada a una bomba de vacío. Luego se resuspende el pellet con 5 mL de medio RPMI 1640 completo hasta obtener una solución celular homogénea. Para el recuento celular se utiliza Azul de Tripano al 0.4% en PBS 1X, que colorea las células muertas, permitiendo así distinguir las células viables de las que no lo son. Para esto, se toman 20 μ L de células (que se van a descartar), y se mezcla en un tubo de 1,5 mL con 20 μ L de solución de Azul de Tripano. Se colocan 10 μ L de esta nueva suspensión en cada lado del hemocitómetro para realizar el recuento del modo que se explica en el siguiente apartado. Una vez realizado el recuento, tomamos la alícuota de la suspensión celular inicial que contiene el número de células que deseamos subcultivar y le agregamos el volumen de medio, necesario para obtener una suspensión de 10 mL en el frasco de cultivo de 25 cm². Finalmente, se deja el frasco incubando en estufa a 37°C, a una atmósfera de presión y una concentración de CO₂ del 5% y 95% de humedad.

Recuento en cámara de Neubauer:

Al observar al microscopio la cámara de Neubauer, se puede apreciar que esta presenta una cuadrícula conformada por 9 cuadrados grandes, cada uno subdividido en otros 16 cuadrados pequeños. El volumen sobre cada uno de estos 9 cuadrados grandes, es aproximadamente de 0.1 μL . Para realizar el recuento celular, se utilizan los dos cuadrados grandes a cada lado de la cámara, de manera que se realizan cuatro determinaciones del número de células en el cuadrado grande, cuya media será el número de células en 0.1 μL de la suspensión de células en Azul de Tripiano. 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.

Congelado de células en crioviales:

El congelado de células permite almacenar células de un cultivo por tiempos prolongados. Las células se almacenaron cuando el cultivo alcanzó un 80% de confluencia en la monocapa celular. En primera instancia, se verificó que por observación al microscopio óptico el cultivo creció normalmente y se procedió al desprendimiento de células por tripzinación, tal como se explicó anteriormente para el subcultivo. Luego de contadas las células en el hemocitómetro, se toma una alícuota de la suspensión celular que contenga entre 1 a 2×10^6 células/vial. Se adiciona medio de congelación de modo que cada vial resulte en un volumen final de aproximadamente 1.4 mL de medio RPMI 1640 completo, suplementado con 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO) como agente crioprotector. Para ello realizamos una solución de congelado, esta consta de medio RPMI 1640 completo suplementado con 10% DMSO. Con esta solución, realizamos una dilución 1:1 con la suspensión celular, para que finalmente obtengamos el porcentaje deseado de 5% de DMSO en la solución final. Seguidamente, se colocó los crioviales en un recipiente con alcohol isopropílico, que permite la disminución gradual y controlada de la temperatura ($1^\circ\text{C}/\text{min}$) cuando se coloca en un freezer -80°C . Luego, se mantienen los crioviales durante por lo menos

un día en el freezer -80°C , para finalmente trasladarlos a cámara con nitrógeno líquido a -180°C .

Selección de las células transfectantes con el antibiótico Neomicina:

Siguiendo el protocolo de descongelado descrito anteriormente, se descongelaron crioviales de las líneas celulares DU145 normales (wild type), es decir no transfectadas; transfectadas con el vector lentiviral conteniendo el precursor hsa-mir-301b, y células transfectadas con el vector lentiviral control, conteniendo la secuencia al azar. Estas líneas celulares habían sido preparadas en un trabajo previo por Duhagon, pero el proceso de selección con antibiótico no había sido finalizado al momento que se hicieron los crioviales. De modo que, en este trabajo se terminó la selección y se evaluó la expresión del hsa-mir-301b al final de proceso. A continuación, se colocaron a incubar a 37°C y 5 % de CO_2 durante 24 horas, en botellas para cultivo celular de 75 cm^2 para células adherentes, con 25mL de medio RPMI 1640 completo. Luego de transcurridas 48 horas, se agregó a las botellas en cultivo $125\mu\text{L}$ de Neomicina (100mg/mL), para llevar a cabo el proceso de selección. El proceso de selección conduce a la muerte a aquellas células que no poseen el vector lentiviral que confiere la resistencia al antibiótico. A continuación, se evaluó al microscopio óptico la evolución de cada transfectante cada 24hs. Tanto, los cambios de medio como los subcultivos necesarios se realizaron de manera convencional. El procedimiento de selección con Neomicina se continuó durante dos semanas. Al finalizar el proceso de selección, se realizaron los crioviales correspondientes para las variantes transfectantes DU145, hsa-mir-301b y control. Estas líneas celulares fueron utilizadas durante el desarrollo de este trabajo.

Prueba de detección de *Mycoplasma*:

Las distintas líneas celulares utilizadas en este trabajo fueron rutinariamente analizadas para la detección de *Mycoplasma*, utilizando 2 kits basados en la amplificación por PCR de secuencias específicas: un kit comercial denominado

MycoQuick (System Bioscience, Inc.) y un *kit* no comercial que nos fue cedido por un laboratorio colaborador que lo emplea rutinariamente.

Detección de *Mycoplasma* utilizando el *kit* MycoQuick:

Se partió de una muestra directa del medio de cultivo adicionado al menos 2 días antes en el cultivo a analizar. Se colectó 1.5 mL de medio realizando un pequeño raspado de la monocapa celular con el fin de levantar algunas células. La muestra fue centrifugada a 13.000 rpm durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet fue lavado una vez con 0.5 mL de PBS 1X. Seguidamente se adicionó pipeteando y mezclando suavemente 100 µL del Buffer de Lisis de MycoQuick; esta solución se dejó incubar 5 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se pasó a incubar a baño de agua a 95°C durante 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó el lisado a 13.000 rpm durante 5 minutos y el sobrenadante resultante de la centrifugación se pasó a un tubo nuevo y se almacenó a -20°C. Se tomaron 2 µL de este sobrenadante como molde para utilizar en la Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR).

Las reacciones de PCR se realizaron en 25 µL de volumen final conteniendo: 2 µL de molde, los oligonucleótidos cebadores suministrados por el kit de detección, 1x del tampón STR 10x (PROMEGA Corp.) compuesto de KCl 500 mM; Tris-HCl 100mM pH 9; MgCl₂ 15 mM; Triton®X-100 1%; dNTPs 2 mM de cada uno, 0,25 U de enzima *Taq* polimerasa (Gibco BRL Life Technology Corp. o Fermentas) y el volumen necesario de H₂O tratada con luz UV para completar 25 µL finales de reacción. Previo calentamiento de la muestra a 95°C durante 30 seg, se realizaron 40 ciclos de amplificación, en los cuales la temperatura alternó en tres etapas sucesivas. El primer paso a 95°C durante 30 seg para la desnaturalización del ADN. El siguiente para la hibridación específica de los cebadores a 56°C durante 30 seg. El tercer paso del ciclo, a 68°C durante 30 seg permite la polimerización de los nucleótidos en la hebra copia del molde por la enzima. Al finalizar el ciclado, los tubos se incubaron a 68°C durante 5 minutos, lo que asegura una polimerización completa de todos los fragmentos.

Los fragmentos de ADN obtenidos se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 2.5%, porcentaje adecuado para resolver las moléculas de ADN del rango de tamaño esperado. Los geles fueron preparados en tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8), y este mismo tampón fue utilizado como tampón de corrida. Las corridas

electroforéticas se realizaron a 5 V/cm y se visualizaron en transiluminador UV previa tinción del gel con bromuro de etidio 0,5 µg/mL o Good View 0.5 µg/mL final.

Detección de *Mycoplasma* utilizando el *kit* no comercial:

Se partió directamente de una muestra de 1 mL del sobrenadante del cultivo a analizar. Al igual que en el caso anterior, este cultivo debe llevar al menos 2 días sin haberse efectuado un cambio del medio. Para efectivizar el colectado de algunas células en el momento de la toma, se efectuó un raspado de la monocopa celular para desprender algunas células. Este análisis consta de 2 PCR anidadas (PCR 1 y PCR 2) diseñadas para lograr un mayor nivel de sensibilidad.

Para realizar la PCR 1 se toma directamente 5 µL del homogeneizado de 1 mL anteriormente extraído del cultivo. Las reacciones se realizaron en 20 µL de volumen final, conteniendo los cebadores para la PCR 1 (0.5 µM), 1x tampón STR 10x (KCl 500 mM; Tris-HCl 100mM pH 9; MgCl₂ 15 mM; Triton®X-100 1%; dNTPs 2 mM de cada uno de PROMEGA Corp) y 0,5 U de enzima *Taq* polimerasa (Gibco BRL Life Technology Corp. o Fermentas). Previo calentamiento de la muestra a 94°C durante 5 min, se realizaron 35 ciclos de amplificación, en los cuales la temperatura alternó en tres etapas sucesivas. Un primer paso a 94°C durante 50 seg para la desnaturalización del ADN. El siguiente paso es la hibridación específica de los cebadores a 55°C durante 1 min 15 seg. El último paso, para la polimerización de los nucleótidos, se realiza a 72°C durante 1 min 10 seg. Luego se deja a 72°C durante 5 minutos lo que asegura una polimerización completa de todos los fragmentos.

Para realizar la PCR 2 se toma directamente 3 µL del producto de la PCR 1. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 20 µL, usando los cebadores para la PCR 2 (0.5 µM), 1x tampón STR 10x (KCl 500 mM; Tris-HCl 100mM pH 9; MgCl₂ 15 mM; Triton®X-100 1%; dNTPs 2 mM de cada uno de PROMEGA Corp) y 0,5 U de enzima *Taq* polimerasa (Gibco BRL Life Technology Corp. o Fermentas). El programa de ciclado de la PCR 2 es el mismo que utilizamos para la PCR 1. Las PCR se realizaron en un termociclador Primus 25 advanced (www.peqlab.us).

Los fragmentos de ADN se analizaron por electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Los geles fueron preparados en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8), y este mismo tampón fue utilizado como tampón de corrida. Las separaciones se realizaron a

5 V/cm y se visualizaron en transiluminador UV previa tinción del gel con bromuro de etidio 0,5 µg/mL o Good View 0,5 µg/mL.

Cuantificación del nivel de expresión del hsa-mir-301b en las líneas celulares transfectantes:

El ARN necesario para la cuantificación del hsa-mir-301b en las dos líneas celulares de PCa (LNCaP y DU145) transdúcidas con vectores lentivirales, fue extraído utilizando el *kit* miRNAeasy de Qiagen. Este permite recuperar los ARNs totales, incluyendo a los ARNs pequeños, en forma cuantitativa.

Se partió de una suspensión celular no mayor a 1×10^6 células, que fue centrifugada por 5 minutos a 1200 rpm. Cuidadosamente, se removió y se descartó el sobrenadante. El precipitado fue resuspendido vigorosamente en un volumen de 700 µL del reactivo de lisis Qiazol y la muestra se almacenó a -20°C. A continuación, se descongeló el lisado en baño de agua a 37°C, prontamente se homogeneizó con la ayuda de un vortex y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Seguidamente, se agregó 140 µL de cloroformo y con la ayuda de un vortex se homogeneizó vigorosamente durante 15 seg. Posteriormente, se dejó el tubo incubando durante 3 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos. La muestra se separa en 3 fases diferentes: una fase superior, sin color, acuosa que contiene al ARN; una fase intermedia color blanco; y otra fase inferior roja, la fase orgánica. La fase superior acuosa fue transferida a un tubo nuevo y se le adicionó 1.5 volúmenes de etanol 100%, mezclando vigorosamente. A continuación, se colectó 700 µL de la muestra (incluyendo cualquier precipitado, si es que existía) y se lo colocó en una mini columna RNeasy dentro de un tubo de 2 mL. Se procedió a centrifugar el tubo con la columna incorporada durante 15 seg a 10.000 rpm. Luego de centrifugar se descarto la fracción que no fue retenida. Si el volumen de muestra de partida excedía los 700 µL que podíamos cargar en la columna, repetimos el paso anterior cargando el resto de alícuota de la muestra faltante. A continuación, se agregaron 700 µL del Buffer RWT (buffer de lavado) a la columna y se centrifugó durante 15 seg a 10.000 rpm. Luego se descartó el tubo con la fracción que no fue retenida. Posteriormente se transfirió la columna RNeasy a un nuevo tubo de 2 mL, se pipeteó 500 µL del Buffer RPE dentro de

la misma y se centrifugó durante 15 s a 10.000 rpm, descartando la fracción que no fue retenida. Luego, nuevamente, se agregó 500 μ L de Buffer RPE a la columna y se centrifugó durante 2 minutos a 10.000 rpm para secar la membrana de silica-gel que forma la columna. Opcionalmente, se colocó la columna en un nuevo tubo de 2 mL y se centrifugó durante 1 minuto a máxima velocidad. Posteriormente, para la elusión del ARN, se transfirió la columna a un nuevo tubo, esta vez de 1.5 mL, se agregó 50 μ L de agua libre de ARNasas en la columna y se centrifugó durante 1 min a 10.000 rpm.

Para estimar la pureza de la muestra se determinó la absorbancia a 260nm y 280nm. El ARN puro para realizar los métodos convencionales de biología molecular presenta una relación de A_{260nm}/A_{280nm} de entre 1,9 y 2.1. La concentración de ARN se estimó a partir de la medida de su absorbancia a 260nm, teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia a 260nm corresponde a una concentración de 44 μ g/mL de ARN. Una vez obtenido un ARN de pureza mencionada, pasamos a realizar la transcripción reversa seguida de la PCR cuantitativa (qRT-PCR).

La qRT-PCR fue realizada utilizando el sistema miScript de Qiagen y oligonucleótidos cebadores específicos para el hsa-mir-301b. Para la Retro Transcripción (RT), la muestra de partida fue el ARN total extraído de las células. Se realizó la normalización de las cantidades de ARN de partida, tomando en cuenta 2 factores: primero igualar las concentraciones de ARN de partida de cada muestra a estudiar, segundo no excederse de la cantidad máxima de ARN molde recomendada por el *kit*. A continuación, en cada reacción se colocó como máximo 1 μ g de ARN en hielo (manteniendo la misma cantidad de ARN inicial obtenido de la línea control y la que sobreexpresa hsa-mir-301b). Se descongeló el agua libre de ARNasas y el buffer 5x miScript RT. Una vez puestos a temperatura ambiente, se preparó la reacción de transcripción reversa de acuerdo a lo estipulado por el *kit*. Las reacciones se realizaron en 20 μ L de volumen final. Se agregó el molde de ARN a cada tubo conteniendo 4 μ L de miScript RT Buffer 5X, 1 μ L de miScript Reverse Transcriptase Mix y el volumen necesario de agua libre de ARNasas para alcanzar el volumen final. Seguidamente, se incubó a 37°C durante 60 min, luego 5 min a 95°C y se colocó en hielo. Las muestras se almacenaron -20°C.

Para dar paso a la Real Time PCR o PCR cuantitativa (qPCR) se descongeló el 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, el 10x miScript Universal Primer, el 10x miScript Primer Assay, el molde de cDNA y el agua libre de ARNasas del *kit*. Una vez

que las soluciones a utilizar se encontraban a temperatura ambiente se procedió a realizar las mezclas correspondientes de acuerdo a lo estipulado en el protocolo del *kit*. Las reacciones se realizaron en volumen final de 10 μ L. En cada mezcla se incorporó 5 μ L de 2x QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ L de 10x miScript Universal Primer, 1 μ L de 10x miScript Primer Assay, 1 μ L del ADNcopia y el volumen necesario de agua libre de ARNasas para alcanzar el volumen final. El “Primer Assay” consiste en los cebadores específicos para el hsa-mir-301b y para los controles utilizados (U6, Scarna17 o Snord13), todos ellos obtenidos comercialmente de la compañía Qiagen (su secuencia está bajo licencia). Comenzamos con un paso de calentamiento de la muestra a 95°C durante 15 min, seguido de 40 ciclos de amplificación, en los cuales la temperatura alternó en tres etapas sucesivas: un primer paso a 94°C durante 15 seg para la desnaturalización del ADN. Un segundo paso a 55°C durante 30 seg para la hibridación específica de los cebadores. Finalmente, un tercer paso a 70°C durante 30 seg para la extensión de la cadena por la ADN polimerasa termoestable. Se colocaron los tubos en un equipo Rotor-Gene Q (Corbett Research, con licencia adquirida por Qiagen), utilizando el rotor Gene-Disk 100 para tubos de 100 μ L. Utilizando la aplicación informática que controla al equipo (Rotor-Gene 6000 Series version 1.7 Software, de Corbett Research), se estableció el programa de ciclado y se procedió a realizar la PCR cuantitativa. Finalmente, se analizaron los datos obtenidos del ciclado en la misma aplicación y además en el programa Excel (Microsoft Office 2007).

Estudio de la proliferación celular: Recuento de células viables

Siguiendo el protocolo de subcultivo de monocapa celular, se desprendieron las células de la monocapa y se prepararon suspensiones homogéneas de 5×10^2 células/mL para las dos líneas celulares transfectantes de cada línea de PCa (LNCaP y DU145), en fase de crecimiento exponencial. Se sembraron 2mL de la suspensión de células por pocillo (1×10^3 células/pocillo), en placas de cultivo de 6 pocillos (tratadas para cultivo de células adherentes) para ambas líneas celulares transfectantes (control y hsa-mir-301b) DU145 y LNCaP. En los tiempos establecidos, se removieron las células por

tripsinación convencional y se realizó el recuento de células viables en cámara de Neubauer. Se utilizó la tinción Azul de Tripano para descartar las células muertas. Todos los recuentos en los tiempos establecidos, se realizaron por triplicado y siguiendo el método descrito anteriormente. La FIGURA 17 muestra el diseño de siembra de células en placa de 6 pocillos, utilizado en el ensayo de recuento celular:

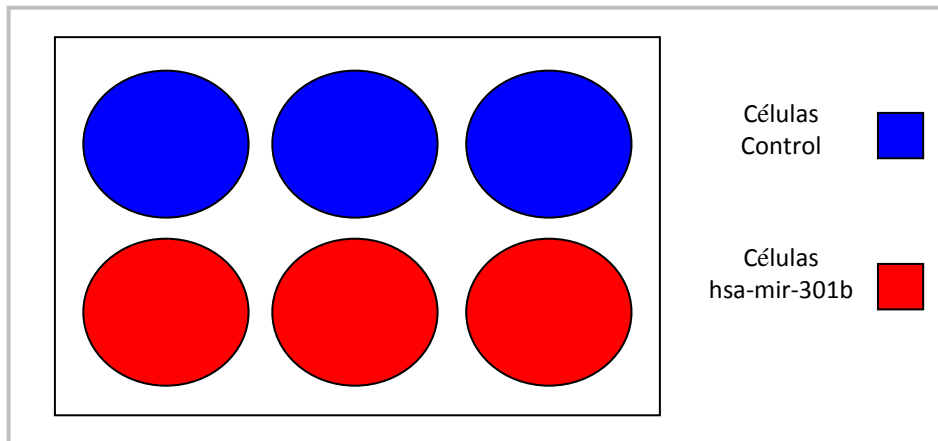


Figura 17. Esquema del diseño de sembrado de las células para el recuento celular en las placas de cultivo de 6 pocillos.

Los valores obtenidos en estos ensayos, son analizados en el sitio web <http://www.doubling-time.com/compute.php> donde se calculó el tiempo de duplicación del cultivo, a partir del cálculo de la curva exponencial a la cual se ajustan mejor los datos. La pendiente de la relación exponencial hallada, permite establecer matemáticamente el tiempo de duplicación del cultivo (Roth V., 2006).

Estudio de la proliferación celular: Ensayo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-yl)-bromato de 2,5-difeniltetrazolium (MTT):

Para el ensayo de MTT de las líneas celulares de PCa (LNCaP y DU145) transfectantes se prepararon suspensiones homogéneas de 1×10^3 células/mL en medio RPMI 1640 completo para ambas líneas celulares transfectantes (control y hsa-mir-301b), en fase de crecimiento exponencial. Se sembraron 100 μ L de la misma por pocillo (1×10^2 células) en placas de cultivo de 96 pocillos, tratadas para adherencia celular. Se incubó a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 horas para permitir su adherencia. A continuación, en los tiempos establecidos en el ensayo, a una de las placas preparadas se le añaden 20

μL de MTT (5 mg/mL) en solución PBS 1X. Se incubó por 4 horas a 37°C y 5 % de CO₂ para permitir la formación de cristales de formazán. Luego se eliminó el medio, mediante aspirado con pipeta estéril acoplada a una bomba de vacío. Seguidamente, se añadió 200 μL de DMSO y se incubó los cultivos a temperatura ambiente, cubiertos con papel aluminio y con agitación orbital moderada, durante 15 minutos. La lectura de densidad óptica (DO) se realizó en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Varioskan® Flash Multimode (www.thermo.com)) a longitudes de onda de 570 nm y 690 nm. Posteriormente, se evaluó y graficó la relación de absorbancia a 570nm-690 nm. El diseño de cultivo del ensayo en placa es como se muestra en FIGURA 18.

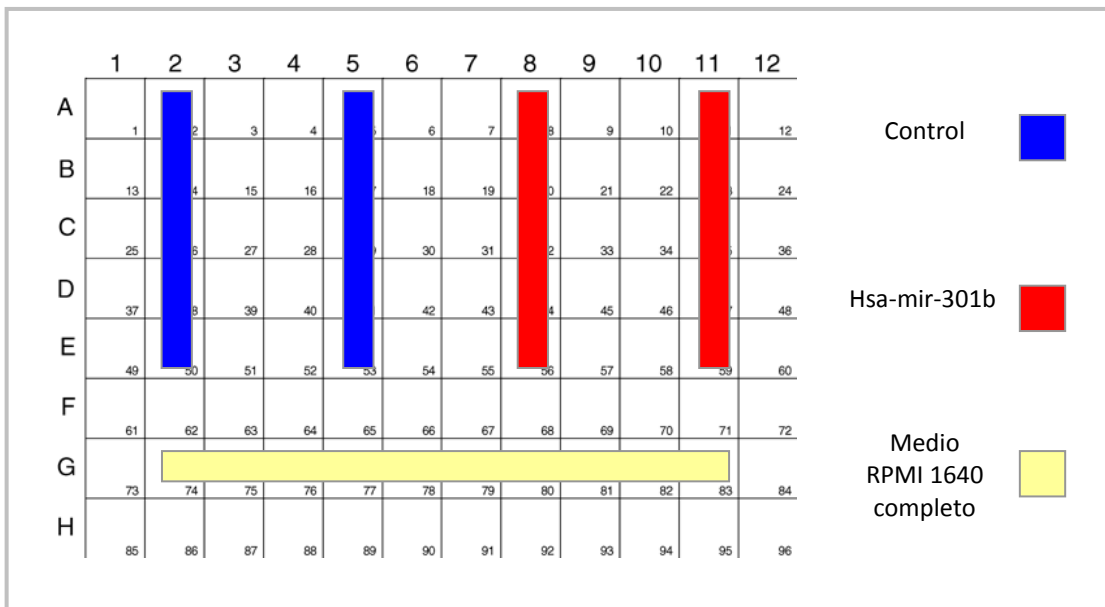


Figura 18. Esquema del diseño de sembrado de las células para el ensayo de MTT en las placas de cultivo de 96 pocillos.

