



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Universidad de la República

Facultad de Ciencias

Sección Genómica Funcional

Tesina de grado - Licenciatura en Bioquímica

Determinación de la función e impacto de vtARN2-1-5p en la biología del cáncer de próstata

Evangelina Coitiño Román

Tutor: Dr. Rafael Sebastián Fort

Agosto 2025

Agradecimientos

A Jimena e Inés por aceptar ser parte del tribunal, el tiempo dedicado y la corrección de este trabajo. Sus observaciones y comentarios son un aporte importante para mi desarrollo académico y para la calidad de este trabajo.

A Rafa, por haberme mostrado el mundo de los ARN no codificantes y contagiarme su pasión por la regulación génica. Gracias por acompañarme no solo con conocimientos académicos, sino también consejos, charlas y por ponerte en el lugar de un estudiante de grado, me hiciste sentir parte del laboratorio desde el día uno. Gracias por abrirme las puertas en la ciencia, animarme a presentar en congresos y darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio. No solo sos un gran científico, sino una gran persona que me alegra haber tenido de tutor.

A toda la Sección Genómica Funcional, por abrirme las puertas del laboratorio, brindarme siempre una mano cuando la necesité, hacerme sentir parte y acompañarme en esta etapa. Es un placer llegar a un lugar y sentirse tan cómoda con el grupo humano.

A mis amigas de la vida, que me acompañan desde el liceo y, como siempre, estuvieron presentes en esta etapa, son parte importante de este proceso. También tengo la suerte de agradecer al grupo enorme de amigos que me hice en Facultad, quienes hicieron el camino más fácil. Sé que son amistades que voy a guardar para siempre. Gracias a todos por ayudarme a estudiar y también por sacarme del estudio cuando era necesario.

A mi familia, que siempre me apoyó, aconsejó y me dio un lugar de estudio en cada rincón de Uruguay. Sobre todo a mi madre y mi padre, quienes me dieron las herramientas para que pudiera irme del interior a estudiar lo que yo más quería, incluso sin entender del todo de qué se trata. Gracias por confiar en mí más de lo que yo misma lo hacía.

A la Universidad de la República y a todas las instituciones públicas que me formaron desde que tenía 3 años: el jardín 104, la escuela 37 Canadá, el Liceo 2 y el IMO.

A mis mascotas Chiqui, Emma y Blanqui, que a veces preferían mimos en vez de dejarme estudiar, pero fueron la mejor compañía.

Índice

Índice	3
Abreviaturas	1
Resumen	3
Introducción	4
1. Cáncer.....	4
2. Proliferación.....	6
3. Apoptosis.....	7
4. Cáncer de próstata.....	8
4.1 La próstata.....	8
4.2 Cáncer de próstata y los factores de riesgo.....	10
4.3 Detección.....	11
4.4 Herencia genética.....	12
4.5 Tratamientos.....	14
5. ARNs no codificantes.....	15
5.1 micro ARNs.....	17
6. vaultARNs.....	21
7. vaultARN2-1, el fragmento vtARN2-1-3p/5p y su relación con el cáncer.....	25
Antecedentes	32
Hipótesis	35
Objetivos	35
Objetivo general.....	35
Objetivos específicos.....	35
Materiales y métodos	36
• Líneas celulares.....	36
• Medio de cultivo.....	37
• Mantenimiento celular.....	37
• Descomplementación de Suero Fetal Bovino.....	38
• Crioconservación celular.....	38
• Recuento en cámara de Neubauer.....	38
• Transfección celular.....	39
• Evaluación de la eficiencia de transfección.....	40
• Extracción de ARN.....	42
• Cuantificación del nivel de expresión de vtARN-1-5p y vtARN2-1-3p de las líneas celulares LNCaP, PC3, DU145 y RWPEI wild type.....	43
• Cuantificación del nivel de expresión de vtARN2-1-5p de las líneas celulares transfectadas con mimics.....	44
• Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT).....	45