Estudio de la proliferación celular: Análisis de citometría de flujo:

Para el análisis de la distribución de células durante el ciclo celular por contenido de ADN, se utilizó una tinción con yoduro de propidio y conteo de células en un citómetro de flujo FACSVantage. Se sembraron tres botellas de 75 cm² por triplicado de las dos variantes celulares transfectantes de estudio (control y hsa-mir-301b). Al alcanzar aproximadamente un 60% de confluencia (asegurando de esta manera encontrarnos

en fase de crecimiento exponencial), se procedió a realizar las suspensiones celulares para analizar por citometría de flujo. Las suspensiones de células se realizaron siguiendo el protocolo de tripsinación convencional, partiendo de los cultivos celulares en monocapa. Se continuó realizando dos lavados con PBS 1X, centrifugado a 1200 rpm a 4°C durante 5 min, descartando el sobrenadante y resuspendiendo el pellet en PBS 1X con ayuda de un vortex suave. A continuación, conservando en hielo las suspensiones celulares, se procedió a fijar las células añadiendo gota a gota 1 mL de etanol 70% en PBS 1X helado, manteniendo el tubo con suave agitación. Luego se mantuvieron las muestras a -20°C durante 30 min. Seguidamente, se continuó con un lavado de las células fijadas con PBS 1X, centrifugando a 1200 rpm a 4°C durante 5 min. A cada muestra se le agregó RNasa 0.1 mg/mL y a continuación yoduro de propidio 50 µg/mL. Se dejó incubando 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Luego se filtró a través de malla de nylon de 35 µm de diámetro, para remover los acúmulos de células que obstruyen al citómetro. Finalmente se procedió al análisis en el citómetro realizado por Federico Santiñaque en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) usando un citómetro FACSAria y la aplicación CellQuestPro (BD CellQuest Pro software © 2002, Becton, Dickinson, <http://www.bdbiosciences.com>).

Análisis de la actividad de los posibles genes blancos del hsa-mir-301b.

Se han desarrollado diferentes algoritmos para la búsqueda de genes blancos predictivos de microARNs y estos se encuentran disponibles en línea. Cada uno de ellos valora características y propiedades de la interacción ARNm-microARN que han sido descritas y parcialmente comprobadas experimentalmente, pero cada uno hace énfasis en aspectos específicos (Min, H. and S. Yoon, (2010)). Debido a estas diferencias, la práctica habitual para la búsqueda de genes con sitios blanco para un microARN, consiste en el uso simultáneo de varios algoritmos seguido del establecimiento de un grupo intersección de los resultados obtenidos por los diferentes buscadores (Witkos, T. M., E. Koscianska, et al. (2011)). De este modo, estamos seleccionando aquellos genes blancos que son compartidos en la predicción

de los distintos programas utilizados. La página web Mirwalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), contiene una base de datos que presenta información sobre microARNs en humano, ratón y rata (Dweep, H., C. Sticht, et al., (2011)). De las herramientas de predicción de genes blanco que ofrece este sitio, no solo nos permiten la utilización del algoritmo de predicción diseñado por ellos (Mirwalk, última actualización 15 de marzo 2011), sino que también permite realizar la búsqueda conjunta con otros algoritmos de predicción como lo indica la TABLA 4.

Programas de Predicción	Diana-microT	miRanda	miRDB	PICTAR	PITA	RNA22	RNAhybrid	Targetscan
Versión ó Fecha	Versión 3.0	Agosto 2010	Abril 2009	Marzo 2007	Agosto 2008	Mayo 2008	Versión 2.1	Versión 5.1

TABLA 4. La tabla muestra los algoritmos de predicción presentes en la base de datos de Mirwalk y la versión disponible.

La búsqueda de genes blancos predictivos se realizó utilizando el módulo de predicción conjunta de los 8 programas de predicción que concentra este sitio. Esta opción de búsqueda, realiza la predicción de genes blancos en el 3' UTR para el microARN de interés. De los 8 programas de predicción que presenta la base Mirwalk, solo 6 de ellos nos permiten trabajar con el hsa-mir-301b. Por lo tanto la búsqueda de genes blancos se restringió a esos 6 programas de predicción de genes blancos. De la lista de genes blancos del hsa-mir-301b que proyecta Mirwalk se seleccionaron aquellos que son predichos por los 6 programas de predicción mencionados (conjunto intersección). Esta lista de genes fue utilizada en adelante. En el siguiente paso, realizamos un estudio de correlación a nivel de ARNm de la lista de genes predictivos seleccionados, en muestras clínicas de la base de datos de ONCOMINE (Rhodes, D. R., J. Yu, et al. (2004)). ONCOMINE (<https://www.oncomine.org/>) es una plataforma interactiva que contiene datos de microarreglos de expresión génica de muestras de tejidos de pacientes con cáncer, provenientes de los estudios más grandes publicados hasta el momento (normalizados a fin de ser comparables), junto con datos histológicos y clínicos. Asimismo, ONCOMINE proporciona una interfase con herramientas para interrogar correlaciones entre la expresión de genes y datos clínicos específicos. Estas

herramientas nos permiten la comparación rápida de miles de genes en muestras de cánceres humanos provenientes de estudios independientes. Para comenzar el estudio, se creó un “concepto” en ONCOMINE (definido como un grupo de genes que representa un aspecto biológico específico), constituido por la lista de los genes blancos predictivos del hsa-mir-301b, representado por sus identificadores (ID). Una vez ingresado el concepto en ONCOMINE, se solicitó la búsqueda de asociaciones estadísticamente significativas entre este nuevo concepto y todos los conceptos presentes en la base de datos. Para la elaboración de esta búsqueda se establecieron los siguientes parámetros: búsqueda en bases datos de ARNm, valores estadísticos resultantes de “p” menores de 0.001 y relaciones de disparidad estadísticas resultantes (“odds ratio”) mayores de 2.0. El algoritmo realiza una búsqueda de correlación entre los genes del concepto ingresado y los perfiles de expresión de los genes presentes en los diferentes estudios que se encuentran en la base de datos de ONCOMINE. El resultado de esta búsqueda nos muestra los diferentes subgrupos de genes que presentan un cambio modular en la expresión (en dirección tanto de subexpresión como de sobreexpresión), así como, la correlación significativa entre los conceptos de estudio. Basados en el marco de la hipótesis de este trabajo, se realizó una selección de los estudios encontrados. De este modo, se filtró únicamente aquellos estudios que corresponden a cáncer de próstata y presentan un perfil de subexpresión. Una vez obtenidas las listas con los subgrupos de genes de interés, se realizó un nuevo paso de filtrado, seleccionando finalmente, solo aquellos genes que se encuentran significativamente subexpresados en al menos 4 de los 6 trabajos seleccionados. De esta manera, redujimos la lista de genes blancos predichos bioinformáticamente al inicio, manteniendo solo aquellos genes que se ven significativamente subexpresados a nivel de ARNm en al menos 4 estudios independientes de cáncer de próstata. Una vez obtenida esta lista, se realizó un siguiente paso de depuración de esta lista de genes candidatos a ser blancos fisiológicos del hsa-mir-301b en cáncer de próstata. Para esto, se interrogó la expresión individual de cada gen de la lista anterior, en todos los estudios de cáncer próstata disponibles en ONCOMINE, utilizando las siguientes restricciones: cambio de expresión = 1.5, p-valor = 0.001, ranking de genes = 10%. Como resultado de este estudio, excluimos a aquellos genes que en el conjunto de estudios encontrados,

mostraban en la mayoría de ellos un perfil de sobreexpresión, que es opuesto al esperado en caso de ser blanco del hsa-mir-301b. Este filtrado pretende excluir aquellos genes de la lista, que en el conjunto de los estudios en cáncer de próstata en los que se encontró estudiado, aparezca en mayor proporción sobreexpresándose que subexpresándose. Además, de interrogar la expresión de los genes blanco potenciales del hsa-mir-301b usando ONCOMINE, se analizaron los genes hasta ahora seleccionados, en los datos de expresión génica a nivel de ARNm producidos por el Cancer Genome Anatomy Project (CGAP) (<http://cgap.nci.nih.gov/>). El sitio Cancer Genome Anatomy Project es una base de datos diseñada para proveer información biológica y genómica de caracterización de tejidos. Esta base de datos posee perfiles de expresión de genes en tejidos normales, precancerosos y cancerosos. Se basa en el análisis de expresión de secuencias tags expresadas (EST), análisis en serie de expresión de genes (SAGE) y polimorfismos de un solo nucleótido (SNP). En particular, evaluamos la expresión relativa de los genes blancos del hsa-mir-301b resultantes del análisis en ONCOMINE, en tejido prostático normal y carcinoma de próstata, utilizando la interfase visual SAGE Anatomic Viewer, que interroga datos provenientes de perfiles de expresión de tipo SAGE.

Posteriormente, tomando en cuenta que los microARNs actúan reprimiendo sus blancos también a nivel traduccional, se interrogó la disminución de las proteínas codificadas por los genes blanco tentativos del hsa-mir-301b. Para esto, se utilizó el Human Protein Atlas (HPA) (<http://www.proteinatlas.org/>). El proyecto sueco denominado Human Protein Atlas generó datos sistemáticos de expresión proteica basada en inmunohistoquímica de un gran número de tejidos humanos, cánceres y líneas celulares, lo que nos permite una exploración sistemática del proteoma humano basados en estudios de proteómica con anticuerpos. En este sitio evaluamos el perfil de expresión proteico de los genes de la lista generada en ONCOMINE, comparando la condición próstata normal vs carcinoma de próstata.

Finalmente, pasamos al último paso del análisis, donde buscamos conciliar el significado funcional de cada gen con un posible aporte en la evolución y desarrollo del cáncer de próstata, consensuado a su vez con la hipótesis de trabajo. Para ello realizamos una búsqueda de información sobre cada gen en la base de datos de publicaciones científicas PUBMED.

En el esquema a continuación se muestra el diseño de la estrategia de búsqueda de genes blancos candidatos del hsa-mir-301b:

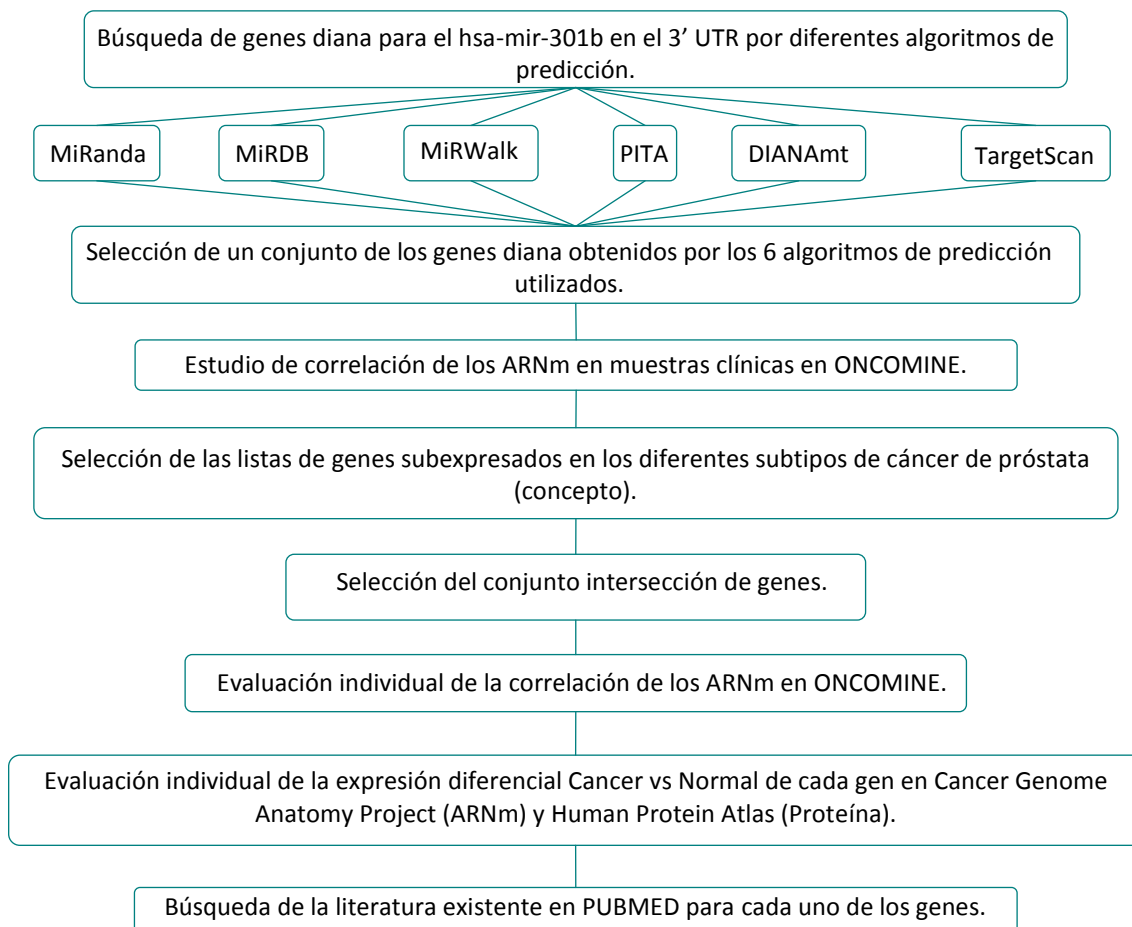


Figura 19. Esquema de la estrategia diseñada para el análisis de la actividad de los posibles genes blancos del hsa-mir-301b.

Análisis del hsa-mir-301b en el programa Diana Lab Mirpath.

El sitio web DIANA Lab (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/?sec=home>) (Papadopoulos, G. L., P. Alexiou, et al. (2009)) desarrolla algoritmos y herramientas para la interpretación y archivo de datos de genómica, en el marco de un análisis sistémico. En particular el DIANA-mirPath es una herramienta computacional para identificar las vías moleculares potencialmente alteradas, por la expresión de uno o múltiples microARNs. El software realiza un análisis de enriquecimiento de múltiples genes blancos de microARNs, mediante la comparación de cada conjunto de genes blancos del microARN, en todas

las vías de señalización celulares sistematizadas en la Enciclopedia de Kyoto de Genes y Genomas (KEGG) conocidas. La salida gráfica de este recurso proporciona una visión general de las posibles vías moduladas por el microARN, lo que facilita la interpretación y la presentación de los resultados del análisis. De esto modo, se interrogaron las vías moleculares que pueden verse potencialmente afectadas por la expresión del hsa-mir-301b en el programa DIANA mirPath, utilizando los 3 algoritmos de búsqueda de microARNs que se encuentran presentes (DIANA-microT-4.0 versión Beta, PicTar y TargetScan versión 5.0). El resultado de este análisis muestra la agrupación en diferentes vías o procesos biológicos, de los genes predichos por los 3 algoritmos de predicción utilizados.

Resultados y Discusión.

Selección de las líneas celulares transfectantes de DU145.

Las dos líneas celulares de DU145 (cada una con dos líneas transfectantes para la sobreexpresión de hsa-mir-301b y control) utilizadas, habían sido transducidas previo a este trabajo, pero el proceso de selección con la droga Neomicina no había sido finalizado. Dado que para estudiar el efecto de la sobreexpresión de un gen, es deseable que todas las células del cultivo porten el genotipo de sobreexpresión, fue necesario terminar el proceso de selección antes de llevar adelante los experimentos. Para esto se descongelaron crioviales de DU145 hsa-mir-301b y DU145 control, los cultivos derivados fueron crecidos hasta fase exponencial y se adicionó 5 uL del antibiótico Neomicina (100mg/mL) por cada mL de medio de cultivo durante 2 semanas. Esta selección elimina las células que no incorporaron el vector lentiviral, o que lo insertaron en sitios silenciados del genoma y que, por ende, no expresan el gen que confiere resistencia a la droga. De este modo, se hace posible el crecimiento exclusivo de aquellas células que expresan el vector lentiviral de forma estable. En el correr de los primeros días del tratamiento con Neomicina, observamos una pronunciada muerte celular, en una gran cantidad de células (resultados no mostrados). Sin embargo, en estos mismos cultivos encontramos otras células que permanecieron creciendo normalmente. Al cabo de dos semanas de un continuo proceso de selección, obtuvimos cultivos celulares de crecimiento uniforme, que crecieron normalmente en presencia de Neomicina. Se almacenaron varios crioviales de estas líneas celulares y estas fueron las empleadas en los experimentos correspondientes a este trabajo. Como control del efecto de la droga se trató en paralelo a las líneas DU145 normales (wild type) sin transfectar, estas en su totalidad, sufrieron muerte celular en los primeros días del proceso de selección con Neomicina (resultado no mostrado). Estos resultados confirman que la dosis de droga y el tiempo utilizado para la selección, son adecuados para la eliminación de las células que no expresan la resistencia al antibiótico y a la vez permite la supervivencia de aquellas que sí la expresan.

Cuantificación del nivel del hsa-mir-301b en las líneas transfectantes.

Además del fenotipo de resistencia a la droga conferida por el vector transducido, es fundamental determinar si las líneas celulares efectivamente sobreexpresan el microARN codificado por el vector, así como, en qué nivel lo sobreexpresan. Para este propósito se extrajo el ARN total de los cultivos para luego llevar a cabo una Transcripción Reversa seguida de un PCR cuantitativo (qRT-PCR), utilizando el sistema comercial miScript de Qiagen.

Extracción de ARN de las líneas transfectantes de DU145 y LNCaP.

Para cuantificar mediante qRT-PCR el nivel de expresión del hsa-mir-301b en las líneas celulares transfectantes (control y hsa-mir-301b) se obtuvo los ARNs total (incluyendo cuantitativamente los ARNs pequeños), con la calidad adecuada para realizar técnicas de biología molecular. Para esto se realizó la extracción de ARN utilizando el kit miRNAeasy de Qiagen. Para evaluar la calidad del ARN extraído se estudió la relación de absorbancia 260/280nm (Becker, C., A. Hammerle-Fickinger, et al. (2010)). En la TABLA 5, se presenta la concentración y los valores calculados para la relación de absorbancia 260/280nm, de las diferentes extracciones de ARN realizadas.

	<i>DU145</i>		<i>LNCaP</i>	
	<i>Control</i>	<i>Hsa-mir-301b</i>	<i>Control</i>	<i>Hsa-mir-301b</i>
Relación de absorbancia A260/A280nm	2.05	2.09	2.02	2.02
Concentración (ng/ μ L)	146	389	381	364

Tabla 5. Análisis espectrofotométrico del ARN extraído. En la misma se aprecian los valores de concentración (ng/mL) y de relación de absorbancia 260/280nm de las líneas celulares indicadas.

Observamos la relación de absorbancia 260/280nm, parámetro que nos permite determinar la pureza de la muestra en relación a contaminación proteica. El conjunto de muestras analizadas, presentan valores que se hallan dentro del rango 1.9 y 2.1 para esta relación, lo que indica que el ARN obtenido alcanza el estándar de pureza

requerido. Por otro lado, en todos los casos, las concentraciones de ARN finalmente obtenidas resultan suficientes para continuar con los ensayos posteriores y están dentro del rango de eficiencia usual en la literatura (Becker, C., A. Hammerle-Fickinger, et al. (2010)). Basándonos en los parámetros estudiados, podemos expresar que las extracciones de ARN realizadas fueron adecuadas para la cuantificación del hsa-mir-301b.

qRT-PCR.

Una vez obtenido ARN en cantidad y calidad necesaria realizamos la retrotranscripción, que generó el ADNcopia que fue usado en la PCR en tiempo real para cuantificar el nivel del hsa-mir-301b. Se cuantificaron los niveles de expresión del ARN del hsa-mir-301b en las dos líneas transfectantes de LNCaP y DU145. En la misma PCR, se determinó el nivel de tres ARNs de expresión generalmente estables (U6, Scarna 17 o Snord 13) (Schaefer, A., M. Jung, et al. (2010), Wessels, J. M., A. K. Edwards, et al. (2011)) que funcionan como normalizadores de los experimentos. La cuantificación de estos ARNs normalizadores, nos permitió igualar las variaciones aleatorias asociadas a la cantidad de ARN colocada en la reacción. También se hicieron reacciones de control negativo (sin ADN), las cuales no presentaron amplificación durante la misma (resultado no mostrado). Asimismo, los niveles de expresión de los ARN normalizadores, fueron muy similares entre las distintas líneas celulares estudiadas (resultado no mostrado). El cálculo de los niveles relativos de expresión del hsa-mir-301b, se realizó según recomendaciones establecidas en el trabajo (Ho-Pun-Cheung, A., D. Cellier, et al. (2008)). Las FIGURAS 20 y 21 muestran los niveles relativos del hsa-mir-301b en los transfectantes DU145 y LNCaP, normalizados con U6, Scarna 17 o Snord 13. Los valores presentados corresponden al promedio de los triplicados realizados con sus respectivos desvíos estándar.

A continuación, se presenta el gráfico de la FIGURA 20 en la cual podemos apreciar los resultados obtenidos en la cuantificación de la expresión del hsa-mir-301b para las líneas celulares transfectantes DU145.