● Ensayo de apoptosis celular.....	47
● Análisis de la actividad de los posibles genes blancos del vtARN2-1-5p.....	49
● Análisis estadístico.....	50
Resultados y discusión.....	51
● Extracción de ARN en líneas celulares de próstata.....	51
● Cuantificación del vtARN2-1-5p/3p en líneas celulares de cáncer de próstata.....	51
● Evaluación de la eficiencia de transfección.....	53
● Cuantificación del vtARN2-1-5p en líneas celulares transfectadas.....	56
● Evaluación de la viabilidad celular.....	58
● Evaluación de la apoptosis.....	60
● Búsqueda de blancos de vtARN2-1-5p.....	61
● Comparación metodológica con estudios previos.....	67
Conclusiones y perspectivas.....	71
Bibliografía.....	74

Abreviaturas

TNM	Sistema tumor, ganglio linfático, metástasis
DISC	Complejo de señalización que induce la muerte
BPH	Hiperplasia prostática benigna
PSA	Antígeno prostático específico
RA	Receptor de andrógeno
ADT	Terapia de privación de andrógenos
ARNnc	ARN no codificante
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transferencia
snoARN	ARN nucleolar pequeño
miARN	microARN
siARN	ARN interferente pequeño
snARN	ARN nuclear pequeño
piARN	ARN Piwi-interactuante
lncARN	ARN no codificante largo
ARNm	ARNs mensajeros
hnARN	ARN heterogéneo nuclear
Exp5	Exportina 5
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
MVP	Proteína mayor de vault
TEP1	Proteína 1 asociada a telomerasa
vtARN	vault ARNs
pol III	ARN polimerasa III

svtARN	vtARN pequeños
PKR	Proteína quinasa R
MFE	energía libre mínima
UTR	Región no traducida
SRA	Sequence Read Archive
GEO	Gene Expression Omnibus
PrEc	Células epiteliales de próstata
PrSC	Células estromales de próstata
FBS	Suero fetal bovino
ADNc	ADN copia
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio
PI	Yoduro de Propidio
qPCR	Reacción en Cadena de Polimerasa en Tiempo real
CT	Número de ciclo
Anex V	Anexina V
AGO	Argonauta

Resumen

En los últimos años, se ha reconocido cada vez más la importancia de las regiones no codificantes del genoma, tanto en el funcionamiento celular normal como en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más común entre los hombres, y la segunda causa principal de mortalidad relacionada con el cáncer a nivel mundial. La evidencia ha demostrado alteraciones en varios ARN no codificantes pequeños (sncARNs) en muestras de plasma y suero de pacientes con cáncer, lo que sugiere su potencial uso como biomarcadores diagnósticos y pronósticos. Los ARN Vault (vtARNs) son ARN no codificantes de tamaño mediano transcritos por la ARN polimerasa III. Se han identificado cuatro vtARNs humanos que forman parte de la partícula Vault (la ribonucleoproteína más grande descrita en células eucariotas), tres de los cuales (vtARN1-1/2/3) están ubicados en el cromosoma 5q31.3, mientras que vtARN2-1 es un homólogo más distante. Solo el 5% de los vtARNs se encuentra asociado a la partícula Vault, y la función de la fracción no unida a la partícula Vault permanece poco comprendida. El análisis de datos de secuenciación de sncARNs a partir de tejido prostático reveló que la expresión de vtARN2-1-5p incrementa en el cáncer de próstata y correlaciona con parámetros clínicos más desfavorables de la enfermedad. En este trabajo se evaluó, mediante RT-qPCR, la expresión del vtARN2-1-5p en líneas celulares de cáncer de próstata PC3, LNCaP, DU145 y en la línea no tumoral RWPE1. Se observó que DU145 presenta altos niveles endógenos del vtARN2-1-5p, mientras que en LNCaP y PC3 se encuentra epigenéticamente silenciado. Los ensayos de viabilidad celular (ensayos de MTT) mostraron que la sobreexpresión del vtARN2-1-5p (20nM, 5nM y 1nM) no afecta la viabilidad de las líneas celulares PC3, LNCaP y DU145. La evaluación de la apoptosis inducida por Docetaxel reveló que la sobreexpresión de vtARN2-1-5p no provoca cambios significativos en células LNCaP. Observamos que en PC3 la sobreexpresión de vtARN2-1-5p genera una leve protección (3%) frente a la muerte celular inducida por Docetaxel en el mimic control, pero no podemos afirmar que este cambio sea biológicamente significativo. Finalmente, se identificaron posibles genes blancos de vtARN2-1-5p involucrados en rutas relacionadas con la migración y diferenciación celular, lo que abre nuevas preguntas sobre su rol funcional y su posible implicancia en la biología del cáncer de próstata.