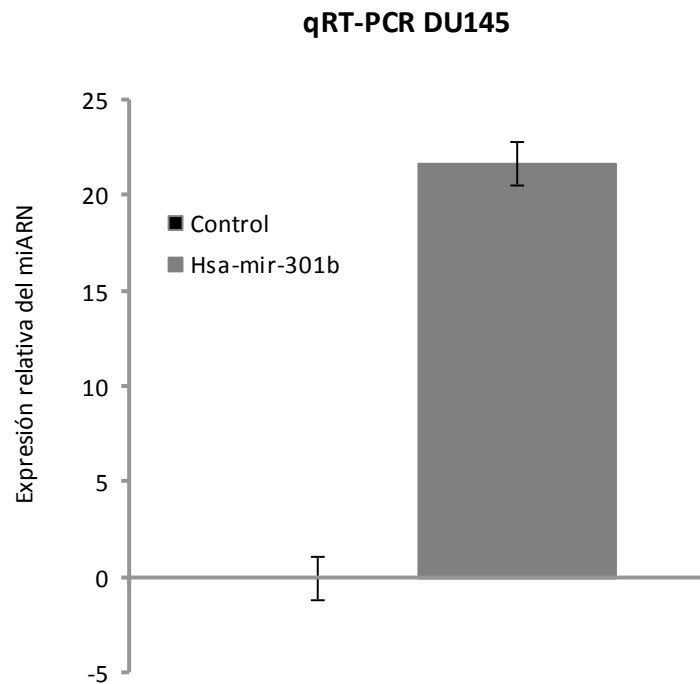


Figura 20. Cuantificación relativa por qRT-PCR de las líneas transfectantes DU145. Se observa la expresión relativa de la cuantificación del hsa-mir-301b para las líneas transfectantes hsa-mir-301b y control. Los valores muestran el promedio de los triplicados realizados con sus respectivos desvíos estándar.

Analizando el gráfico, observamos que conforme con lo esperado apreciamos un mayor nivel de expresión en el transfectante hsa-mir-301b con respecto al transfectante control. Específicamente, el nivel de expresión determinado en el transfectante hsa-mir-301b, es 20 veces mayor con respecto al control, lo que marca una diferencia substancial en la expresión del microARN entre ambos transfectantes.

Seguidamente, se presenta el gráfico de la FIGURA 21 en la cual podemos apreciar los resultados obtenidos en la cuantificación de la expresión del hsa-mir-301b para las líneas celulares transfectantes LNCaP.

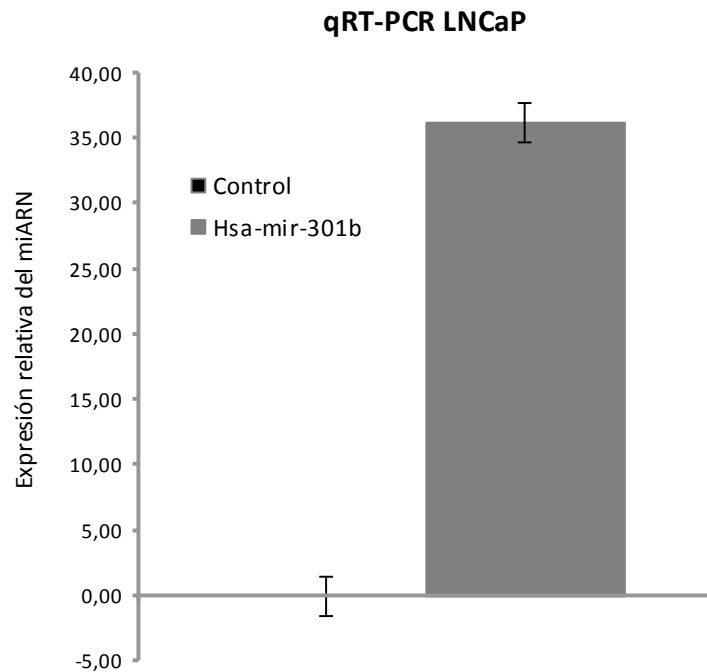


Figura 21. Cuantificación relativa por qRT-PCR de las líneas transfectantes LNCaP. Se observa la expresión relativa de la cuantificación del hsa-mir-301b para las líneas transfectantes hsa-mir-301b y control. Los valores muestran el promedio de los triplicados realizados con sus respectivos desvíos estandar.

A partir del análisis del gráfico, observamos que de igual manera que para las líneas transfectantes DU145 y conforme con lo esperado, apreciamos un mayor nivel de expresión del microARN en el transfectante hsa-mir-301b con respecto al transfectante control. La diferencia de expresión del microARN es 35 veces mayor en el transfectante hsa-mir-301b en relación con el transfectante control. Conjuntamente, podemos reportar que como era esperado los transfectantes hsa-mir-301b, de ambas líneas celulares de PCa (DU145 y LNCaP), presentan niveles de sobreexpresión del microARN substanciales y suficientes para considerar que se cumple con la condición de sobreexpresión del microARN requerida para este trabajo. Asimismo, podemos observar que si bien en ambos transfectantes se estableció correctamente la sobreexpresión del microARN, estos exhiben diferencias en la magnitud de expresión.

Teniendo en cuenta, que se utilizó la misma construcción lentiviral, una de las posibles explicaciones para este fenómeno es el posicionamiento genómico diferencial de un vector respecto al otro. Por lo que, entendiendo la naturaleza dinámica y compleja de la regulación del genoma eucariota, posiblemente, esta sea la causa de los matices de expresión observados (Ferrai, C., I. J. de Castro, et al. (2010)). No obstante, otra posible explicación a este fenómeno tenga que ver con las diferencias biológicas intrínsecas entre estas dos líneas celulares de PCa. Implicando variaciones en la funcionalidad de la maquinaria de expresión génica entre una línea celular y la otra, lo que repercute en una diferencia en la expresión de un vector respecto al otro, a pesar de que portan el mismo promotor.

Ensayo de *Mycoplasma*.

Muchas variantes del *Mycoplasma* afectan comúnmente a los cultivos celulares, produciendo alteraciones en la fisiología celular que conllevan a grandes artefactos en los resultados obtenidos en los experimentos (Uphoff, C. C. and H. G. Drexler (1999), Hwang, J. M., J. H. Lee, et al. (2012)). Por esta razón, es conveniente evaluar la presencia del microorganismo de forma rutinaria en la sala de cultivo. Durante este trabajo se realizaron periódicamente técnicas para la detección de *Mycoplasma* para todos los cultivos utilizados. A modo de ejemplo, en la FIGURA 22 se observa el resultado de una de las pruebas de *Mycoplasma* realizadas, utilizando el *kit* no comercial para las líneas celulares transfectantes de DU145 (control y hsa-mir-301b). La metodología y estrategia de detección utilizada en este *kit*, esta basada en la amplificación específica de una región espaciadora entre el ARN ribosomal 16S y 23S de *Mycoplasma* y *Acholeplasma* (Tang, J., M. Hu, et al. (1999)). El tamaño esperado del amplicón para una muestra contaminada con *Mycoplasma* es de 320pb. En la FIGURA 22 se muestra la imagen de una corrida electroforética en gel de agarosa teñido con BrEt, donde se analiza el producto de amplificación del cADN transcripto a partir del ARN extraído de los cultivos, utilizando los cebadores específicos del *kit*. El control positivo consiste de un cultivo de células DU145 control contaminado con *Mycoplasma*. El control negativo consta de agua tratada con UV en lugar de la muestra de cADN. Lo primero que observamos en la FIGURA 22 es la ausencia de banda en el carril 5 correspondiente al control negativo. Esto valida la ausencia de contaminación

intrínseca en los componentes del *kit*, así como producto de la manipulación. En segundo lugar, observamos la presencia de amplificación en el carril 6 correspondiente al control positivo. Esto confirma el correcto funcionamiento de la PCR, que en conjunto con lo evidenciado en el control negativo, valida el método realizado, permitiendo confiar en los resultados obtenidos para las muestras analizadas. A continuación, observamos ausencia de banda de amplificación y consecuentemente la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* para los carriles 1 y 2 (las líneas transfectante DU145 hsa-mir-301b 1 y DU145 control 1). No obstante, en los carriles 3 y 4 (las líneas transfectante DU145 hsa-mir-301b 2 y DU145 control 2) se vé una banda de amplificación en el entorno de los 320pb. Esto indica que las líneas transfectantes DU145 hsa-mir-301b 2 y DU145 control 2, se encuentran contaminadas con *Mycoplasma*. Como resultado de este ensayo reportamos el correcto funcionamiento del *kit* de detección, para estudiar contaminación por *Mycoplasma*. Asimismo, que las líneas transfectantes DU145 hsa-mir-301b 1 y DU145 control 1, están libres de contaminación por *Mycoplasma*. No obstante, las líneas transfectante DU145 hsa-mir-301b 2 y DU145 control 2, se encuentran contaminadas. Y fueron adecuadamente descontaminadas y descartadas, junto con los crioviales correspondientes a la misma.

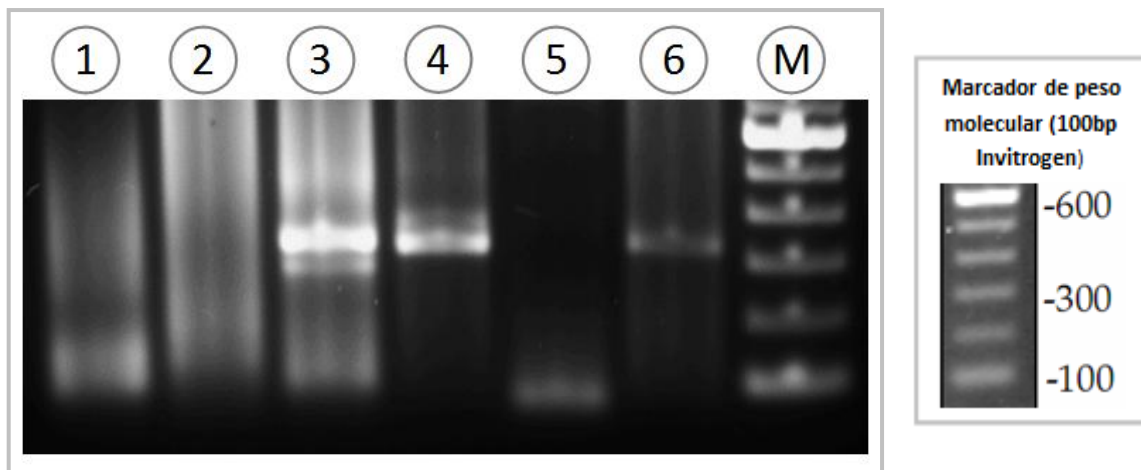


Figura 22. Gel de electroforesis agarosa de la PCR para la detección de *Mycoplasma* en las líneas celulares. **1**, DU145 control 1. **2**, DU145 hsa-mir-301b 1. **3**, DU145 control 2. **4**, DU145 hsa-mir-301b 2. **5**, control negativo. **6**, control positivo. **M**, marcador de peso molecular (100 bp de Invitrogen), a la derecha se puede apreciar la escala de tamaños de los fragmentos del marcador. La banda esperada que confirma la presencia de contaminación por micoplasma es de 320 pb.

Estudio de la proliferación celular.

Para estudiar el efecto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b en la proliferación celular, se utilizaron las líneas celulares transfectantes de PCa (LNCaP y DU145), anteriormente seleccionadas con Neomicina. También se comprobó la ausencia de contaminación por *Mycoplasma* mediante los ensayos de detección por PCR con cebadores específicos, y se evaluó la expresión del microARN de interés mediante los ensayos de qRT-PCR. Con el propósito de recolectar evidencia que nos permita estudiar los posibles efectos de la sobreexpresión del hsa-mir-301b en el crecimiento celular, se adoptaron tres abordajes distintos: estudio de proliferación por recuento de células, estudio de actividad metabólica por ensayos de MTT y análisis de la distribución de células en el ciclo celular. Los dos primeros ensayos transcurren en el curso del tiempo, mientras que el último es un ensayo a punto final.

Estudio de Proliferación por recuento de células en el tiempo.

El primero de los abordajes elegidos para el estudio de la proliferación celular, es el recuento de células viables (identificadas con azul de tripano) en cámara de Neubauer. Las distintas líneas celulares fueron cultivadas convencionalmente en placas de cultivo de 6 pocillos para células adherentes y mantenidas en condiciones normales de cultivo. Para cada ensayo se sembraron iguales concentraciones de células transfectantes en fase exponencial de crecimiento. Se siguió el comportamiento proliferativo de las líneas celulares transfectantes hsa-mir-301b y control, mediante sucesivos conteos del número de células viables, en los tiempos predeterminados. De esta manera, establecimos curvas de crecimiento para cada uno de los transfectantes, con los registros de recuento de células/mL obtenidos en cada uno de los tiempos establecidos en el ensayo. Los recuentos se realizaron por triplicado y el valor promedio fue graficado en cada punto con su desviación estándar correspondiente. Las curvas de crecimiento establecidas para cada transfectante de ambas líneas celulares de PCa en estudio, permitieron comparar el comportamiento proliferativo y establecer diferencias entre las mismas.

En el gráfico de la FIGURA 23, se observan los resultados del ensayo de recuento de células realizado para la línea celular DU145. En el mismo podemos observar las curvas de proliferación correspondiente para cada línea transfectante hsa-mir-301b y control.

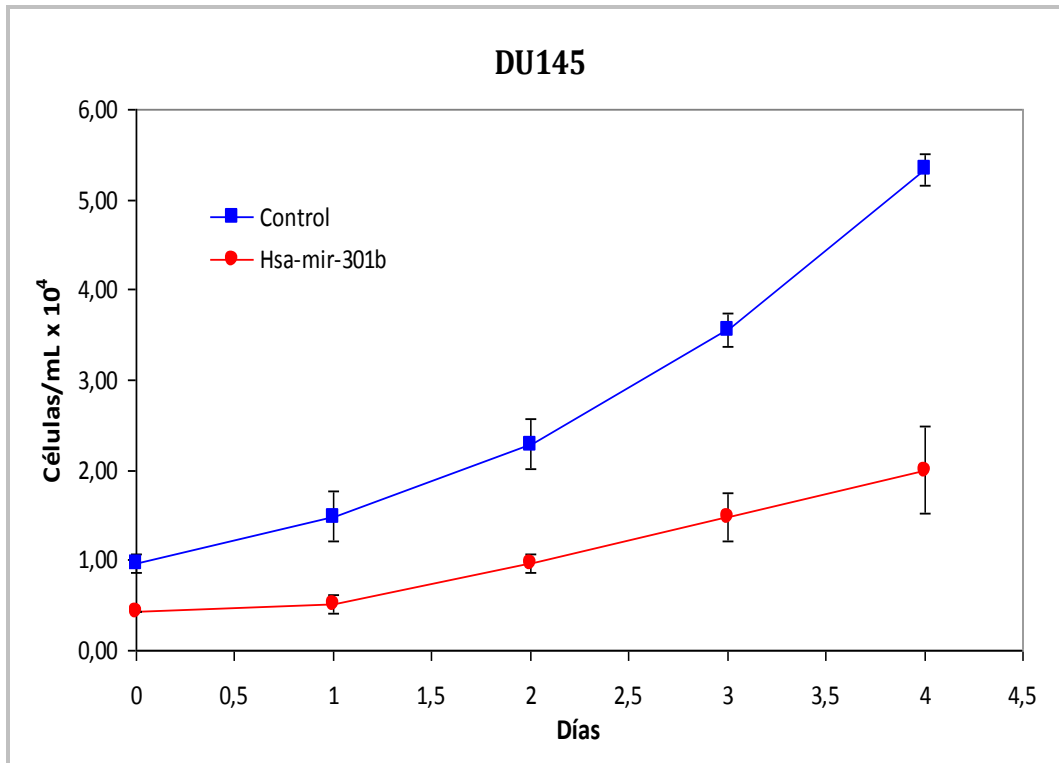


Figura 23. Análisis de proliferación celular para DU145. Curva de recuento de células viables, en los tiempos (días) indicados en la abscisa. En azul y rojo se representan los valores para la línea control y hsa-mir-301b respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio de tres recuentos y las barras de error el desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres.

En la FIGURA 23 podemos apreciar que la curva de proliferación correspondiente a la variante hsa-mir-301b, presenta una tasa de proliferación menor comparada con la variante control. Los valores obtenidos en este ensayo, fueron utilizados para estimar el tiempo de duplicación del cultivo, a partir del cálculo de la curva exponencial a la cual se ajustan mejor los datos. La pendiente de la relación exponencial hallada, permite establecer matemáticamente el tiempo de duplicación del cultivo. Con este dato podemos comparar numéricamente los tiempos de duplicación de ambos cultivos transfectantes.

	<i>DU145</i>	
	<i>Control</i>	<i>Hsa-mir-301b</i>
Tiempo de duplicación (horas)	38.8	41.4
Ecuación exponencial	células/mL = $0.4144 * e^{0.0168 * \text{tiempo}}$	células/mL = $0.9707 * e^{0.0178 * \text{tiempo}}$

Tabla 6. Estimación de tiempo de duplicación para DU145.

Para la línea celular DU145, el tiempo de duplicación de la variante transfectante control es 38.8 horas (TABLA 6). Mientras que para la variante transfectante hsa-mir-301b, el tiempo de duplicación establecido es 41.4 horas. Concordantemente, con lo observado gráficamente en la curva de recuento, observamos que el tiempo de duplicación de la variante control es levemente menor que el reportado para la variante hsa-mir-301b. Específicamente, exhiben una diferencia de 2.6 horas en el tiempo de duplicación

Un análisis igual al presentado hasta aquí para la línea celular DU145 fue llevado a cabo para LNCaP. En el gráfico de la FIGURA 24, se observa el primer ensayo de recuento de células realizado para la línea celular LNCaP. En el mismo podemos observar las curvas de proliferación correspondiente para cada línea transfectante hsa-mir-301b y control.

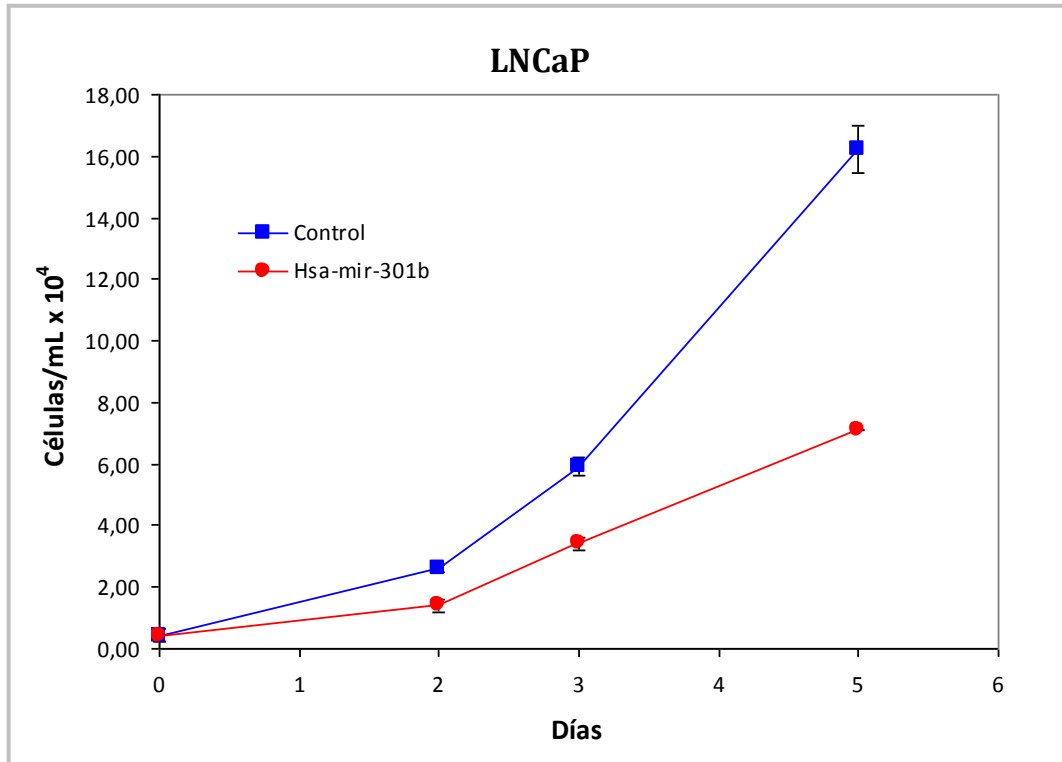


Figura 24. Análisis de proliferación celular para LNCaP. Curva de recuento de células viables, en los tiempos (días) indicados en la abscisa. En azul y rojo se representan los valores para la línea control y hsa-mir-301b respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio de tres recuentos y las barras de error el desvío estándar. Se muestra un experimento representativo de tres.

Al observar la FIGURA 24 podemos apreciar que nuevamente se manifiesta la misma tendencia reportada en el ensayo anterior, es decir, que la tasa proliferativa correspondiente a la variante hsa-mir-301b, es menor comparada con la de la variante control.

	<i>LNCaP</i>	
	<i>Control</i>	<i>Hsa-mir-301b</i>
Tiempo de duplicación (horas)	27.7	33.4
Ecuación exponencial	células/mL = 0.8339 * e ^{0.025*tiempo}	células/mL = 0.6166 * e ^{0.0208*tiempo}

Tabla 7. Estimación de tiempo de duplicación para LNCaP.

Precisamente, el tiempo de duplicación de la variante transfectante control es 27.7 horas (TABLA 7). Mientras tanto, el tiempo reportado para la variante transfectante hsa-mir-301b es 33.4 horas. Observamos que el tiempo de duplicación de la variante control es menor que el reportado para la variante hsa-mir-301b. Específicamente exhiben una diferencia de 5.7 horas en el tiempo de duplicación.

Resumidamente, si evaluamos en conjunto los ensayos de recuento de células mostrados observamos que en todos ellos la variante hsa-mir-301b exhibió una tasa de proliferación menor en relación a la variante control. Por lo tanto, la sobreexpresión del hsa-mir-301b en las líneas celulares de PCa DU145 y LNCaP, provocaría una disminución de la proliferación celular.

Ensayo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-yl)-bromato de 2,5-difeniltetrazolium (MTT).

El segundo abordaje elegido para estudiar el efecto en el crecimiento celular de la sobreexpresión del hsa-mir-301b, es el estudio de la actividad metabólica mediante ensayos de MTT en placas de cultivo. Estos ensayos nos permiten observar y estudiar el efecto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b en la proliferación celular, desde otro ángulo respecto al proliferativo. El ensayo de MTT evalúa la actividad metabólica, fundamentalmente la actividad mitocondrial [asociada a la actividad reductora de la enzima](#) succinato deshidrogenasa (Slater, T. F., B. Sawyer, et al. (1963)). Es posible sin embargo, establecer una correlación entre los ensayos de MTT y los ensayos de recuento de células, y por su simplicidad, precisión y capacidad de automatización es muy usado como aproximación indirecta a la proliferación celular. Si bien el ensayo de MTT no cuantifica directamente el número de células, un aumento del número de células, provocará un aumento de la actividad metabólica total medida. Consecuentemente, al evaluar la actividad metabólica total en el pocillo, evaluamos indirectamente la cantidad de células total en dicho pocillo. Se sembraron placas de cultivo con iguales concentraciones de células transfectantes en fase exponencial de crecimiento. Siguiendo el protocolo estipulado para el ensayo de MTT se realizaron

sucesivas mediciones de la actividad metabólica, por sextuplicados en los tiempos predeterminados. Los valores graficados corresponden a los promedios de los valores obtenidos para cada punto y las barras de error su desviación estándar correspondiente.

En el gráfico de la FIGURA 25, se observa la curva resultante del ensayo de MTT realizado para las células de la línea DU145.

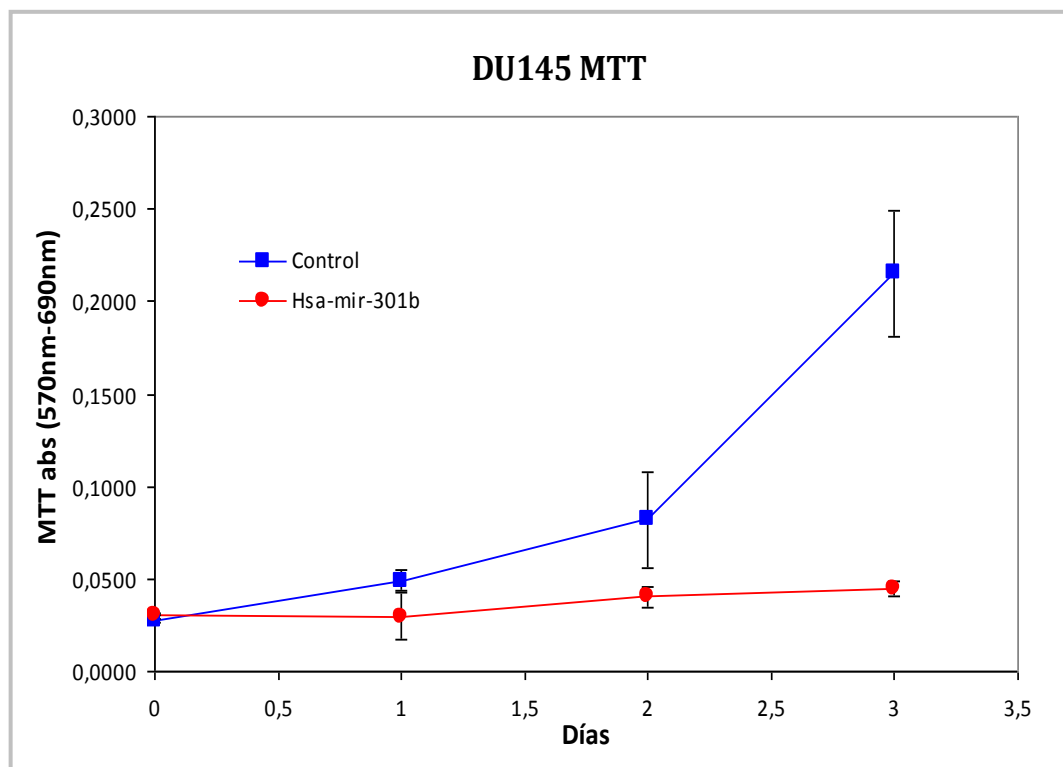


Figura 25. Análisis de actividad metabólica mediante ensayo de MTT para DU145. Curva de MTT donde para cada tiempo (días) establecido indicados en la abscisa, se muestra el valor registrado en la relación de absorbancia 570nm-690nm. En azul y rojo se representan los valores para la línea control y hsa-mir-301b respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio de 6 medidas de la relación de absorbancia 570nm-690nm y las barras de error el desvío estándar correspondiente.

Podemos observar que la línea transfectante control presenta una mayor tasa metabólica que la línea transfectante hsa-mir-301b. De igual manera, la variante que sobreexpresa el microARN en estudio, presenta una tasa metabólica menor en comparación con la variante control. Esto se encontraría relacionado con una disminución en la tasa proliferativa. Entendiéndose, que al presentar una menor tasa

de proliferación la variante hsa-mir-301b, presenta en cada medición un menor valor de actividad metabólica total comparada con la variante control. Un menor número de células en cada medición de la variante hsa-mir-301b comparada con la variante control, producto de una menor tasa de proliferación; se asociaría con una menor medida de actividad metabólica en cada medición de la variante hsa-mir-301b comparada con la variante control. Entonces, podemos establecer que este resultado concuerda con lo establecido en los ensayos de recuento de células anteriormente analizados. No obstante, si consideramos lo establecido en los estudios de recuento celular realizados anteriormente, aunque la variante hsa-mir-301b presentó una tasa de proliferación menor que la variante control, de igual modo, si presento un aumento en el número de células en las sucesivas medidas. Considerando lo expuesto anteriormente, podemos apreciar que la curva correspondiente a la variante DU145 hsa-mir-301b (FIGURA 25) no presenta un aumento considerable de la actividad metabólica en las sucesivas medidas realizadas durante el ensayo. Por lo que, esta observación manifestaría un posible efecto de la sobreexpresión del microARN sobre el metabolismo celular, adicionado al efecto ya establecido sobre la proliferación. Específicamente, una reducción de la tasa metabólica celular en la variante hsa-mir-301b, producto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b. Esta observación explicaría el porque no se aprecia un aumento de la actividad metabólica consistente con el comportamiento esperado para la variante hsa-mir-301b, considerando lo reportado en los ensayos de proliferación. No obstante, otra puede ser la explicación, puesto que es difícil determinar si el comportamiento observado no es producto de que nos encontramos fuera del rango lineal de medición del ensayo. Consecuentemente, no estaríamos cuantificando el aumento real de la actividad metabólica en ese caso y no estaría asociado a una disminución de la actividad metabólica producto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b. Este fenómeno podría ser estudiado mediante la construcción de una curva con número creciente de células que nos permita asegurarnos que nos encontramos efectivamente en el rango lineal de las medidas.

En el gráfico a continuación, se aprecia la curva resultante del ensayo de MTT realizado para las células de la línea LNCaP.

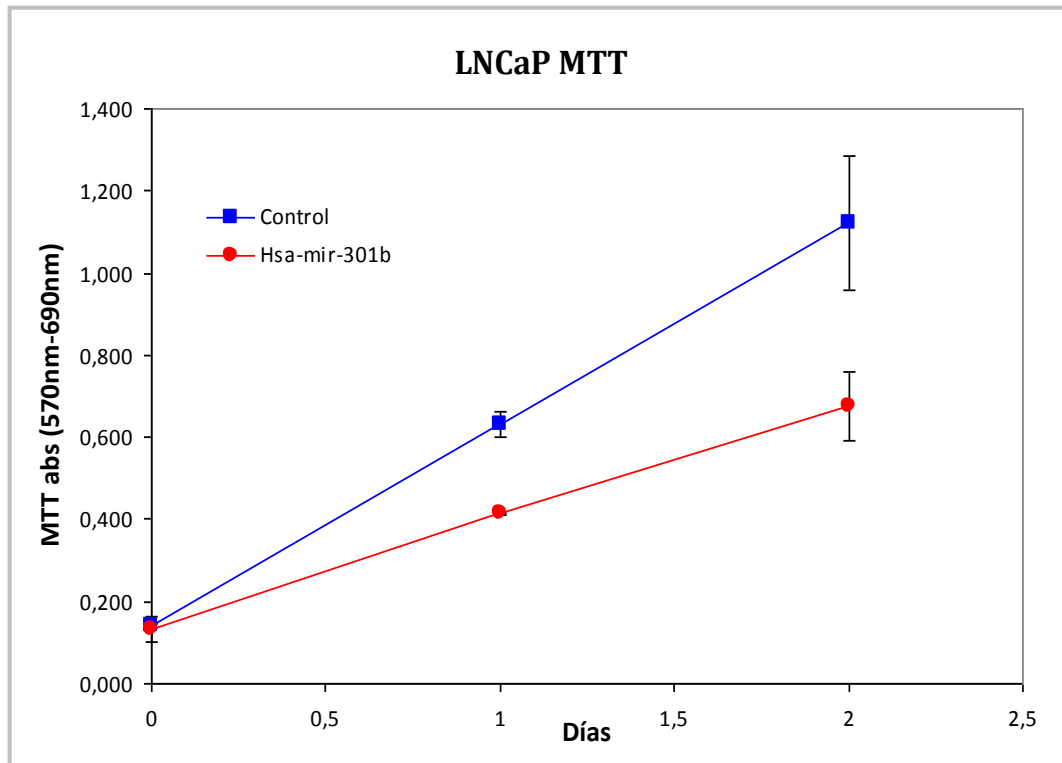


Figura 26. Análisis de actividad metabólica mediante ensayo de MTT para LNCaP. Curva de MTT donde para cada tiempo (días) establecido indicados en la abscisa, se muestra el valor registrado en la relación de absorbancia 570nm-690nm. En azul y rojo se representan los valores para la línea control y hsa-mir-301b respectivamente. Los valores mostrados representan el promedio de 6 medidas de la relación de absorbancia 570nm-690nm y las barras de error el desvío estándar correspondiente.

A continuación, analizamos el ensayo de MTT realizado para la línea LNCaP (FIGURA 26). En el mismo observamos que se reproduce el resultado reportado para la línea DU145. La variante que sobreexpresa el hsa-mir-301b, manifiesta una baja de la actividad metabólica en relación a la variante control. Estas observaciones respaldan los resultados reportados en los ensayos de recuento de células. No obstante, en contraposición con el ensayo de la línea DU145, en este ensayo si se aprecia un aumento en las sucesivas mediciones de la actividad metabólica para la variante que sobreexpresa el hsa-mir-301b.

En suma, si analizamos en conjunto los resultados obtenidos en los ensayos de recuento de células y ensayos de MTT, observamos una disminución en la tasa proliferativa acompañada de una posible disminución en la tasa metabólica, en la variante que sobreexpresa el hsa-mir-301b. Los resultados obtenidos, se reproducen

en las dos líneas celulares de PCa utilizadas (DU145 y LNCaP). Es interesante que se reproduzca de igual modo el comportamiento en las dos líneas celulares de PCa estudiadas (DU145 y LNCaP). Puesto que, si bien estas dos líneas celulares son líneas celulares de PCa, de todas maneras, presentan diferencias importantes en aspectos biológicos como su genoma (estatus de oncogenes, supresores de tumor, caretakers), la sensibilidad a andrógenos, el sitio metastático del que se aislaron (cerebro y nódulo linfático), la invasividad, etc. No obstante, observamos que el efecto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b, se manifiesta de igual modo en ambas líneas celulares, lo que sugiere que la sobreexpresión del hsa-mir-301b podría estar afectando funciones básicas, o poco especializadas de la célula prostática.

Por otro lado, las diferencias presentes entre estas dos líneas celulares (DU145 y LNCaP) también pueden explicar las diferencias en la magnitud del impacto de la acción del microARN en cada una de ellas. Estos resultados son muy interesantes en relación al marco teórico e hipótesis del trabajo de las células madre de cáncer, teniendo en cuenta que este microARN se identificó sobreexpresado en las prostatoesferas en comparación con la contraparte de células diferenciadas. Asimismo, la sobreexpresión del hsa-mir-301b correlaciona con las CSCs de LNCaP aisladas mediante la utilización de marcadores de superficie como CD44 y CD24. Se ha mostrado que las mismas tienen una tasa de proliferación menor que las células depletadas de CSCs, y el mismo fenómeno se observó en las prostatoesferas, cuando se las comparó con las células diferenciadas por FBS (Hurt, E. M., B. T. Kawasaki, et al. (2008), Duhagon, M. A., E. M. Hurt, et al. (2010)). En este contexto, el microARN cooperaría en el mantenimiento del estado indiferenciado (las prostatoesferas) y por lo tanto, en el mantenimiento de las características de tipo célula madre. De esta manera, la disminución de la tasa proliferativa y metabólica consecuencia de la sobreexpresión de este microARN, podría contribuir con el estado de quiescencia celular asociado a las células de tipo madre (Moore, N. and S. Lyle, (2011)).

Análisis del ciclo celular por citometría de flujo.

El tercer abordaje realizado con el propósito de estudiar el efecto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b en la proliferación, fue el estudio de la distribución de las células en los estadios del ciclo celular. Este análisis nos permite estudiar a qué nivel del ciclo celular el hsa-mir-301b afecta la proliferación celular. Esto nos dará un indicio de los mecanismos moleculares en que podría estar participando el microARN, y por ende, nos permitirá disminuir la lista de genes blanco candidatos, seleccionando aquellos que puedan intervenir en el progreso de esta etapa. Asimismo, hace posible indagar en una posible explicación para lo observado mediante los análisis anteriormente realizados. Realizamos el cultivo de las líneas celulares transfectantes (control y hsa-mir-301b) por triplicado, se desprendieron por tripsinación se fijaron y tiñeron las células con IP para el análisis por citometría de flujo como se describió en la metodología. El equipo fue calibrado para verificar la linealidad y resolución del instrumento (datos no mostrados). Luego se seleccionaron las células fijadas en base a la dispersión de la luz con la finalidad de eliminar detritos celulares y complejos multicelulares del análisis (datos no mostrados). Finalmente, se clasificaron las células en las distintas etapas del ciclo celular (G1, S y G2/M), evaluando la fluorescencia de cada célula en el espectro de emisión del IP, lo que constituye una medida de la cantidad de ADN celular.

En la FIGURA 27, se aprecia el promedio de la distribución de las células o eventos en las diferentes etapas del ciclo celular obtenida mediante el análisis por citometría de flujo, realizado para las líneas transfectantes de DU145.

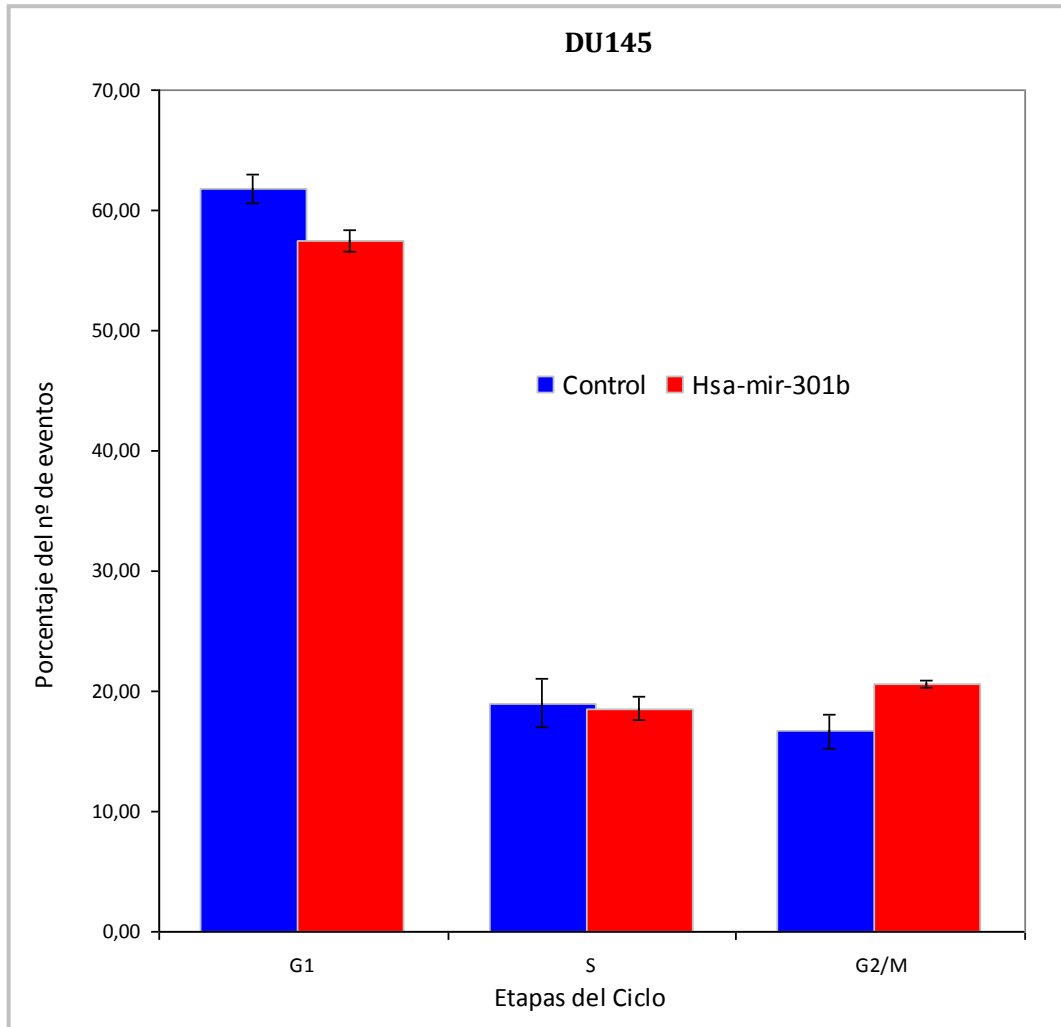


Figura 27. Distribución de células en las fases del ciclo celular para DU145. Se grafica la distribución de células en las distintas etapas del ciclo celular (G1, S, G2/M), para las dos líneas celulares control (azul) y hsa-mir-301b (rojo). Se analizaron 10.000 (eventos por población). El análisis se realizó por triplicado y los valores promediados presentan el desvío estándar correspondiente mostrado con barras de error.

La FIGURA 27 muestra las diferencias de los valores obtenidos para las distintas etapas del ciclo (G1, S, G2/M), para facilitar la interpretación de la distribución obtenida.

Etapas del Ciclo Celular	Variación global (%)	Variación específica (%)
<i>G1</i>	4.29	6.94
<i>S</i>	0.44	2.32
<i>G2/M</i>	-3.91	-23.44

Tabla 8. Distribución de células en las fases del ciclo celular para DU145.

Analizando los resultados obtenidos del ensayo de citometría de flujo, evaluamos las diferencias existentes en el ciclo celular entre ambas líneas transfectantes (hsa-mir-301b y control) (TABLA 8), evidenciando ligeras diferencias entre ellas. Por lo tanto, la sobreexpresión del hsa-mir-301b afecta a la distribución de las células en el ciclo celular. En la etapa correspondiente a G1, encontramos una disminución en la proporción de células de la variante hsa-mir-301b en comparación con la variante control. Específicamente, esta diferencia es de 4.29% del nº total de eventos analizados (variación global), correspondiendo con una disminución en G1 de un 7% aproximadamente (variación específica). Conjuntamente, observamos que en la etapa correspondiente a G2/M, ocurre lo opuesto a lo reportado en la etapa G1. En esta etapa, encontramos un aumento en la proporción de células de la variante hsa-mir-301b en comparación con la variante control. Específicamente, esta diferencia es de 3.91% del nº total de eventos, correspondiéndose con un aumento en G2/M equivalente a un 23% aproximadamente. No obstante, en la etapa correspondiente a la fase S del ciclo, no se registraron diferencias substanciales entre ambas líneas celulares. En conjunto, los resultados de citometría de flujo y los experimentos reportados previamente, indican que la disminución de la tasa proliferativa de la variante hsa-mir-301b que sobreexpresa dicho microARN, se debe con un retraso del ciclo celular, asociado a la etapa G2/M del ciclo celular.

En suma, como resultado del análisis conjunto de los ensayos realizados, en el abordaje de los tres estudios seleccionados para estudiar el efecto en la proliferación

de la sobreexpresión del hsa-mir-301b, podemos extraer algunas conclusiones. En primer lugar, las tres estrategias seleccionadas para realizar el estudio permitieron desarrollar positivamente el objetivo planteado. En segundo lugar, la evidencia extraída de los ensayos realizados muestra que la sobreexpresión del hsa-mir-301b, provoca una disminución de la tasa proliferativa, acompañada aparentemente de una disminución de la tasa metabólica. Asimismo, podemos plantear que la disminución de la tasa proliferativa se encontraría asociada a un retraso o aplazamiento de las células en la etapa G2/M del ciclo celular.

Por último, la evidencia extraída de los ensayos realizados, en relación con los antecedentes y el marco teórico del trabajo, nos permiten plantear y concensuar el efecto observado para la sobreexpresión del hsa-mir-301b con la biología de las células madre de cáncer. Sabiendo que este microARN se subexpresa durante la diferenciación a las 24h, inducida por suero en las prostatoesferas. Sumado a que la sobreexpresión del hsa-mir-301b correlaciona con las CSCs de LNCaP aisladas mediante la utilización de marcadores de superficie como CD44 y CD24. Se establece que la sobreexpresión del microARN, aportaría al mantenimiento del fenotipo de las células madre de cáncer, manteniendo un estado indiferenciado de las mismas. Teniendo en cuenta, los resultados obtenidos del estudio del efecto en la proliferación del hsa-mir-301b, podemos establecer que la sobreexpresión del mismo, posiblemente se encuentre colaborando en el mantenimiento del estado de quiescencia celular presente en esta estirpe celular (Moore, N. and S. Lyle, (2011)). Asimismo, un trabajo reciente, que estudió subpoblaciones de células CD44^{alto} que muestran un perfil fenotípico de tipo célula madre, aisladas a partir células frescas de carcinoma de próstata humano (entre otros) reporta que estas células muestran una mayor resistencia a la apoptosis asociada a un aplazamiento de la fase G2 del ciclo celular (Harper, L. J., D. E. Costea, et al. (2010)). Estos resultados apoyan nuestra hipótesis de que la quiescencia de las células madre se deba a un incremento del arresto en G2/M. Sería interesante realizar los ensayos de inducción de la apoptosis correspondientes con estas líneas celulares transfectantes, para efectivamente establecer una relación certera. Por otro lado, estos resultado anticipan la posibilidad de que la sobreexpresión de hsa-mir-301b, al disminuir la proliferación celular, incrementen la

resistencia de las células de carcinoma prostática a las drogas citostáticas que se administran en la terapéutica farmacológica de la enfermedad en su fase metastática.