Introducción

1. Cáncer

El equilibrio entre la regeneración y la muerte celular es un mecanismo vital que garantiza el mantenimiento en el número de células, la homeostasis del cuerpo humano y la estabilidad de sus funciones biológicas. Este equilibrio está vinculado a la regulación de procesos como la diferenciación, la comunicación celular y la formación de tejidos complejos. Sin embargo, cuando se producen alteraciones en la regulación de estos mecanismos, puede dar lugar a células cancerosas. Se usa el término cáncer o neoplasia al grupo de enfermedades que presentan crecimiento anormal y sin control de las células de un tejido u órgano, llegando a formar masas de tejido llamado tumor o neoplasma que pueden ser benignos o malignos (Cooper, 2023). Los tumores malignos o también llamados tumores cancerosos crecen en patrones irregulares y tienen la capacidad de generar metástasis, un proceso donde las células se diferencian e invaden tejidos cercanos. Las células metastásicas pueden viajar a lugares distantes del cuerpo para generar nuevos tumores en otros tejidos. Los tumores benignos no generan metástasis, crecen de manera lenta y cuando son removidos usualmente no vuelven a aparecer (Cooper, 2023).

La correcta clasificación del cáncer es importante para conocer la gravedad y planificar el tratamiento. Los tumores también son clasificados según su origen celular, su grado de diferenciación, su estadio, entre otros. El grado del tumor se describe según la apariencia normal o anormal de las células cancerosas al microscopio óptico mediante tinciones específicas como tinciones histológicas e inmunohistoquímicas (“American Cancer Society”, 2023). Para esto es necesario realizar una biopsia donde se extirpa todo o una parte del tumor, al que se le asigna un grado numérico que varía según el grado de diferenciación. Si las células se ven bien diferenciadas (Grado 1) similares a la del tejido normal o indiferenciadas (Grado 4) cuando las células se ven anormales, esta escala puede variar dependiendo el tipo de cáncer, pero generalmente se utiliza la siguiente escala:

- Grado X: no es posible asignar un grado (grado indeterminado)
- Grado 1: bien diferenciado (grado bajo)
- Grado 2: moderadamente diferenciado (grado intermedio)
- Grado 3: poco diferenciado (grado alto)
- Grado 4: indiferenciado (grado alto)

Un grado menor nos indica que las células del tumor van a crecer más lentamente, mientras que los tumores indiferenciados van a crecer más rápido y van a ser más agresivos (“Grado del tumor”, 2022). Por otro lado, el estadio tumoral refiere a la extensión del cáncer, cuánto creció y si este se diseminó.

Para conocer el estadio se realizan radiografías y pruebas clínicas. El sistema de estadificación más utilizado es el sistema tumor, ganglio linfático, metástasis (TNM, por sus siglas en inglés), donde cada letra indica:

- T: indica el tamaño y la extensión del tumor (TX, T0-T4)
- N: es el número de ganglios linfáticos cercanos que son cancerosos. (NX, N0-N1)
- M: indica la presencia de metástasis. Esto significa que el cáncer se diseminó del tumor primario a otras partes del cuerpo. (MX, M0, M1)

Mientras más alto sea el número que acompaña a cada letra se trata de un peor pronóstico (“Estadificación del cáncer”, 2022). El cáncer se considera una enfermedad genética debido a que su desarrollo se debe, en gran medida, a la acumulación de mutaciones genéticas. Además, existen alteraciones en los mecanismos epigenéticos que resultan en una expresión génica anormal, resultando en la pérdida de la regulación de células normales (Hanahan & Weinberg, 2011; You & Jones, 2012). Se ha observado que todos los componentes de la maquinaria epigenética pueden estar modificados en el cáncer incluyendo la metilación del ADN, modificaciones de histonas, posición de los nucleosomas y la modulación de los ARNs no codificantes (Sharma

et al., 2010). La inestabilidad genómica hace que las células normales transicionen a tumorales progresivamente adquiriendo características distintivas conocidas como *hallmarks*, actualmente se identifican 14 *hallmarks* entre ellas se encuentra: mantenimiento de señales proliferativas, evasión de supresores del crecimiento, resistencia a la muerte celular, capacidad de replicación inmortal, inducción de la angiogénesis, activación de la invasión y metástasis, reprogramación del metabolismo energético y evasión de la destrucción inmunitaria ([fig. 1](#)) (Hanahan, 2022; Hanahan & Weinberg, 2011).

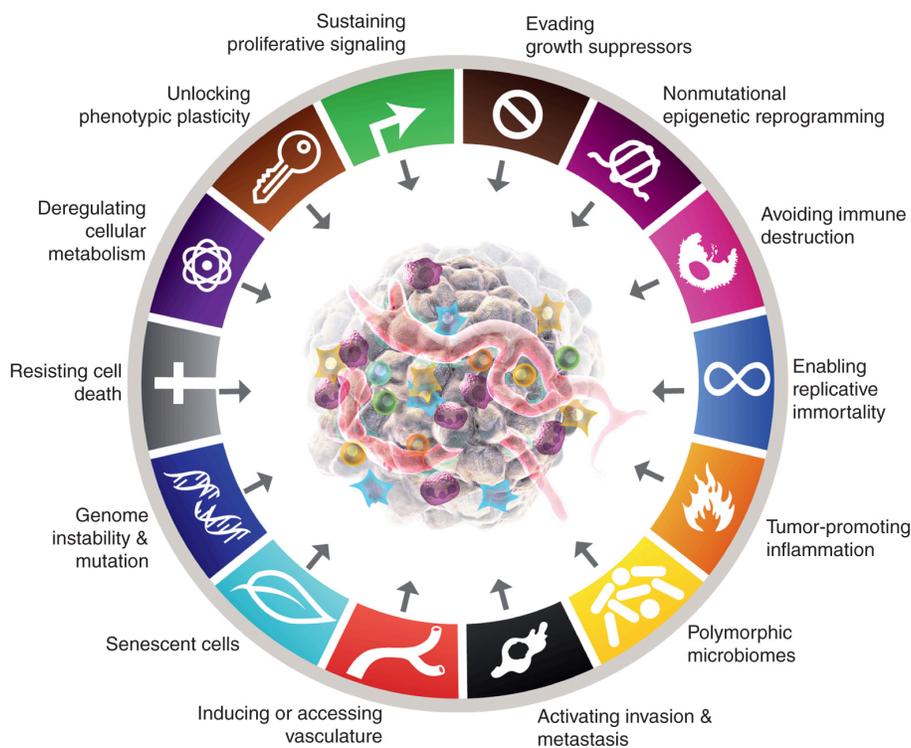


Figura 1. Hallmarks del cáncer. Se observan las 10 características distintivas adquiridas por las células cancerígenas al diferenciarse. Imagen modificada de Hanahan, 2022.