Análisis de la actividad de los posibles genes blancos del hsa-mir-301b.

Con el fin de indagar y estudiar los posibles genes blancos del hsa-mir-301b, se diseñó y realizó una estrategia utilizando los recursos informáticos disponibles. La práctica habitual para la búsqueda de genes con sitios blanco para un microARN, consiste en el uso simultáneo de varios algoritmos, seguido por el establecimiento de un grupo intersección de los resultados obtenidos por los diferentes buscadores (Witkos, T. M., E. Koscianska, et al. (2011)). El establecimiento de una lista intersección con los genes resultantes de los algoritmos de búsqueda, adiciona robustez a la predicción dado que el conjunto seleccionado de genes, es aquel que posee y cumple con todas las características de búsqueda evaluadas por los distintos programas predictores. De este modo, seleccionamos aquellos genes blancos que son compartidos en la predicción de los distintos programas de búsqueda utilizados. La búsqueda de genes blancos predictivos se realizó utilizando los distintos algoritmos de la página web denominada Mirwalk (<http://www.ma.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>), tal como se explica en la metodología. Como resultado de la primera etapa de la estrategia, se obtuvo una lista de 308 genes (ANEXO 1). Esta lista corresponde a aquellos genes, que son predichos como blancos del hsa-mir-301b en el 3' UTR, por los 6 algoritmos de predicción utilizados (conjunto intersección). En la siguiente etapa de la estrategia, estudiamos la posible correlación entre los niveles de ARNm de estos 308 genes y el estatus o evolución de la neoplasia en un gran grupo de muestras clínicas disponibles en la base de datos de Oncomine, tal como se explica en la metodología. Con este análisis, buscamos establecer cual de estos genes blancos predictivos del hsa-mir-301b, presentan efectivamente un perfil de subexpresión modular en tumores prostáticos, y que por tanto puedan tener una relevancia fisiológica en el desarrollo o establecimiento del cáncer de próstata. De este modo, descartamos de la lista aquellos genes cuya expresión a nivel de ARNm no se ve modificada en el PCa, y por ende son candidatos menos probables de regulación por hsa-mir-301b en tejido prostático. El

resultado de la búsqueda en ONCOMINE, muestra los diferentes subgrupos de genes que presentan un cambio modular en la expresión (en dirección tanto de subexpresión como de sobreexpresión), así como, la correlación significativa entre los conceptos de estudio. ONCOMINE proyecta una interfaz gráfica donde numera los subgrupos de genes que encontró correlacionados con las distintas categorías o conceptos que presenta la base de datos para cada tipo de cáncer. La misma exhibe las siguientes categorías o conceptos: Carcinoma vs Normal, Cáncer vs Cáncer, Metástasis vs Primario, Recurrencia vs No Recurrencia, Subtipo Molecular basado en Biomarcadores, Subtipo Molecular basado en Mutaciones, Subtipo Patológico basado en el Grado, Subtipo Patológico basado en el Estadio. Como resultado de esta etapa se encontraron correlaciones estadísticamente significativas (p -valor < 0.001 , odds ratio > 2) entre los genes blanco predictivos y prácticamente todos los tipos de neoplasia disponibles en ONCOMINE (TABLA 9). Esto podría sugerir que hsa-mir-301b es un microARN que afecta la biología del cáncer de modo no específico de tejido. De lo contrario, el set de genes que interrogamos podría ser aún muy amplio para obtener un resultado biológicamente significativo en el contexto de todas las clases de tumores. Es importante destacar que en todos los casos se observa correlación tanto con la subexpresión (indicados por números azules en la TABLA 9) como con la sobreexpresión (indicado por números rojos en la TABLA 9) de los genes blancos. Esto podría sugerir que el modo de acción de los blancos del hsa-mir-301b dependa del subtipo o etiología del tumor, o qué aún estamos trabajando con un set demasiado grande de genes. En el caso específico del Cáncer de Próstata (recuadro rojo de la TABLA 9), se encuentran diez estudios de expresión génica global que correlacionan con la lista de genes blancos predictivos. Dos de ellos correspondieron con perfiles de sobreexpresión y los ocho restantes con perfiles de subexpresión.

Concept Type by Cancer	Cancer vs. Normal	Cancer vs. Cancer		Cancer Subtype Analysis																			
		Cancer Histology	Multi-cancer	Clinical Outcome	Metastasis v.s. Primary	Molecular Subtype: Biomarker	Molecular Subtype: Mutation	Pathology Subtype: Grade	Pathology Subtype: Stage	Patient Treatment Response	Recurrence v.s. Primary	Other											
Bladder Cancer	1			1																			
Brain and CNS Cancer	5	5	5	3		3				6		1	1	2	3		1	1					
Breast Cancer	2	4	4	1	1	9		1	6	2		3	2	1									
Cervical Cancer	1	1	2	1								1		1									
Colorectal Cancer		2		2		6					1	1		11	3		1	2					
Esophageal Cancer																							
Gastric Cancer	1	1										1		1				1					
Head and Neck Cancer		1	1	2							1		1	1	4								
Kidney Cancer	1	1		1		2						1					2						
Leukemia	1	1	1		1	1					4	3					3						
Liver Cancer		1	1																				
Lung Cancer	3	3	2	2		2					3		1		2								
Lymphoma	2	1	1		2	3	9				3	2			1								
Melanoma	1					1	4	1			1	2			1								
Myeloma											2	1											
Other Cancer			2										1	1									
Ovarian Cancer	3	3	2	1		3	1			1	1	3	1	3	3		1						
Pancreatic Cancer	2			1	1					1													
Prostate Cancer	1					4	2						2		1								
Sarcoma	2	5	4	2									1				3						
Significant Unique Concepts	6	19	28	24	12	7	16	34	1	3	7	3	15	19	5	11	19	15	2	6	1	1	5

Red: Over-expression Blue: Under-expression

Tabla 9. Correlación entre los 308 genes blancos teóricos de hsa-mir-301b y estatus o evolución de neoplasias en estudios de expresión génica en muestras clínicas. Se observa la interfaz gráfica mostrada en el programa OncoPrint, que presenta los estudios correlacionados con la lista de genes blancos predictivos del hsa-mir-301b. Los parámetros de búsqueda de correlación fueron, p-valor < 0.001, odds ratio > 2 y niveles de ARNmensajeros. En el rectángulo rojo se enmarcan los estudios presentados para cáncer de próstata. Los números indican el número de estudios en los que se detecta una correlación significativa entre la lista de genes y la modulación en las muestras registradas. Los colores rojo y azul indican la sobreexpresión y la subexpresión de los genes interrogados respectivamente.

Dado que nuestro objetivo al interrogar las bases de datos de expresión génica global fue reducir la lista de genes blancos teóricos a aquellos que se vean efectivamente subexpresados en PCa, se seleccionaron únicamente aquellos estudios de PCa que presentan un perfil de subexpresión. De los ocho estudios de subexpresión, finalmente seleccionamos seis (TABLA 10), descartando dos estudios que resultaban redundantes por tratarse de la misma muestra y el mismo concepto de estudio (recurrencia del

cáncer) evaluado en tres condiciones, la recurrencia del cáncer al año, a los tres años y a los cinco años. Esto implicaba una gran carga de genes compartidos en los tres estudios, que posiblemente sesgara nuestro estudio. Por lo tanto, se resolvió descartar dos (recurrencia a los tres y cinco años) dejando solo el estudio correspondiente al año de recurrencia. Los estudios seleccionados representan una diversidad de conceptos relacionados con el desarrollo y la biología del cáncer (estatus, recurrencia, metástasis, estadio). Esto podría estar indicando que la acción del microARN en estudio, englobaría una diversidad de procesos interesantes en el desarrollo del cáncer.

Estudio de PCa	Concepto comparado	Nº de muestras	Nº total de genes estudiados	Nº de genes correlacionados	Odds ratio	P-valor
<i>Arredouani</i>	Estatus: Normal vs. Carcinoma	Normal (8) Carcinoma (13)	1957	54	2.1	4.17E-6
<i>Taylor</i>	Evolución clínica: Recurrencia a un año vs. No Recurrencia	No Recurrencia (115) Recurrencia (9)	2223	72	3.0	2.91E-13
<i>Nanni</i>	Evolución clínica: Recurrencia a un año vs. No Recurrencia	No Recurrencia (17) Recurrencia (5)	631	26	2.7	1.91E-5
<i>Taylor</i>	Sitio: Tumor Primario vs. Metástasis	Sitio Primario (131) Metástasis (19)	2223	53	2.0	1.36E-5
<i>Varambally</i>	Sitio: Tumor Primario vs. Metástasis	Sitio Primario (7) Metástasis (6)	978	28	2.1	6.13E-4
<i>Bittner</i>	Estadio: Adenocarcinoma vs. Estadio Avanzado (IV)	Estadio II (26) Estadio III (13) Estadio IV (4)	978	29	2.2	2.76E-4

Tabla 10. Estudios de expresión génica global de PCa que correlacionan con la subexpresión de los genes blanco predictivos de hsa-mir-301b.

Otro aspecto interesante, concierne a los valores de significación (p-valor) de correlación que muestran los estudios. En todos los casos, estos valores se encuentran muy por debajo de un valor de $p = 0.001$. Con la finalidad de reducir la lista de genes blanco predictivos inicial en base a estos hallazgos, seleccionamos aquellos genes que se encuentran compartidos por lo menos en cuatro de los seis estudios seleccionados. Esto resultó en una lista de 17 genes que se muestra en la TABLA 11.

P	1	2	3	4	5	6	Gene
■	■	■	■	■	■	■	PHACTR2
■	■	■	■	■	■	■	CAV2
■	■	■	■	■	■	■	ITPR1
■	■	■	■	■	■	■	SLMAP
■	■	■	■	■	■	■	CHD9
■	■	■	■	■	■	■	PPARGC1A
■	■	■	■	■	■	■	RSU1
■	■	■	■	■	■	■	VPS37A
■	■	■	■	■	■	■	C3orf64
■	■	■	■	■	■	■	PTGER2
■	■	■	■	■	■	■	QKI
■	■	■	■	■	■	■	ERBB2IP
■	■	■	■	■	■	■	KRT23
■	■	■	■	■	■	■	GJA1
■	■	■	■	■	■	■	CFL2
■	■	■	■	■	■	■	PARVA
■	■	■	■	■	■	■	SLC8A1

Estudios seleccionados:

1. Carcinoma de Próstata - Recurrencia a 1 año - (Taylor).
2. Carcinoma de Próstata vs. Normal - (Arredouani).
3. Cáncer de Próstata - Metástasis - (Taylor).
4. Carcinoma de Próstata - Recurrencia a 1 año - (Nanni).
5. Adenocarcinoma de Próstata - Estadío Avanzado - (Bittner).
6. Cáncer de Próstata - Metástasis - (Varambally).

Tabla 11. Lista de genes sub-expresados en por lo menos cuatro de los seis estudios, que correlacionan significativamente con los 308 blancos teóricos de hsa-mir-301b. Los cuadros coloreados o vacíos indican respectivamente la presencia o ausencia de la sub-expresión del gen en los estudios indicados del 1 al 6. Los cuadros coloreados en la columna P simbolizan que el gen fue registrado en los 6 estudios seleccionados.

Este paso de filtrado reduce mucho la lista de genes blancos candidatos, dado que acotamos la lista a aquellos genes que presentan correlación por lo menos con cuatro trabajos de PCa y que participan en la mayor cantidad de conceptos interesantes para la clínica del cáncer de próstata. Seguidamente, para cada gen presente en la nueva lista, realizamos un análisis individual de asociación en el programa ONCOMINE. En el mismo, estudiamos la correlación de expresión a nivel de datos de ARNm de cada gen individual de la lista de 17 genes, interrogamos nuevamente todos los estudios clínicos de cáncer de próstata existentes en la base de datos. En este paso, descartamos aquellos genes que no presentan un perfil de subexpresión general, en el total de los estudios de expresión de cáncer de próstata (resultados no mostrados). Entendiéndose, por perfil general de subexpresión, cuando un gen presenta un perfil de subexpresión en por lo menos la mitad mas uno del total de los estudios con los que mostró correlación. Los genes descartados en este paso fueron: C3orf64, CHD9, VPS37A y ERBB2IP. Al descartar aquellos genes que no presentan un perfil general de

subexpresión, adicionamos mayor significado biológico a la lista de genes seleccionados, teniendo en cuenta la hipótesis y el marco teórico de este trabajo. De esta forma, los genes hasta ahora seleccionados, franquearon dos filtros. El primero de ellos, el análisis primario realizado con el concepto inicial de los 308 genes blancos predictivos ingresados en ONCOMINE. Los genes derivados de este estudio, presentan un perfil de subexpresión modular y significativo en estudios relacionados al establecimiento, evolución y desarrollo del cáncer de próstata. Como producto del segundo filtro, los genes seleccionados presentan adicionalmente un perfil general de subexpresión en el conjunto de estudios clínicos de cáncer de próstata presentes en ONCOMINE.

Posteriormente, pasamos a estudiar la expresión de la lista de genes establecida, en otras bases de datos de expresión, con el objetivo, de investigar más las tendencias de expresión establecidas en ONCOMINE. Se consultaron datos de expresión génica obtenidos mediante la aplicación de otras técnicas y metodologías moleculares de cuantificación. Las bases de datos elegidas fueron, la del Cancer Genome Anatomy Project (<http://cgap.nci.nih.gov/>) y la del Human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>). Específicamente, comparamos la expresión de cada uno de los 13 genes seleccionados en el paso anterior, en las condiciones cáncer de próstata y próstata normal. En la base de expresión Cancer Genome Anatomy Project (CGAP), consultamos datos de secuenciación, particularmente, cuantificación mediante la técnica SAGE (análisis en serie de la expresión génica). A partir de los resultados extraídos del estudio realizado en CGAP, podemos observar que para la gran mayoría de los genes evaluados (10 de 13), se confirma la correlación de expresión establecida en el análisis en ONCOMINE (FIGURA 28). Solamente el gen RSU1, contrariamente a lo visto en ONCOMINE, presentó un mayor nivel de expresión en cáncer de próstata en relación a próstata normal. Los genes PPARGC1A y QKI aparecen al mismo nivel de expresión en ambas condiciones (FIGURA 28).

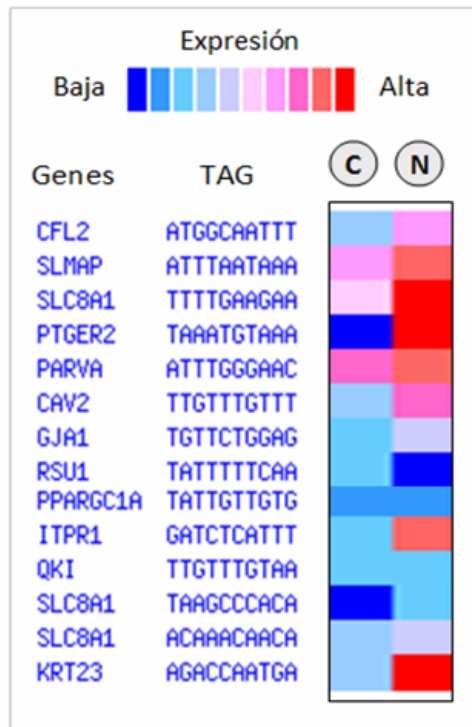


Figura 28. Mapa de calor comparando la expresión de los genes indicados en tejido prostático normal (N) y cáncer (C). Generado por el CGAP.

La confirmación de los resultados obtenidos en ONCOMINE, es importante si se considera que se consultan datos de expresión de bases de datos y estudios independientes, obtenidos mediante la utilización de otras tecnologías de cuantificación.

En la base de datos de expresión Human Protein Atlas, evaluamos también la expresión de los 17 genes seleccionados a nivel de proteína, usando particularmente datos de inmunoensayos. Para algunos genes no fue posible realizar el análisis en la base Human Protein Atlas puesto que no existían datos de expresión reportados para dicho gen o los datos disponibles no permitieron realizar un análisis concluyente de la expresión diferencial de la condición en estudio. Dentro de estas dos categorías mencionadas, se encuentran los siguientes genes: CAV2, PPARGC1A, RSU1, PTGER2, QKI. De todas maneras, algunos genes pudieron ser evaluados y de hecho confirmarse la tendencia reportada en los estudios de ONCOMINE y CGAP. Los genes GJA1, KRT23, ITPR1 y SLC8A1 cumplieron con todas las etapas de filtrado propuestas en este análisis, siendo los candidatos que muestran mayor consistencia en la evaluación realizada. Mientras que los genes que muestran una relación inversa a la observada en ONCOMINE son: SLMAP, VPS37A, CFL2 y PARVA. Reforzar la tendencia de expresión

establecida a nivel de ARNm, con datos de expresión a nivel proteico, adiciona consistencia a la tendencia de expresión establecida. Puesto que a causa de la existencia de la regulación de la expresión génica a nivel traduccional y post-traduccional, muchas veces la tendencia establecida a nivel de ARNm no se corresponde con la tendencia final a nivel proteico, de modo que es importante confirmar que el gen blanco putativo se ve efectivamente subexpresado a nivel proteico, según el efecto esperado por la modulación vía microARNs.

A continuación, se muestra la TABLA 12 que muestra para cada uno de los genes los resultados establecidos en cada análisis. Además, se señalan los genes que, como resultado del estudio presentan el mayor interés como posibles genes candidatos blancos del hsa-mir-301b en cáncer de próstata.

Genes	Asociación individual de cada gen en Oncomine	Estudio en base de datos C.G.A.P.	Estudio en base de datos H.P.A.
<i>GJA1</i>	+	+	+
<i>KRT23</i>	+	+	+
<i>ITPR1</i>	+	+	+
<i>SLC8A1</i>	+	+	+
<i>QKI</i>	+	+/-	nd
<i>PTGER2</i>	+	+	nd
<i>CAV2</i>	+	+/-	nd
<i>PPARGC1A</i>	+	+	nd
<i>PHACTR2</i>	+	nd	+
<i>SLMAP</i>	+	+	-
<i>CFL2</i>	+	+	-
<i>PARVA</i>	+	+	-
<i>RSU1</i>	+	-	nd
<i>ERBB2IP</i>	-	nd	nd
<i>VPS37A</i>	-	nd	nd
<i>CHD9</i>	-	nd	nd
<i>C3orf64</i>	-	nd	nd

Tabla 12. Los genes marcados con amarillo y verde, son aquellos genes que pasaron o no pasaron satisfactoriamente los filtros establecidos respectivamente.

En esta sección se analiza la bibliografía en búsqueda asociaciones entre los genes blanco de hsa-mir-301b seleccionados bioinformáticamente y el cáncer de próstata. En particular, se investiga si es identificado como un gen supresor de tumor, puesto que esto constituye un resquicio necesario para nuestra hipótesis de trabajo. Esta aproximación constituye un modo de obtener evidencia adicional, de índole empírico, a favor o en contra de su posible rol como blancos fisiológicos de hsa.mir.301b en PCa en el hombre.

***GJA1* o *Cx43*:**

La proteína codificada por el gen *GJA1* es miembro de la familia de las conexinas, proteínas constituyentes de las uniones GAP que se componen canales intercelulares proporcionando una vía para la difusión de materiales de bajo peso molecular de una célula a otra. Es la principal conexina constituyente de las uniones GAP en el corazón y se cree participa en muchos procesos fisiológicos, incluidos la regulación de la excitabilidad neuronal, el transporte de electrolitos y la diferenciación de los queratinocitos epiteliales (www.genecards.org).

En un trabajo de 2008, se evidenció que la conexina 43 (Cx43) induce directamente la expresión de E-cadherina, inhibiendo el comportamiento maligno de las células cancerosas de pulmón (Xu, H. T., Q. C. Li, et al. (2008)). Específicamente se comprobó, que Cx43 puede inducir la expresión de E-cadherina e inhibir la proliferación celular, así como, la progresión del cáncer de pulmón. En otro trabajo publicado en 2007, se demuestra que en células LNCaP de cáncer de próstata, la conexina 43 induce la sensibilización a la apoptosis a través del receptor TNF-1 (Wang, M., V. M. Berthoud, et al. (2007)). Al mismo tiempo, en un trabajo publicado en 2008 se demuestra que la expresión de la conexina 43 en células de cáncer de mama provoca una reducción de la metástasis pulmonar (Li, Z., Z. Zhou, et al. (2008)). Asimismo, sugieren que la expresión de Cx43 disminuye el potencial metastásico de las células de cáncer de mama, a través de un mecanismo relacionado con la expresión de N-cadherina y la modulación de la apoptosis. Recientemente se le atribuye un valor pronóstico en pacientes con cáncer de próstata (Benko, G., B. Spajic, et al., (2011)).

Un trabajo muy reciente, evidencia que el cluster de microARNs mir-221/222 se encuentra significativamente sobreexpresado en las células malignas de glioma y

reprime la expresión de Cx43 (Hao, J., C. Zhang, et al, (2012)). De hecho, la Cx43 es una de las conexinas más importantes en el establecimiento de uniones GAP en las células gliales. Mediante aproximaciones experimentales como oligonucleótidos anti-miR, Northern blot, Western blot y ensayos reporteros de luciferasa, permitieron determinar que el cluster mir-221/222 presenta una función oncogénica (oncomiR) en el glioma.. También existe evidencia acerca de otros microARNs, como el hsa-mir-206 y hsa-mir-1, que regulan la expresión del gen CX43 mediante la interacción con la región no traducida al 3' del ARNm, provocando alteraciones en la diferenciación celular durante el desarrollo de las células del músculo esquelético (Anderson, C., H. Catoe, et al. (2006)).