2. Proliferación

Como se mencionó anteriormente la desregulación de la proliferación y la inhibición de la apoptosis son procesos claves para el desarrollo tumoral, por lo que representan dos blancos terapéuticos clave para el tratamiento contra el cáncer. El aumento de la

proliferación en los tumores deriva en cambios en las rutas fundamentales encargadas de regular la proliferación y la supervivencia celular, lo que deriva en un crecimiento celular descontrolado más allá de los límites del tejido (Evan & Vousden, 2001). La manera que tienen las células cancerosas de mantener activa la señalización proliferativa es variada. Un mecanismo utilizado es producir ligandos que son factores de crecimiento que se unen a receptores específicos que emiten señales a través de rutas de señalización intracelular que regulan el crecimiento celular, lo que resulta en una estimulación autocrina. Por otro lado, la proliferación también es afectada por el microambiente tumoral que incluye la matriz extracelular, el sistema vascular, células inflamatorias y células normales presentes en el estroma que pueden producir y liberar factores de crecimiento que beneficien las células cancerosas. También puede aumentar la expresión de los receptores específicos para factores de crecimiento, generar variaciones que cambien la afinidad por los factores o alteraciones en el receptor que facilita su activación de forma independiente a los ligandos específicos (Bhowmick et al., 2004; Hanahan & Weinberg, 2011).

3. Apoptosis

Las células cancerígenas presentan mutaciones no solo en genes que promueven la proliferación descontrolada, sino también en aquellos que regulan la apoptosis, alterando así los mecanismos responsables de la muerte celular programada. Algunas mutaciones le brindan a la célula resistencia a la apoptosis, lo que, sumado a la proliferación descontrolada derivan en el avance del tumor. Por otro lado, hay evidencia de que la apoptosis es promovida en respuesta al estrés fisiológico que las células cancerígenas experimentan durante la tumorigénesis o como resultado de terapias. Muchos de los tratamientos oncológicos utilizados dependen de la inducción de la apoptosis en las células tumorales. Es por esto, que resulta importante comprender las vías moleculares por las cuales las células evaden dicho proceso, ya que las mismas mutaciones que suprimen la apoptosis también pueden reducir la sensibilidad a los tratamientos (Hanahan & Weinberg, 2011; Lowe & Lin, 2000).

Podemos mencionar dos programas que desencadenan la apoptosis: la vía intrínseca y la extrínseca. La vía intrínseca integra señales de origen intracelular que le dan a la célula la señal de supervivencia y la apoptosis ocurre cuando las proteínas proapoptóticas Bax/Bak superan en concentración a las proteínas antiapoptóticas. Esto da lugar a la permeabilización de la mitocondria para liberar factores proapoptóticos que resultan en la activación de una cascada de caspasas. Estas últimas, culminaran clivando proteínas y ADN generando así la muerte celular. Por el contrario, la vía extrínseca recibe y procesa señales extracelulares que inducen la muerte celular programada a través de receptores como Fas/CD95 y TNFR. Cuando estos receptores son activados por sus respectivos ligandos se forma el “complejo de señalización que induce la muerte” (DISC por sus siglas en inglés) que activa caspasas (Hanahan & Weinberg, 2011; Lowe et al., 2004).

En la mayoría de los cánceres, la habilidad de sobrevivir a la apoptosis está dada, en parte, por la inhibición de la vía de p53. P53 es un factor de transcripción que promueven programas de apoptosis, senescencia y reparación en respuesta al estrés celular, ya sea por daño al ADN, hipoxia y privación de nutrientes. Su inhibición puede estar dada ya sea por mutaciones inactivantes en el gen p53, alteraciones en las vías de señalización que activan p53 ante el estrés, o fallas en los mediadores posteriores de la apoptosis inducida por p53. Se ha visto que la reintroducción de su función puede inducir apoptosis en muchas células tumorales, lo que ha motivado investigaciones sobre estrategias terapéuticas que involucren a este gen (Lowe et al., 2004; Woods & Vousden, 2001).