En suma, existe evidencia del rol de *GJA1* como un gen supresor de tumor en varios tipos de tumores, incluyendo próstata y una de las líneas celulares de donde se identificó el hsa-mir-301b (LNCaP). Esto apoya su papel como posible gen blanco de este microARN, ya que nuestra hipótesis lo postula como un oncomir.

KRT23:

La proteína codificada por el gen *KRT23* es un miembro de la familia de las queratinas, proteínas constituyentes de los filamentos intermedios. Constituyen fibras muy dinámicas del citoesqueleto que son reconocidas por su participación clave en la integridad estructural de las células epiteliales (www.genecards.org) siendo las proteínas más abundantes en las células epiteliales. Su función principal es la resistencia al stress mecánico al que están expuestas continuamente las células epiteliales. No obstante, más reciente en su historia, se les ha reconocido funciones relacionadas con la señalización celular, apoptosis y respuesta al stress (Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002)).

En un trabajo publicado en 2001 se reporta que el butirato sódico (inductor de la diferenciación y la apoptosis celular) provoca un gran incremento de la expresión de la queratina 23 (Zhang, J. S., L. Wang, et al. (2001)), en la línea celular de cáncer pancreático humano AsPC-1. De modo similar, la inducción de la diferenciación de las CSCs de próstata por suero produce la disminución del hsa-miR-301b y, por lo tanto, el incremento de la expresión de sus genes blancos; esto concuerda con la posibilidad de que este microARN inhiba la diferenciación reprimiendo *KRT23*. Otro trabajo reciente

establece la participación de la queratina 23 en la modulación de la acción de la proteína 14-3-3ε (Liffers, S. T., A. Maghnouj, et al. (2011)), conocida por su intervención en el control del ciclo celular, un proceso que aquí mostramos es afectado por el hsa-miR-301b. Un trabajo de 2008, establece que las células EPT1, que proponen como modelo de estudio de transición epitelial mesenquimal (EMT), subexpresan el gen *KRT23* comparadas con las células EP156T que no experimentan EMT (Ke, X. S., Y. Qu, et al. (2008)). Considerando que uno de los efectos de la sobreexpresión del hsa-mir-301b es el aumento de la invasión, que la subexpresión de *KRT23* este asociada a la transición EMT lo vuelve un interesante blanco posible de hsa-mir-301b. . En suma, las evidencias asociadas a este gen lo convierten en un blanco del hsa-mir-301b muy interesante para validar experimentalmente.

***ITPR1* o *IP3R1*:**

Este gen codifica un receptor intracelular para el inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). Su estimulación por inositol 1,4,5-trifosfato, desemboca en la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico. Se considera muy importante la participación de dicho gen en las cascadas de señalización intracelular mediadas por calcio (www.genecards.org). En un trabajo publicado en 2005, se reportó que la subexpresión de este gen inducía la adquisición de un fenotipo resistente a la apoptosis, a la vez que disminuía la sensibilidad al cisplatino de las células cancerosas de vejiga. Asimismo, se halló que la sobreexpresión de este gen induce la activación de los mecanismos efectores de la apoptosis celular y reconstituye la sensibilidad de las células al cisplatino (Tsunoda, T., H. Koga, et al. (2005)). En la actualidad, está demostrado que el Ca^{2+} es un mensajero general en las células, responsable del control de numerosos procesos celulares como el crecimiento y la muerte. Aunque la señalización celular de Ca^{2+} inducida por IP3 se encuentra bien documentada en la actividad fisiológica de numerosos tipos celulares el papel de este tipo de señalización en las células cancerosas aún se desconoce (Szatkowski, C., J. B. Parys, et al (2010)).

***SLC8A1*:**

El gen *SLC8A1* da a lugar a un intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ de baja afinidad, una proteína de membrana cuya función es regular las concentraciones intracelulares de

calcio. Se encuentra fundamentalmente en la membrana mitocondrial y en las membranas del retículoendoplásmico de las células excitables, estando involucrado en una variedad de funciones celulares, incluyendo el control de neurosecreciones, la relajación del músculo cardíaco y el mantenimiento del Ca^{2+} intracelular en el retículo endoplásmico y sarcoplásmico (www.genecards.org). En un trabajo reciente, se estableció que los genes *SLC8A1* y *TRPC1* participan en una interacción con TGF-beta que modularía la motilidad de las células del ducto pancreático, consecuencia de la modulación de la entrada de Ca^{2+} (Dong, H., K. N. Shim, et al. (2010)). Además, se ha observado que la expresión del ARNm de *SLC8A1* se incrementa cuando el epitelio prostático aumenta su polarización y su adhesión célula-célula en respuesta al estroma en cultivos tridimensionales (Chambers, K. F., J. F. Pearson, et al. (2011)). Es interesante que este proceso este también regulado principalmente por la vía de TGF-beta. *SLC8A1* podría estar modulando las uniones intracelulares a través del control de los niveles de calcio y potasio intracelular. En acuerdo con esta función, las prostatoesferas, que muestran una mayor capacidad de crecimiento independiente de anclaje y una mayor capacidad invasiva que su contraparte diferenciada adherente, expresan más hsa-mir-301b y por ende, menor cantidad de sus posibles blancos. De acuerdo a los efectos descritos en los trabajos discutidos, la posible supresión de *SLC8A1* contribuiría a generar el fenotipo de prostatoesfera. Esto convierte a *SLC8A1* un otro gen interesante para validar su interacción con el hsa-mir-301b experimentalmente.

QKI (quaking):

Es una proteína de unión al ARN, su acción en la regulación de la expresión es a nivel del empalme del pre-ARNm, la exportación del ARNm, la estabilidad del ARNm y la traducción de proteínas. Posee un reconocido rol en la mielinización, es un regulador de la diferenciación y maduración de los oligodendrocitos. Durante la diferenciación de las células gliales, las proteínas QKI regulan la expresión del supresor de tumor *CDKN1B* (p27) y de la proteína básica de mielina (MBP) (www.genecards.org). Las mutaciones en el gen humano *quaking*, así como, la reducción de su expresión se correlacionan con los gliomas humanos y el cáncer de colon (Biedermann, B., H. R. Hotz, et al. (2010)). En las células productoras de mielina en los mamíferos, *QKI*

promueve la expresión de los factores necesarios para la diferenciación terminal y la producción de mielina (MBP, el MAG y Krox 20). En las células progenitoras neuronales la expresión de *QKI* activa y promueve el perfil de diferenciación hacia células gliales. (Biedermann, B., H. R. Hotz, et al. (2010)). En un trabajo en 2005 realizaron la búsqueda bioinformática de los ARN mensajeros blancos de *QKI* basados en la secuencia de reconocimiento establecida y posteriormente estudiaron las características de estos ARNm (Galarneau, A. and S. Richard (2005)). Una gran proporción de estos ARNm participan en el desarrollo y se vinculan con la diferenciación celular. Asimismo, un 24% se encuentra relacionado con el crecimiento celular. Por otro lado, se encontró una delección de *QKI* en el 29% de las muestras de glioblastoma multiforme, sugiriendo que actúa como gen supresor de tumor (Yin, D., S. Ogawa, et al. (2009)). De modo similar, otros investigadores hallaron que *QKI* se encuentra generalmente suprimida y hasta en algunos casos ausente, en el cáncer de colon. Por otro lado, la sobreexpresión de *QKI*, deriva en una reducción en la proliferación y tumorigenicidad de las células y un aumento de marcadores de diferenciación de enterocito (IAP y lactasa). De este modo, *QKI* funcionaría como un regulador en la diferenciación de las células epiteliales de colon presentando propiedades supresoras de la carcinogénesis (Yang, G., H. Fu, et al. (2010)).

Finalmente, en el trabajo de Duhagon, M. A., E. M. Hurt, et al. (2010), donde se desarrolló un modelo para aislar y cultivar selectivamente las prostatoesferas, se demostró la subexpresión de *QKI* en las prostatoesferas en relación a su contrapartida de células adherentes. Dado que mir-301b se identificó en este mismo modelo, este trabajo demuestra la expresión invertida simultánea de este microARN y *QKI*, lo que lo convierte en un excelente blanco candidato para continuar estudiando.

PTGER2:

Este gen codifica el receptor de la prostaglandina E2. E2 es un metabolito derivado del ácido araquidónico que posee diferentes actividades biológicas en una amplia gama de tejidos celulares (www.genecards.org). Un trabajo publicado en 2006, muestra una asociación entre el PCa y *PTGER2*, correlacionando directamente el gen con la carcinogénesis; específicamente, la expresión de *PTGER2* se asocia con un aumento en la malignidad y desarrollo tumoral (Miyata, Y., S. Kanda, et al. (2006)). En el mismo

sentido, un trabajo publicado más recientemente, propone un rol para este gen en la inducción de la angiogénesis. Además, se ha planteado el bloqueo de la vía de transducción de este gen para inducir la inhibición del crecimiento del PCa con objetivos terapéuticos (Jain, S., G. Chakraborty, et al. (2008).). Estos antecedentes posicionarían a *PTGER2* como un oncogen, lo va en contra con la posibilidad de que sea blanco de un oncomir como hsa-mir-301b. No obstante, en contraposición con los resultados anteriormente mencionados, ratones nulos para *PTGER2* los tumores desarrollados por los animales exhibían mayor tamaño y un fenotipo más agresivo, así bien exhiben menor sensibilidad carcinogénesis inducida por irradiación UV (Brouxhon, S., R. L. Konger, et al. (2007)). En línea también con un papel de gen supresor de tumor, Sugino et al, encuentran frecuentemente silenciado epigeneticamente en las líneas celulares de neuroblastoma, siendo mas frecuente en los estadios avanzados que en los estadios tempranos de esta patología. (Sugino, Y., A. Misawa, et al. (2007)) La evidencia disponible, indica entonces tanto un papel oncogénico como de supresor de tumor para *PTGER2*, lo que probablemente dependa de el momento de la carcinogénesis en el que se considere, así como el tipo y/o subtipo de cáncer considerado. Por esta razón la literatura científica en torno a *PTGER2* no lo posiciona como genes blancos más interesantes para validar experimentalmente de nuestra lista pero tampoco permite descartarlo completamente como posible blanco de hsa-mir-301b.

CAV2:

La proteína CAV2 constituye un componente importante de la superficie interna de las caveolas. Las caveolas son pequeñas invaginaciones de la membrana plasmática, que están involucradas en funciones celulares esenciales, como la transducción de señales, el metabolismo lipídico, el control del crecimiento celular y la apoptosis. Los genes *CAV 1* y *2* están co-localizados en una región altamente conservada, que abarca un sitio frágil conocido (7q31.1), puesto que su eliminación presenta asociación (pérdida de heterocigosidad) con una gran variedad de cánceres humanos, incluyendo el cáncer de mama, de colon, esófago, cabeza y cuello, riñón, boca, páncreas, próstata, ovario y estómago (www.genecards.org). Asimismo, estudios con ratones que presentan deletado el gen *CAV-1*, sugieren que tanto *CAV-1* como *CAV-2* podrían cumplir

funciones como genes supresores de tumores para algunas neoplasias malignas (Langeberg, W. J., S. A. Tahir, et al. (2010)) (Fra, A. M., E. Pasqualetto, et al. (2000)). En el 2004, dos trabajos independientes reportan que CAV2 se encuentra en una región genómica que confiere susceptibilidad al cáncer de próstata y que muestra una diferencia significativa en el nivel de expresión de ARNm entre el tejido tumoral y el tejido normal. (Burmester, J. K., B. K. Suarez, et al. (2004) Chene, L., C. Giroud, et al. (2004)). Toda la evidencia planteada posiciona a CAV2 como gen supresor de tumor en cáncer y específicamente en cáncer de próstata, lo que lo convierte en un gen blanco del hsa-mir-301b interesante para estudiar y validar experimentalmente.

***PPARGC1A* o *PGC-1 α* :**

Este gen pertenece a la familia de coactivadores transcripcionales PGC-1, juega un rol central en la regulación de la biogénesis y función mitocondrial. Posee una expresión diferencial en tejidos de alto requerimiento oxidativo. En particular *PGC-1 α* es un regulador clave de la biogénesis mitocondrial, jugando un rol preponderante en el control metabólico y la homeostasis energética. Los niveles de *PGC-1 α* responden a distintos estímulos como, cambios en el suministro de nutrientes, fluctuaciones térmicas, especies oxidativas, señales endocrinas (insulina y T3), citoquinas, demanda energética, hipoxia, etc. Resulta fundamental su función para una correcta respuesta de la función mitocondrial a los distintos estímulos que afecten a la célula (Anderson, R. and T. Prolla (2009)). En un trabajo publicado en 2007 en donde trabajaron con células epiteliales de cáncer de ovario, se observó que este gen se encuentra subexpresado en cánceres agresivos de ovario en comparación con células de ovario normal (Zhang, Y., Y. Ba, et al. (2007)). Además, evidenciaron que la sobreexpresión de este gen en la línea celular de cáncer de ovario (Ho-8910), promueve un aumento de la apoptosis celular por intermedio de Bcl-2. Finalmente, plantearon que la supresión de *PPARGC1A* sería un paso importante en la carcinogénesis de las células epiteliales de ovario. En un trabajo de 2010, en el estudio de la relación entre la actividad física y el gen *PGC-1 α* , encontraron un microARN (mir-696) que poseía como blanco a dicho gen. De hecho, observaron que en los miocitos que la variación intracelular del mir-696 se correspondía con una regulación negativa de la proteína PGC-1 α . Además, encontraron que la disminución del nivel de proteína PGC-1 α se asociaba a una

disminución en la biogénesis mitocondrial y en la oxidación de ácidos grasos (Aoi, W., Y. Naito, et al. (2010)). Shiota et al, mostraron que la supresión de *PGC-1 α* provoca la inhibición en el crecimiento de las células de PCaprovocando la acumulación de células en la fase G1 del ciclo celular (Shiota, M., A. Yokomizo, et al. (2010)). La evidencia expuesta presenta al gen como un candidato interesante de estudio del hsa-mir-301b teniendo la acción directa del mismo sobre el metabolismo celular y su acción inhibidora de crecimiento.

PHACTR2:

Los miembros de la familia Phactr 1-4, fueron caracterizados por su capacidad de coinmunoprecipitar con la actina y la proteína PP1 (proteína fosfatasa 1y se ha sugerido que puedan desempeñar un papel en la regulación de la dinámica del citoesqueleto. Se propone que estas proteínas evitarían la proliferación de los filamentos de actina mediante el secuestro de la actina-G. (Allen, P. B., A. T. Greenfield, et al. (2004)) Además de su función relacionada con la actina, es un regulador de PP1; esta proteína es esencial para la progresión del ciclo celular durante la transición de mitosis a interfase (www.genecards.org). No se encontraron reportes sobre los efectos producto de la supresión de este gen que permitan relacionar con las características asociadas al microARN.

SLMAP:

Las proteínas del sarcolema asociadas a membrana (SLMAPs), comprenden una familia única de proteínas codificadas por un único gen que mapea en el cromosoma humano 3p14.3-21.2. Guzzo et al, encontraron que colocaliza con la γ -tubulina de los centrosomas en todas las fases del ciclo celular. A su vez, se observó que niveles altos de la proteína son letales en los cultivos de fibroblastos, mientras que la supresión del gen es acompañada de una acumulación de las células en la fase de G2/M del ciclo celular (Guzzo, R. M., S. Sevinc, et al. (2004)). Si bien la bibliografía asociada al gen es escasa, resulta interesante que su supresión se asocie con la acumulación de células en G2/M, considerando que producto de la sobreexpresión del microARN, observamos un retraso de las células en G2/M.

CFL2:

Es una proteína que pertenece al factor de despolimerización de actina (ADF) de la familia de las cofilinas. Estas proteínas tienen un papel fundamental en la regulación de la dinámica de los filamentos de actina en una gran variedad de células. Se puede unir a G y F-actina en una proporción de 1:1 de cofilina-actina (www.genecards.org). Un trabajo reciente de 2011, reportó que la subexpresión de este gen se correlaciona directamente con el cáncer de páncreas, proponiendo a este gen como un posible biomarcador de uso clínico, así como, un posible blanco de terapéutica (Wang, Y., Y. Kuramitsu, et al. (2011)). No obstante, Ke et al, comunican que *PARVA* y *CLF2* están sobreexpresados en una línea celular de PCa capaces de realizar la transición epitelial mesenquimatoso (EMT) comparadas con células que no experimentan EMT (Ke, X. S., Y. Qu, et al. (2008).). Esta evidencia indica entonces un papel oncogénico para este gen, que no coincide con la hipótesis de acción del hsa-mir-301b, lo que lo ubica fuera del grupo de genes prioritarios a continuar estudiando y validar experimentalmente.

PARVA:

Este gen es miembro de la familia de las Parvinas, proteínas de unión a la actina. Las Parvinas poseen gran homología con dominios calponina de unión a los filamentos de actina. Esta proteína es parte de un complejo de quinasas vinculadas a integrinas, que desempeñan papel en la regulación de la señalización, organización del citoesqueleto, adhesión celular y motilidad celular (www.genecards.org). Un trabajo publicado en 2008, estableció un modelo de estudio de la transición epitelial mesenquimal (EMT) para el cáncer de próstata. En la caracterización de las células EPT1, que proponen como modelo de estudio de EMT, hallaron los genes *PARVA* y *CLF2* están sobreexpresado en estas células comparadas con las células que no experimentan EMT EP156T (Ke, X. S., Y. Qu, et al. (2008)). Esta evidencia indica entonces un papel oncogénico para este gen, que no coincide con la hipótesis de acción del hsa-mir-301b, lo que lo ubica fuera del grupo de genes prioritarios a continuar estudiando y validar experimentalmente.

En resumen, como resultado del análisis de la actividad de los posibles genes blancos del hsa-mir-301b, podemos establecer primeramente, que la estrategia diseñada y

realizada nos permitió hallar un grupo interesante de genes candidatos blancos del hsa-mir-301b. Esto resulta estimulante si tenemos en cuenta que partimos con una lista de 308 genes. Considerando que los predictores de microARNs generalmente proporcionan un gran listado de genes blancos predictivos, constituye un desafío acotar la lista a números manejables experimentalmente. Por otro lado, los experimentos necesarios para validar un gen blanco candidato son costosos en material y en tiempo, por lo que es fundamental tomar decisiones guiadas por todos los datos disponibles a la hora de decidir que grupo de genes candidatos van a ser abordados empíricamente.

Análisis en Diana MirPath.

En este punto, nos proponemos identificar las vías moleculares potencialmente alteradas por la expresión de hsa-miR-301b a través de un método puramente bioinformático. La aproximación que llevaremos adelante nos permite visualizar de manera global y funcional, las vías de acción en que participan los genes blancos predictivos del hsa-mir-301b. En primer lugar, se realizó nuevamente la predicción de genes blanco para este microARN, utilizando el programa DIANA mirPath (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/pathways/>). Utilizamos los 3 algoritmos distintos de búsqueda de microARNs (DIANA-microT-4.0 versión Beta, PicTar y TargetScan versión 5.0) disponibles en el programa para utilizar con el buscador mirPath, como se menciona en la metodología. El resultado de este análisis de predicción de vías muestra la agrupación en diferentes vías o procesos biológicos, de los genes predictivos hallados por los 3 algoritmos utilizados. Este programa hace uso de la base de datos de vías biológicas KEGG Pathway, para facilitar la visualización de los resultados de predicción obtenidos, agrupándolos en las vías en que participan. No obstante, es importante resaltar que esta aproximación, si bien brinda y facilita la visualización de las posibles vías de acción del microARN, no ofrece información acerca del modo en que module la vía. Consecuentemente, aunque no es una estrategia que nos permita definir certeramente la modulación de la vía predictiva, hace posible formular o evaluar hipótesis sobre el modo de acción del microARN a nivel molecular. De este modo, nos permite definir vías de interés para un futuro acercamiento experimental.

En el gráfico de la FIGURA 29, se muestran los resultados obtenidos del análisis realizado para el hsa-mir-301b. Específicamente, se presentan las 5 vías con los valores de mayor significación para el grupo unión de genes, predichos por los 3 algoritmos utilizados.

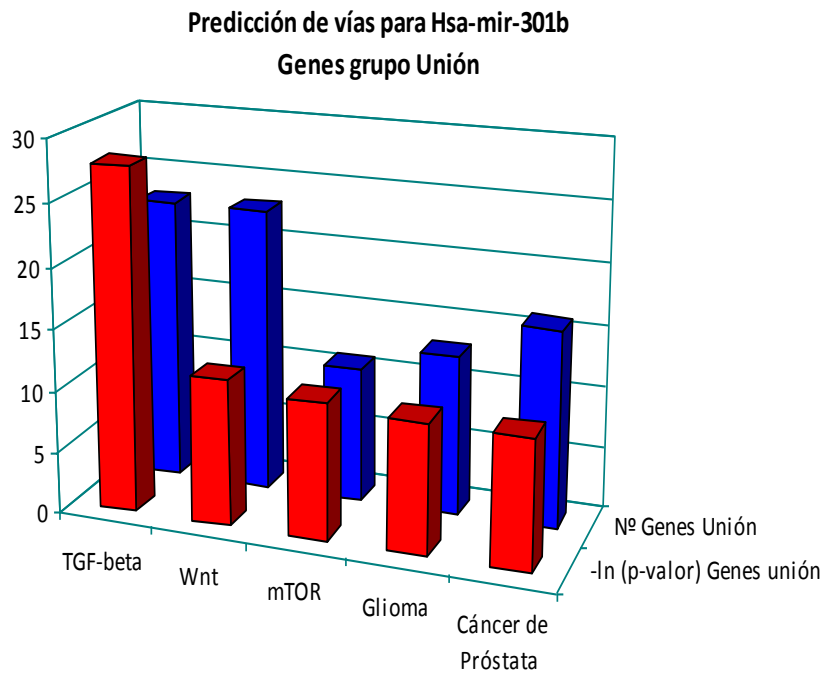


Figura 29. Vías de señalización en las que participan los genes blanco predictivos para hsa-miR-301b. Las barras en rojo muestran los valores de significación promedio ($-\ln(p\text{-valor})$) de los genes presentes en cada vía. Las barras en azul muestran el número de genes presentes en cada una de las vías.

Los resultados de este estudio (FIGURA 29), destacan la vía TGF-beta con un valor de $-\ln(p\text{-valor})$ de 27,84. Los valores de significación de las vías predictivas que le siguen son sensiblemente menores, lo que convierte a la vía de TGF-beta. en un sujeto muy interesante para futuros análisis experimentales. La superfamilia TGF-beta comprende las proteínas TGF-beta, las proteínas morfogénicas óseas (BMP), activinas y otras proteínas relacionadas y se expresa prácticamente en todos los tejidos. Las proteínas SMAD, son los efectores intracelulares de señalización de la vía, estas son activadas por receptores de membrana, que provocan su translocación al núcleo, donde efectuaran su acción a nivel de la regulación transcripcional. La vía TGF-beta fue

primeramente identificada por su rol clave en el desarrollo, a través de sus efectos en la proliferación celular, la diferenciación y migración, factores fundamentales en el establecimiento de la estructura corporal y la diferenciación de los tejidos (Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003)). Se considera también que esta vía cumple un papel complejo en la carcinogénesis, dependiente de la etiología molecular específica del tumor o del tipo específico de la célula de origen (Reiss, M. (1999)). De hecho, se le atribuye una función supresora de tumor en las etapas iniciales de la carcinogénesis epitelial asociada a su efecto inhibitorio en el crecimiento en las células epiteliales. Asimismo, la pérdida de sensibilidad a los efectos antiproliferativos de TGF-beta se relaciona frecuentemente con la reducción de expresión o inactivación de los receptores de TGF-beta, lo que genera una gran asociación con la progresión maligna (Reiss, M. (1999)). En particular, el gen TGFBR2 (receptor de tipo II de la vía) es un locus blanco frecuente de mutaciones inactivantes. De hecho, la inactivación mutacional de TGFBR2 es el evento genético más común que altera a la vía de señalización y se produce en aproximadamente entre el 20-30% de todos los cánceres de colon (Biswas, S., A. Chytil, et al. (2004)). Es generalmente aceptado que el efecto supresor del crecimiento que presenta TGF-beta, constituye una vía supresora de tumores que incluye los ligandos, los receptores, los transductores que transmiten la señal corriente abajo y sus blancos transcripcionales (de Caestecker, M. P., E. Piek, et al. (2000)). Sin embargo, el panorama no es tan claro en los estadios más avanzados del cáncer. De hecho, existe bibliografía que evidencia un efecto contrario de la vía TGF-beta, en estadios más avanzados. Se ha visto que esta vía vira de su función supresora de tumor a hacia pro-oncogénica en la progresión hacia estados más avanzados del tumor (Tang, B., M. Vu, et al. (2003)., Jeon, H. S. and J. Jen (2010)). Incluso, se ha observado que la activación de TGF-beta en estados más avanzados de algunos tipos de cánceres, promueve la capacidad invasiva y el potencial metastásico (Roberts, A. B. and L. M. Wakefield (2003)). En suma, es posible que la vía TGF-beta por lo general, funciona como un regulador de crecimiento negativo en las células normales y en el desarrollo temprano del tumor, pero que promueva la invasión tumoral y la metástasis mediante la inducción de la transición epitelial mesenquimal y la neoangiogénesis posteriormente (Jeon, H. S. and J. Jen (2010)). Asimismo, existe evidencia reportada en un estudio donde trabajaron con un modelo de xenoinjerto en cáncer de mama, donde se reporta

que la pérdida de respuesta a TGF-beta se encuentra asociada a la promoción de la transformación maligna y la progresión de la enfermedad hasta alcanzar un estadio de alto grado invasivo. No obstante, a partir de este último estadio, la pérdida de respuesta a TGF-beta pasa a prevenir la progresión del mismo, producto de la supresión de la diseminación metastásica. (Tang, B., M. Vu, et al. (2003)) De hecho, se cree que la explicación de este fenómeno, que comprende un rol dual de la vía en la carcinogénesis, se encontraría asociado a los cambios y alteraciones comúnmente reportadas en los estadios avanzados del cáncer. Las etapas mas avanzadas de la progresión tumoral implican generalmente, una gran variedad de cambios y alteraciones genéticos y/o epigenéticos que perturban radicalmente la interpretación celular de la vía TGF-beta, provocando la transformación de su respuesta a los mismos estímulos (Tang, B., M. Vu, et al. (2003)). En un trabajo reciente un grupo de investigadores realizó un estudio de meta-análisis para identificar y priorizar los genes candidatos asociados con el desarrollo de cáncer de próstata y la metástasis ósea (Gorlov, I. P., K. Sircar, et al, (2010)). Se basan en información y datos de expresión de genes extraídos de la base de datos de expresión ONCOMINE, específicamente datos de genes que presentan una expresión diferencial en la transición desde próstata normal y cáncer de próstata localizado hacia la enfermedad metastásica. Como parte de esta búsqueda reportan a la vía TGF-beta, por tratarse de la vía que presenta mayor significación asociada al desarrollo de metástasis ósea. No obstante, observamos que entre las 5 vías mas significativas para el grupo unión de genes, encontramos las vías de cáncer de próstata y glioma. Que se halle la vía de desarrollo del cáncer de próstata, involucra que el hsa-mir-301b exhibiría genes blancos involucrados con el desarrollo del PCa. Si consideramos el marco teórico del trabajo y la hipótesis del mismo, este resultado es muy sugestivo. Asimismo, también resulta interesante la asociación predictiva hallada con la vía de desarrollo de glioma. Al tratarse de genes que se encuentran directamente involucrados con el cáncer, manifiesta un marco interesante de acción para el hsa-mir-301b. Como ya mencionamos antes, en el segundo lugar encontramos la vía Wnt, esta vía despierta cierto interés, ya que es una vía de señalización muy compleja que participa en muchos procesos importantes en la biología de la célula como, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación (Huelsken, J. and J. Behrens (2002), Gardner, S., E. Stavrou, et al. (2010)). De igual

manera, a lo que ocurre con otras vías de señalización claves en el desarrollo, la vía de señalización Wnt es muy conservada y participa en el desarrollo coordinado en muchos organismos (Malhotra, G. K., X. Zhao, et al, (2011)). La desregulación de esta vía conlleva a distintas patologías, la más notable es el cáncer (Gardner, S., E. Stavrou, et al. (2010)). Particularmente, dentro del contexto de las células madre, existe bibliografía reportada que evidencia un rol importante de esta vía, en la biología de las células madre y células madre de cáncer (Malhotra, G. K., X. Zhao, et al, (2011)). También es reconocido el papel de la vía Wnt en el desarrollo del PCa, por ejemplo, se ha observado mediante ensayos inmunohistoquímicos la expresión anormal de Wnt5a (miembro de la vía Wnt) en un 28% de muestras de PCa correlacionado con altos valores de la escala Gleason (Kharashvili, G., D. Simkova, et al. (2011)). Teniendo en cuenta esto, es que resulta interesante pensar en un posible rol del microARN estudiado, en la modulación de esta vía esencial en la biología de las células madre y madre de cáncer. Entre las primeras cinco vías encontramos también la vía mTOR. En un trabajo reciente en 2011, estudiaron la influencia de mTOR en el mantenimiento y la diferenciación de las células de cáncer de tipo madre. Trabajando con las células tumorales de hígado murinas, H-Ras transformadas, ellos hallaron que la inhibición de mTOR con la droga Rapamicina, conducía a un aumento de la población subcelular CD133⁺ (marcador de CSCs). Asimismo, inducía a la expresión de genes de tipo célula madre. Sumado a lo anteriormente mencionado, ellos hallaron que la inhibición de mTOR, bloqueaba la diferenciación de las células tumorales de hígado CD133⁺ a CD133⁻ (Yang, Z., L. Zhang, et al. (2011)). Esta evidencia manifiesta también un interesante involucramiento de esta vía en la biología de las células madre de cáncer. No obstante, como ya mencionamos anteriormente, la vía que presenta real interés para continuar su estudio y abordar experimentalmente, es la vía TGF-beta. Esta consideración se asocia directamente al gran valor de significación que presenta como vía predictiva de acción del hsa-mir-301b.

Es importante señalar la existencia de bibliografía que evidencia la modulación de la vía TGF-beta producto de la acción de microARNs. En un trabajo reciente mediante el uso de herramientas bioinformáticas, se identificó a SMAD2 (uno de los mediadores de la señalización de TGF-beta), como blanco predictivo del microARN 155. Asimismo, mediante la utilización de un vector lentiviral inducible, que poseía el gen del hsa-mir-

155, proporcionan evidencia directa de la unión del hsa-mir-155 al 3' UTR del ARNm del gen y la capacidad del microARN para reprimir la expresión de la proteína SMAD2. Además, observaron que la sobreexpresión del microARN 155 alteraba la respuesta celular a TGF-beta, cambiando la expresión de un conjunto de genes implicados en la inflamación, la fibrosis, y la angiogénesis. En conjunto, este trabajo muestra que el microARN 155 juega un rol importante en la modulación de la respuesta celular a TGF-beta (Louafi, F., R. T. Martinez-Nunez, et al. (2010)). En otro estudio reciente, examinaron el papel del microARN 21 en la diferenciación adipogénica de células madre mesenquimales derivadas del tejido adiposo humano (hASCs). En este estudio encontraron que la expresión del hsa-mir-21, se incrementó de forma transitoria después de la inducción de la diferenciación adipogénica, alcanzando un máximo al tercer día, y volviendo al nivel de referencia al día 8. La aproximación experimental basada en la sobreexpresión del microARN, utilizando un vector lentiviral que porta el gen del hsa-mir-21, disminuyó los niveles de ARNm del gen TGFBR2, así como, el nivel de la proteína. La expresión de TGFBR2 se redujo durante la diferenciación adipogénica de las células hASCs, en concordancia con el aumento del hsa-mir-21. En suma, el trabajo demuestra que el hsa-mir-21 posee un rol en la diferenciación adipogénica de las células hASCs, mediado por la modulación de la vía de señalización TGF-b (Kim, Y. J., S. J. Hwang, et al. (2009)). Por otro lado, los microARNs hsa-mir-24, hsa-mir-192 y el cluster de microARNs mir-72-92, han mostrado participación en la modulación de la vía TGF-beta con efectos en la diferenciación y la proliferación (Sun, Q., Y. Zhang, et al. (2008), Chung, A. C., X. R. Huang, et al. 2010, Mestdagh, P., A. K. Bostrom, et al. (2010), respectivamente).

Esta evidencia en su conjunto, pone de manifiesto que no es muy osado suponer una posible modulación de la vía TGF-beta producto de la acción del hsa-mir-301b. De hecho existe evidencia que muestra que la acción de un solo microARN es capaz de modular esta vía, provocando un efecto en la diferenciación, en la angiogénesis y en otros procesos vinculados con esta vía tan compleja. De hecho, nuestros antecedentes muestran que la sobreexpresión de hsa-mir-301b produce un efecto muy importante en la capacidad invasiva de las líneas celulares de PCa aquí estudiadas. Dada el conocido involucramiento de la vía de TGF-beta en el EMT, los datos experimentales apoyarían en principio la modulación directa o indirecta de esta vía por este microARN.

Obviamente, es necesario diseñar y realizar experimentos que nos permitan demostrar la acción del microARN en la modulación de la vía TGF-beta. Asimismo, sería muy interesante interrogar los datos de expresión de microarreglos realizados por Duhagon, para las dos variantes transfectantes hsa-mir-301b y control. Estos datos de expresión, nos permitirán determinar grupos de genes que se encuentren regulados diferencialmente entre ambas condiciones, de esta manera, buscar directamente la existencia de genes vinculados con la vía TGF-beta que muestren un perfil diferencial en su expresión coherente con el contexto del trabajo. Otro abordaje tentativo podría ser la utilización de inhibidores directos de proteínas constituyentes de la vía TGF-beta (receptores TGFBR2, TGBR1, ACVR1, etc), y estudiar los fenotipos asociados con la inhibición, buscando patrones fenotípicos similares a los reportados por la acción del microARN. De esta manera, acercarse mas a definir un posible rol de la modulación de la vía asociado a los fenotipos evidenciados en este trabajo y en los antecedentes del mismo.

Conclusiones y Perspectivas.

Los antecedentes de esta Tesina mostraron que el hsa-mir-301b es un microARN que se sobreexpresa en las células madres de próstata y que es capaz de modular procesos celulares como la diferenciación y la invasividad. Durante esta Tesina se buscó avanzar en la comprensión del papel del hsa-mir-301b en el PCa. Para esto se realizó un abordaje experimental y otro bioinformático. El primero investigó el efecto de este microARN sobre la proliferación celular, y el segundo pretendió generar una lista de posibles genes blanco que orientara a decidir que genes estudiar experimentalmente en el futuro. En relación al primer objetivo, se llevó a cabo recuento de células, estudio de actividad metabólica mediante ensayos de MTT y estudios de la distribución de células en el ciclo celular mediante citometría de flujo. Las tres aproximaciones mostraron consistentemente que la sobreexpresión del hsa-mir-301b conduce a una disminución significativa de la proliferación celular. En particular, se mostró que este cambio puede deberse a una acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular. Este fenómeno fue además se observó reproducido en las dos líneas celulares estudiadas, lo que sugiere que el hsa-mir-301b actúa sobre una función básica de la célula prostática. Esto sugiere que el microARN hsa-mir-301b podría contribuir al mantenimiento de la relativa quiescencia celular observada en las CSCs de PCa. Se ha reportado que la quiescencia puede estar relacionada con una capacidad incrementada para realizar EMT, lo que está de acuerdo con el gran incremento en la invasividad que manifiestan las líneas celulares que sobreexpresan el hsa-mir-301b. Asimismo, esto podría generar un aumento de la resistencia a los citostáticos utilizados en el tratamiento del PCa metastático. De este modo, queda planteado para un futuro el estudio del efecto de la sobreexpresión del hsa-mir-301b en la actividad metabólica de la línea DU145.

En relación al segundo objetivo específico propuesto, se hizo uso de las siguientes aproximaciones: utilización de algoritmos predictores de genes blancos de microARNs, estudio en bases de datos de expresión génica de muestras clínicas (ONCOMINE, CGAP y HPA), la utilización de programas de búsqueda de vías predictivas de acción de microARNs y la utilización de la base de datos de publicaciones científicas PUBMED. A

través de ellos se consiguió generar una lista de aproximadamente 14 genes, en la que *GJA1*, *KRT23*, *ITPR1* y *SLC8A1* son los más interesantes, puesto que pasaron todos los filtros propuestos y se encontró evidencia que los postula como genes supresores de tumor en PCa. Por último, se determinó que los genes blanco predictivos se agrupan preferentemente en la vía de señalización TGF-beta lo que sirve de guía para el progreso en la búsqueda de los mecanismos moleculares y celulares que afecta el hsa-mir-301b.

En suma, logramos establecer una serie de genes blancos candidatos y una vía de acción de interés, que podrían explicar el fenotipo asociado al microARN en estudio.

Este trabajo, da a lugar a varias perspectivas a futuro entorno a la comprensión de la participación del hsa-mir-301b en el cáncer de próstata. Primeramente, se plantea estudiar el perfil de expresión de los genes blancos seleccionados aquí en los perfiles de expresión diferencial de genes presentes en las líneas transfectantes hsa-mir-301b y control obtenidos por Duhagon.

En segundo lugar, realizar un análisis de expresión diferencial de los genes que presentan mayor interés para su validación como blancos de acción del hsa-mir-301b, mediante cuantificación por qRT-PCR en las líneas celulares transfectantes hsa-mir-301b y control.

En tercer lugar, llevar a cabo ensayos de western blots con anticuerpos comerciales específicos para los genes blancos, para determinar la relación inversa entre el microARN y la proteína en las líneas celulares transfectantes hsa-mir-301b y control.

En cuarto lugar, hacer ensayos de genes reporteros clonando las regiones 3' UTR salvaje y mutante de los genes candidatos establecidos de mayor interés, con el fin de validar experimentalmente que efectivamente son genes blancos de acción del microARN en estudio.

En quinto lugar, profundizar en el entendimiento de la modulación de la vía de señalización TGF-beta en el cáncer de próstata. Evaluando el efecto de la activación e inhibición de la vía con inhibidores y activadores específicos.

El progreso de este proyecto contribuirá a obtener una idea más acabada de la importancia del hsa-mir-301b en el PCa y permitirá a más largo plazo evaluar el posible interés de su uso en el diagnóstico y la terapéutica de la enfermedad.

Bibliografía.

- Al-Hajj, M., M. W. Becker, et al. (2004). "Therapeutic implications of cancer stem cells." *Curr Opin Genet Dev* 14(1): 43-7.
- Al-Hajj, M., M. S. Wicha, et al. (2003). "Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(7): 3983-8.
- Allen, P. B., A. T. Greenfield, et al. (2004). "Phactrs 1-4: A family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(18): 7187-92.
- Anderson, C., H. Catoe, et al. (2006). "MIR-206 regulates connexin43 expression during skeletal muscle development." *Nucleic Acids Res* 34(20): 5863-71.
- Anderson, R. and T. Prolla (2009). "PGC-1alpha in aging and anti-aging interventions." *Biochim Biophys Acta* 1790(10): 1059-66.
- Andriole, G. L., E. D. Crawford, et al. (2009). "Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial." *N Engl J Med* 360(13): 1310-9.
- Aoi, W., Y. Naito, et al. "The microRNA miR-696 regulates PGC-1{alpha} in mouse skeletal muscle in response to physical activity." *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298(4): E799-806.
- Attard, G., J. F. Swennenhuis, et al. (2009). "Characterization of ERG, AR and PTEN gene status in circulating tumor cells from patients with castration-resistant prostate cancer." *Cancer Res* 69(7): 2912-8.
- Bapat, S. A. (2007). "Evolution of cancer stem cells." *Semin Cancer Biol* 17(3): 204-13.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116(2): 281-97.
- Becker, C., A. Hammerle-Fickinger, et al. "mRNA and microRNA quality control for RT-qPCR analysis." *Methods* 50(4): 237-43.
- Benko, G., B. Spajic, et al. "Prognostic value of connexin43 expression in patients with clinically localized prostate cancer." *Prostate Cancer Prostatic Dis* 14(1): 90-5.
- Bentwich, I. (2005). "Prediction and validation of microRNAs and their targets." *FEBS Lett* 579(26): 5904-10.
- Berezikov, E., G. van Tetering, et al. (2006). "Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis." *Genome Res* 16(10): 1289-98.
- Biedermann, B., H. R. Hotz, et al. "The Quaking family of RNA-binding proteins: coordinators of the cell cycle and differentiation." *Cell Cycle* 9(10): 1929-33.
- Biswas, S., A. Chytil, et al. (2004). "Transforming growth factor beta receptor type II inactivation promotes the establishment and progression of colon cancer." *Cancer Res* 64(14): 4687-92.
- Bostwick, D. G. (1989). "Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN)." *Urology* 34(6 Suppl): 16-22.
- Brouxhon, S., R. L. Konger, et al. (2007). "Deletion of prostaglandin E2 EP2 receptor protects against ultraviolet-induced carcinogenesis, but increases tumor aggressiveness." *J Invest Dermatol* 127(2): 439-46.
- Bubendorf, L., A. Schopfer, et al. (2000). "Metastatic patterns of prostate cancer: an autopsy study of 1,589 patients." *Hum Pathol* 31(5): 578-83.

- Burmester, J. K., B. K. Suarez, et al. (2004). "Analysis of candidate genes for prostate cancer." *Hum Hered* 57(4): 172-8.
- Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." *Nat Rev Cancer* 6(11): 857-66.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (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): 15524-9.
- Calin, G. A., C. Sevignani, et al. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2999-3004.
- Catalona, W. J., D. R. Miller, et al. (1988). "Intermediate-term survival results in clinically understaged prostate cancer patients following radical prostatectomy." *J Urol* 140(3): 540-3.
- Catalona, W. J., C. G. Ramos, et al. (1999). "Contemporary results of anatomic radical prostatectomy." *CA Cancer J Clin* 49(5): 282-96.
- Catalona, W. J., D. S. Smith, et al. (1997). "Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements." *JAMA* 277(18): 1452-5.
- Chambers, K. F., J. F. Pearson, et al. "Stroma regulates increased epithelial lateral cell adhesion in 3D culture: a role for actin/cadherin dynamics." *PLoS One* 6(4): e18796.
- Chene, L., C. Giroud, et al. (2004). "Extensive analysis of the 7q31 region in human prostate tumors supports TES as the best candidate tumor suppressor gene." *Int J Cancer* 111(5): 798-804.
- Chung, A. C., X. R. Huang, et al. "miR-192 mediates TGF-beta/Smad3-driven renal fibrosis." *J Am Soc Nephrol* 21(8): 1317-25.
- Coppola, V., R. De Maria, et al. "MicroRNAs and prostate cancer." *Endocr Relat Cancer* 17(1): F1-17.
- Costinean, S., N. Zanesi, et al. (2006). "Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(18): 7024-9.
- Coulombe, P. A. and M. B. Omary (2002). "'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments." *Curr Opin Cell Biol* 14(1): 110-22.
- de Caestecker, M. P., E. Piek, et al. (2000). "Role of transforming growth factor-beta signaling in cancer." *J Natl Cancer Inst* 92(17): 1388-402.
- De Marzo, A. M., Y. Nakai, et al. (2007). "Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis." *Urol Oncol* 25(5): 398-400.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2006). "A working group classification of focal prostate atrophy lesions." *Am J Surg Pathol* 30(10): 1281-91.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, et al. (2007). "Inflammation in prostate carcinogenesis." *Nat Rev Cancer* 7(4): 256-69.
- DeMarzo, A. M., W. G. Nelson, et al. (2003). "Pathological and molecular aspects of prostate cancer." *Lancet* 361(9361): 955-64.
- Derynck, R. and Y. E. Zhang (2003). "Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling." *Nature* 425(6958): 577-84.
- Dong, H., K. N. Shim, et al. "Molecular mechanisms underlying Ca²⁺-mediated motility of human pancreatic duct cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 299(6): C1493-503.

- Dontu, G., M. Al-Hajj, et al. (2003). "Stem cells in normal breast development and breast cancer." *Cell Prolif* 36 Suppl 1: 59-72.
- Dontu, G., K. W. Jackson, et al. (2004). "Role of Notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells." *Breast Cancer Res* 6(6): R605-15.
- Duhagon, M. A., E. M. Hurt, et al. "Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres." *BMC Genomics* 11: 324.
- Dweep, H., C. Sticht, et al. "miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes." *J Biomed Inform* 44(5): 839-47.
- Esquela-Kerscher, A. and F. J. Slack (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer* 6(4): 259-69.
- Eulalio, A., E. Huntzinger, et al. (2008). "Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing." *Cell* 132(1): 9-14.
- Farkas, A., S. Marcella, et al. (2000). "Ethnic and racial differences in prostate cancer incidence and mortality." *Ethn Dis* 10(1): 69-75.
- Ferlay, J., D. M. Parkin, et al. "Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008." *Eur J Cancer* 46(4): 765-81.
- Ferrai, C., I. J. de Castro, et al. "Gene positioning." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2(6): a000588.
- Fra, A. M., E. Pasqualetto, et al. (2000). "Genomic organization and transcriptional analysis of the human genes coding for caveolin-1 and caveolin-2." *Gene* 243(1-2): 75-83.
- Friedman, J. M. and P. A. Jones (2009). "MicroRNAs: critical mediators of differentiation, development and disease." *Swiss Med Wkly* 139(33-34): 466-72.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, et al. (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." *Genome Res* 19(1): 92-105.
- Galarneau, A. and S. Richard (2005). "Target RNA motif and target mRNAs of the Quaking STAR protein." *Nat Struct Mol Biol* 12(8): 691-8.
- Gandellini, P., M. Folini, et al. (2009). "Towards the definition of prostate cancer-related microRNAs: where are we now?" *Trends Mol Med* 15(9): 381-90.
- Garcia, D. M., D. Baek, et al. "Weak seed-pairing stability and high target-site abundance decrease the proficiency of Isy-6 and other microRNAs." *Nat Struct Mol Biol* 18(10): 1139-46.
- Gardner, S., E. Stavrou, et al. "Targeting mediators of Wnt signalling pathways by GnRH in gonadotropes." *J Mol Endocrinol* 44(4): 195-201.
- Gilad, S., E. Meiri, et al. (2008). "Serum microRNAs are promising novel biomarkers." *PLoS One* 3(9): e3148.
- Gorlov, I. P., K. Sircar, et al. "Prioritizing genes associated with prostate cancer development." *BMC Cancer* 10: 599.
- Gudjonsson, T. and M. K. Magnusson (2005). "Stem cell biology and the cellular pathways of carcinogenesis." *APMIS* 113(11-12): 922-9.

- Guzzo, R. M., S. Sevinc, et al. (2004). "A novel isoform of sarcolemmal membrane-associated protein (SLMAP) is a component of the microtubule organizing centre." *J Cell Sci* 117(Pt 11): 2271-81.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-74.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." *Cell* 100(1): 57-70.
- Hao, J., C. Zhang, et al. "miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma." *Oncol Rep*.
- Harper, L. J., D. E. Costea, et al. "Normal and malignant epithelial cells with stem-like properties have an extended G2 cell cycle phase that is associated with apoptotic resistance." *BMC Cancer* 10: 166.
- Havens, M. A., A. A. Reich, et al. "Biogenesis of mammalian microRNAs by a non-canonical processing pathway." *Nucleic Acids Res*.
- Holcomb, I. N., D. I. Grove, et al. (2008). "Genomic alterations indicate tumor origin and varied metastatic potential of disseminated cells from prostate cancer patients." *Cancer Res* 68(14): 5599-608.
- Ho-Pun-Cheung, A., D. Cellier, et al. (2008). "[Considerations for normalisation of RT-qPCR in oncology]." *Ann Biol Clin (Paris)* 66(2): 121-9.
- Huelsken, J. and J. Behrens (2002). "The Wnt signalling pathway." *J Cell Sci* 115(Pt 21): 3977-8.
- Huntly, B. J. and D. G. Gilliland (2005). "Cancer biology: summing up cancer stem cells." *Nature* 435(7046): 1169-70.
- Hurt, E. M., B. T. Kawasaki, et al. (2008). "CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis." *Br J Cancer* 98(4): 756-65.
- Hwang, J. M., J. H. Lee, et al. "A Multi-Laboratory Profile of Mycoplasma Contamination in Lawsonia intracellularis Cultures." *BMC Res Notes* 5(1): 78.
- Hwang-Verslues, W. W., P. H. Chang, et al. "miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1." *Oncogene* 30(21): 2463-74.
- Jain, S., G. Chakraborty, et al. (2008). "Prostaglandin E2 regulates tumor angiogenesis in prostate cancer." *Cancer Res* 68(19): 7750-9.
- Jamieson, C. H., L. E. Ailles, et al. (2004). "Granulocyte-macrophage progenitors as candidate leukemic stem cells in blast-crisis CML." *N Engl J Med* 351(7): 657-67.
- Jeon, H. S. and J. Jen "TGF-beta signaling and the role of inhibitory Smads in non-small cell lung cancer." *J Thorac Oncol* 5(4): 417-9.
- Ke, X. S., Y. Qu, et al. (2008). "Epithelial to mesenchymal transition of a primary prostate cell line with switches of cell adhesion modules but without malignant transformation." *PLoS One* 3(10): e3368.
- Kharaishvili, G., D. Simkova, et al. "Wnt signaling in prostate development and carcinogenesis." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(1): 11-8.
- Kim, Y. J., S. J. Hwang, et al. (2009). "MiR-21 regulates adipogenic differentiation through the modulation of TGF-beta signaling in mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue." *Stem Cells* 27(12): 3093-102.
- Klarmann, G. J., E. M. Hurt, et al. (2009). "Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature." *Clin Exp Metastasis* 26(5): 433-46.

- Kondo, T. (2007). "Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines." *Cancer Biomark* 3(4-5): 245-50.
- Kral, M., V. Rosinska, et al. "Genetic determinants of prostate cancer: a review." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155(1): 3-9.
- Kucia, M. and M. Z. Ratajczak (2006). "Stem cells as a two edged sword--from regeneration to tumor formation." *J Physiol Pharmacol* 57 Suppl 7: 5-16.
- Kusenda, B., M. Mraz, et al. (2006). "MicroRNA biogenesis, functionality and cancer relevance." *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150(2): 205-15.
- Ladomery, M. R., D. G. Maddocks, et al. "MicroRNAs: their discovery, biogenesis, function and potential use as biomarkers in non-invasive prenatal diagnostics." *Int J Mol Epidemiol Genet* 2(3): 253-60.
- Langeberg, W. J., S. A. Tahir, et al. "Association of caveolin-1 and -2 genetic variants and post-treatment serum caveolin-1 with prostate cancer risk and outcomes." *Prostate* 70(9): 1020-35.
- Lapidot, T., C. Sirard, et al. (1994). "A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice." *Nature* 367(6464): 645-8.
- Lawrie, C. H., S. Gal, et al. (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma." *Br J Haematol* 141(5): 672-5.
- Leaf, C. (2004). "Why we're losing the war on cancer (and how to win it)." *Fortune* 149(6): 76-82, 84-6, 88 passim.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell* 75(5): 843-54.
- Leon, J., I. Guerrero, et al. (1987). "Differential expression of the *ras* gene family in mice." *Mol Cell Biol* 7(4): 1535-40.
- Leversha, M. A., J. Han, et al. (2009). "Fluorescence in situ hybridization analysis of circulating tumor cells in metastatic prostate cancer." *Clin Cancer Res* 15(6): 2091-7.
- Li, F., B. Tiede, et al. (2007). "Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis." *Cell Res* 17(1): 3-14.
- Li, J., C. Yen, et al. (1997). "PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer." *Science* 275(5308): 1943-7.
- Li, L. and W. B. Neaves (2006). "Normal stem cells and cancer stem cells: the niche matters." *Cancer Res* 66(9): 4553-7.
- Li, M., J. Li, et al. "microRNA and cancer." *AAPS J* 12(3): 309-17.
- Li, T., D. Li, et al. (2009). "MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells." *Biochem Biophys Res Commun* 383(3): 280-5.
- Li, Z., Z. Zhou, et al. (2008). "Expressing connexin 43 in breast cancer cells reduces their metastasis to lungs." *Clin Exp Metastasis* 25(8): 893-901.
- Liang, R., D. J. Bates, et al. (2009). "Epigenetic Control of MicroRNA Expression and Aging." *Curr Genomics* 10(3): 184-93.
- Liffers, S. T., A. Maghnoij, et al. "Keratin 23, a novel DPC4/Smad4 target gene which binds 14-3-3epsilon." *BMC Cancer* 11: 137.

- Little, M. P., H. A. Weiss, et al. (1999). "Risks of leukemia in Japanese atomic bomb survivors, in women treated for cervical cancer, and in patients treated for ankylosing spondylitis." *Radiat Res* 152(3): 280-92.
- Liu, C., K. Kelnar, et al. "The microRNA miR-34a inhibits prostate cancer stem cells and metastasis by directly repressing CD44." *Nat Med* 17(2): 211-5.
- Liu, J., M. Zheng, et al. "MicroRNAs, an active and versatile group in cancers." *Int J Oral Sci* 3(4): 165-75.
- Liu, S., G. Dontu, et al. (2005). "Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis." *Breast Cancer Res* 7(3): 86-95.
- Logothetis, C. J. and S. H. Lin (2005). "Osteoblasts in prostate cancer metastasis to bone." *Nat Rev Cancer* 5(1): 21-8.
- Louafi, F., R. T. Martinez-Nunez, et al. "MicroRNA-155 targets SMAD2 and modulates the response of macrophages to transforming growth factor- β ." *J Biol Chem* 285(53): 41328-36.
- Lu, J., G. Getz, et al. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." *Nature* 435(7043): 834-8.
- Macfarlane, L. A. and P. R. Murphy "MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer." *Curr Genomics* 11(7): 537-61.
- Maitland, N. J. and A. Collins (2005). "A tumour stem cell hypothesis for the origins of prostate cancer." *BJU Int* 96(9): 1219-23.
- Malhotra, G. K., X. Zhao, et al. "Shared signaling pathways in normal and breast cancer stem cells." *J Carcinog* 10: 38.
- Marotta, L. L. and K. Polyak (2009). "Cancer stem cells: a model in the making." *Curr Opin Genet Dev* 19(1): 44-50.
- Matzke, M., A. J. Matzke, et al. (2001). "RNA: guiding gene silencing." *Science* 293(5532): 1080-3.
- Meikle, A. W. and J. A. Smith, Jr. (1990). "Epidemiology of prostate cancer." *Urol Clin North Am* 17(4): 709-18.
- Mercatelli, N., V. Coppola, et al. (2008). "The inhibition of the highly expressed miR-221 and miR-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice." *PLoS One* 3(12): e4029.
- Mestdagh, P., A. K. Bostrom, et al. "The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF- β pathway in neuroblastoma." *Mol Cell* 40(5): 762-73.
- Metias, S. M., E. Lianidou, et al. (2009). "MicroRNAs in clinical oncology: at the crossroads between promises and problems." *J Clin Pathol* 62(9): 771-6.
- Min, H. and S. Yoon "Got target? Computational methods for microRNA target prediction and their extension." *Exp Mol Med* 42(4): 233-44.
- Miyata, Y., S. Kanda, et al. (2006). "Relationship between prostaglandin E2 receptors and clinicopathologic features in human prostate cancer tissue." *Urology* 68(6): 1360-5.
- Moore, N. and S. Lyle "Quiescent, slow-cycling stem cell populations in cancer: a review of the evidence and discussion of significance." *J Oncol* 2011.
- Murchison, E. P., J. F. Partridge, et al. (2005). "Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(34): 12135-40.

- Musiyenko, A., V. Bitko, et al. (2008). "Ectopic expression of miR-126*, an intronic product of the vascular endothelial EGF-like 7 gene, regulates prostein translation and invasiveness of prostate cancer LNCaP cells." *J Mol Med (Berl)* 86(3): 313-22.
- Palanisamy, N., B. Ateeq, et al. "Rearrangements of the RAF kinase pathway in prostate cancer, gastric cancer and melanoma." *Nat Med* 16(7): 793-8.
- Pang, Y., C. Y. Young, et al. "MicroRNAs and prostate cancer." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 42(6): 363-9.
- Papadopoulos, G. L., P. Alexiou, et al. (2009). "DIANA-mirPath: Integrating human and mouse microRNAs in pathways." *Bioinformatics* 25(15): 1991-3.
- Passegue, E., C. H. Jamieson, et al. (2003). "Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics?" *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11842-9.
- Polyak, K. and W. C. Hahn (2006). "Roots and stems: stem cells in cancer." *Nat Med* 12(3): 296-300.
- Raimondi, C., W. Gianni, et al. "Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: revisiting minimal residual disease." *Curr Cancer Drug Targets* 10(5): 496-508.
- Regenbrecht, C., Y. Welte, et al. (2008). "Molecular characterization of signalling pathways in cancer stem cells." *Eancermedalscience* 2: 115.
- Regenbrecht, C. R., H. Lehrach, et al. (2008). "Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors." *Stem Cell Rev* 4(4): 319-28.
- Reiss, M. (1999). "TGF-beta and cancer." *Microbes Infect* 1(15): 1327-47.
- Rhodes, D. R., J. Yu, et al. (2004). "ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform." *Neoplasia* 6(1): 1-6.
- Roberts, A. B. and L. M. Wakefield (2003). "The two faces of transforming growth factor beta in carcinogenesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(15): 8621-3.
- Rubio, D., J. Garcia-Castro, et al. (2005). "Spontaneous human adult stem cell transformation." *Cancer Res* 65(8): 3035-9.
- Schaefer, A., M. Jung, et al. "MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology." *Urol Oncol* 28(1): 4-13.
- Schaefer, A., M. Jung, et al. "Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer." *Exp Mol Med* 42(11): 749-58.
- Schatton, T., N. Y. Frank, et al. (2009). "Identification and targeting of cancer stem cells." *Bioessays* 31(10): 1038-49.
- Schroder, F. H. (2009). "PSA screening--a review of recent studies." *Eur J Cancer* 45 Suppl 1: 402-4.
- Shappell, S. B., G. V. Thomas, et al. (2004). "Prostate pathology of genetically engineered mice: definitions and classification. The consensus report from the Bar Harbor meeting of the Mouse Models of Human Cancer Consortium Prostate Pathology Committee." *Cancer Res* 64(6): 2270-305.
- Shen, M. M. and C. Abate-Shen "Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges." *Genes Dev* 24(18): 1967-2000.
- Shiota, M., A. Yokomizo, et al. "Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1alpha interacts with the androgen receptor (AR) and promotes prostate cancer cell growth by activating the AR." *Mol Endocrinol* 24(1): 114-27.

- Sibley, C. R., Y. Seow, et al. "The biogenesis and characterization of mammalian microRNAs of mirtron origin." *Nucleic Acids Res* 40(1): 438-48.
- Singh, S. K., I. D. Clarke, et al. (2003). "Identification of a cancer stem cell in human brain tumors." *Cancer Res* 63(18): 5821-8.
- Slater, T. F., B. Sawyer, et al. (1963). "Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts." *Biochim Biophys Acta* 77: 383-93.
- Smith, D. S., P. A. Humphrey, et al. (1997). "The early detection of prostate carcinoma with prostate specific antigen: the Washington University experience." *Cancer* 80(9): 1852-6.
- Sreekumar, R., B. S. Sayan, et al. "MicroRNA Control of Invasion and Metastasis Pathways." *Front Genet* 2: 58.
- Sugino, Y., A. Misawa, et al. (2007). "Epigenetic silencing of prostaglandin E receptor 2 (PTGER2) is associated with progression of neuroblastomas." *Oncogene* 26(53): 7401-13.
- Sun, Q., Y. Zhang, et al. (2008). "Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation." *Nucleic Acids Res* 36(8): 2690-9.
- Sun, T., Q. Wang, et al. (2009). "The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines." *Cancer Res* 69(8): 3356-63.
- Szatkowski, C., J. B. Parys, et al. "Inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ signalling is involved in estradiol-induced breast cancer epithelial cell growth." *Mol Cancer* 9: 156.
- Takamizawa, J., H. Konishi, et al. (2004). "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." *Cancer Res* 64(11): 3753-6.
- Tang, B., M. Vu, et al. (2003). "TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression." *J Clin Invest* 112(7): 1116-24.
- Tang, B., M. Vu, et al. (2003). "TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression." *J Clin Invest* 112(7): 1116-24.
- Tang, J., M. Hu, et al. (1999). "Primer mixture enhances PCR detection of Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell cultures." *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 35(1): 1-3.
- Taylor, B. S., N. Schultz, et al. "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." *Cancer Cell* 18(1): 11-22.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." *Gynecol Oncol* 110(1): 13-21.
- Tomlins, S. A., D. R. Rhodes, et al. (2008). "The role of SPINK1 in ETS rearrangement-negative prostate cancers." *Cancer Cell* 13(6): 519-28.
- Tsunoda, T., H. Koga, et al. (2005). "Inositol 1,4,5-trisphosphate (IP3) receptor type1 (IP3R1) modulates the acquisition of cisplatin resistance in bladder cancer cell lines." *Oncogene* 24(8): 1396-402.
- Turner, J. D., R. Williamson, et al. "The many roles of microRNAs in brain tumor biology." *Neurosurg Focus* 28(1): E3.
- Uma Devi, P. and M. Hossain (2000). "Induction of solid tumours in the Swiss albino mouse by low-dose foetal irradiation." *Int J Radiat Biol* 76(1): 95-9.

- Uphoff, C. C. and H. G. Drexler (1999). "Detection of mycoplasma contaminations in cell cultures by PCR analysis." *Hum Cell* 12(4): 229-36.
- Valadi, H., K. Ekstrom, et al. (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* 9(6): 654-9.
- Varambally, S., Q. Cao, et al. (2008). "Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer." *Science* 322(5908): 1695-9.
- Wang, D., C. Qiu, et al. "Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets." *PLoS One* 5(9).
- Wang, M., V. M. Berthoud, et al. (2007). "Connexin43 increases the sensitivity of prostate cancer cells to TNFalpha-induced apoptosis." *J Cell Sci* 120(Pt 2): 320-9.
- Wang, S., D. Yang, et al. (2003). "Targeting Bcl-2 and Bcl-XL with nonpeptidic small-molecule antagonists." *Semin Oncol* 30(5 Suppl 16): 133-42.
- Wang, W., M. Corrigan-Cummins, et al. "MicroRNA profiling of follicular lymphoma identifies microRNAs related to cell proliferation and tumor response." *Haematologica*.
- Wang, Y., Y. Kuramitsu, et al. "Differential expression of up-regulated cofilin-1 and down-regulated." *Oncol Rep* 26(6): 1595-9.
- Wang, Y. X., X. Y. Zhang, et al. "Initial study of microRNA expression profiles of colonic cancer without lymph node metastasis." *J Dig Dis* 11(1): 50-4.
- Weber, J. A., D. H. Baxter, et al. "The microRNA spectrum in 12 body fluids." *Clin Chem* 56(11): 1733-41.
- Wessels, J. M., A. K. Edwards, et al. "Selection and validation of reference genes for miRNA expression studies during porcine pregnancy." *PLoS One* 6(12): e28940.
- Wicha, M. S., S. Liu, et al. (2006). "Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift." *Cancer Res* 66(4): 1883-90; discussion 1895-6.
- Winter, J., S. Jung, et al. (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." *Nat Cell Biol* 11(3): 228-34.
- Witkos, T. M., E. Koscianska, et al. "Practical Aspects of microRNA Target Prediction." *Curr Mol Med* 11(2): 93-109.
- Witkos, T. M., E. Koscianska, et al. "Practical Aspects of microRNA Target Prediction." *Curr Mol Med* 11(2): 93-109.
- Witte, J. S. (2009). "Prostate cancer genomics: towards a new understanding." *Nat Rev Genet* 10(2): 77-82.
- Xu, H. T., Q. C. Li, et al. (2008). "Connexin 43 recruits E-cadherin expression and inhibits the malignant behaviour of lung cancer cells." *Folia Histochem Cytobiol* 46(3): 315-21.
- Yang, G., H. Fu, et al. "RNA-binding protein quaking, a critical regulator of colon epithelial differentiation and a suppressor of colon cancer." *Gastroenterology* 138(1): 231-40 e1-5.
- Yang, W., D. Y. Lee, et al. "The roles of microRNAs in tumorigenesis and angiogenesis." *Int J Physiol Pathophysiol Pharmacol* 3(2): 140-55.
- Yang, Z., L. Zhang, et al. "Transient mTOR inhibition facilitates continuous growth of liver tumors by modulating the maintenance of CD133+ cell populations." *PLoS One* 6(12): e28405.

- Yi, R., M. N. Poy, et al. (2008). "A skin microRNA promotes differentiation by repressing 'stemness'." *Nature* 452(7184): 225-9.
- Yin, D., S. Ogawa, et al. (2009). "High-resolution genomic copy number profiling of glioblastoma multiforme by single nucleotide polymorphism DNA microarray." *Mol Cancer Res* 7(5): 665-77.
- Yu, F., Y. Jiao, et al. "MicroRNA 34c gene down-regulation via DNA methylation promotes self-renewal and epithelial-mesenchymal transition in breast tumor-initiating cells." *J Biol Chem* 287(1): 465-73.
- Zhang, J., N. Luo, et al. "microRNA-150 inhibits human CD133-positive liver cancer stem cells through." *Int J Oncol* 40(3): 747-56.
- Zhang, J. S., L. Wang, et al. (2001). "Keratin 23 (K23), a novel acidic keratin, is highly induced by histone deacetylase inhibitors during differentiation of pancreatic cancer cells." *Genes Chromosomes Cancer* 30(2): 123-35.
- Zhang, K. Q., S. A. Salzman, et al. (2003). "Genetics of prostate cancer." *Clin Med Res* 1(1): 21-8.
- Zhang, M. and J. M. Rosen (2006). "Stem cells in the etiology and treatment of cancer." *Curr Opin Genet Dev* 16(1): 60-4.
- Zhang, Y., Y. Ba, et al. (2007). "PGC-1alpha induces apoptosis in human epithelial ovarian cancer cells through a PPARgamma-dependent pathway." *Cell Res* 17(4): 363-73.

ANEXO.