4. Cancer de prostata

4.1 La próstata

La próstata es una glándula pequeña ubicada en la pelvis masculina, debajo de la vejiga y frente del recto ([fig. 2](#)). Está formada por tejido conectivo y glandular y rodeado por láminas de membrana fibrosas denominadas fascias, en las cuales se encuentran arterias, venas y fibras nerviosas. La próstata forma parte del sistema urinario y

reproductor, rodea el primer segmento de la uretra y está en contacto con conductos deferentes y vesículas seminales. La próstata aporta líquido adicional al semen que contiene enzimas, zinc y ácido cítrico que ayudan a nutrir los espermatozoides, lubricar la uretra y facilitar la expulsión del semen durante el orgasmo (Tzelves et al., 2022).

Las dos afecciones benignas más comunes de la próstata son la inflamación, conocida como prostatitis y la hiperplasia prostática benigna (BPH por sus siglas en inglés). La prostatitis afecta principalmente a hombres de mediana edad, mientras que el BPH se presenta en hombres de edad avanzada. Ambas afecciones están relacionadas con un mayor riesgo de cáncer de próstata (L. Zhang et al., 2020).

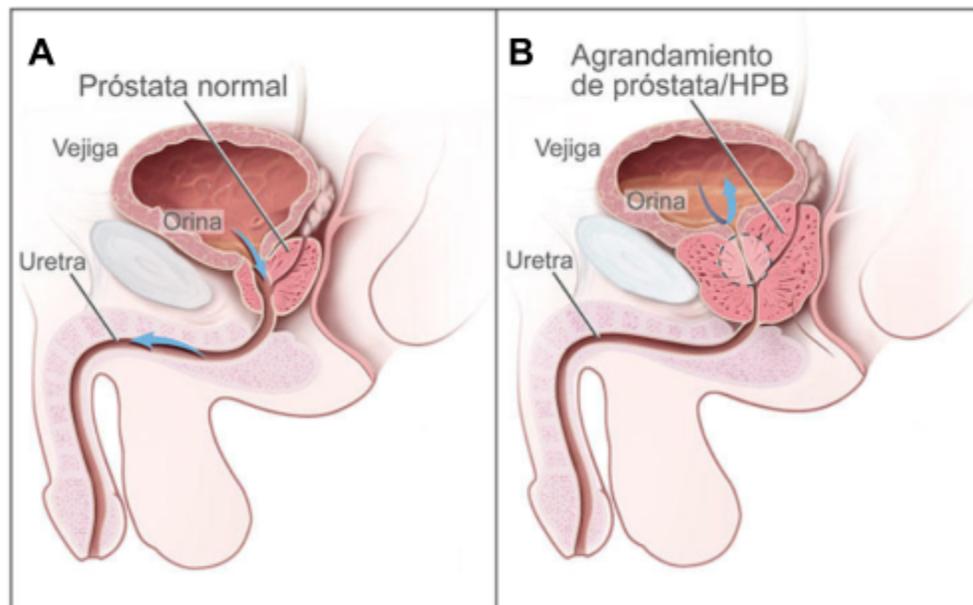


Figura 2. Anatomía del sistema urinario masculino, destacando la ubicación, forma y tamaño de la glándula prostática, ubicada debajo de la vejiga y rodeando la uretra. (A) Próstata normal. (B) Próstata con prostatitis/HPB. Imagen extraída de “Instituto Nacional del Cáncer (NIH)”, 2024.

4.2 Cáncer de próstata y los factores de riesgo

El cáncer de próstata es el tipo de cáncer más frecuente en hombres y la segunda causa más común de muerte por cáncer en esta población (Ferlay et al., 2019). Es una enfermedad multifactorial en la que influyen tanto factores ambientales como predisposición genética, esta última juega un papel clave en su desarrollo (Kral et al., 2011).

En Uruguay, el cáncer de próstata es el tumor más frecuente en hombres, con un promedio de 1500 nuevos casos diagnosticados por año y alrededor de 570 muertes anuales. Se posiciona como la tercera causa de muerte por cáncer en hombres, después del cáncer de pulmón y colon (“Sociedad de Oncología Médica y Pediátrica del Uruguay”, 2024).

Entre los factores ambientales asociados al cáncer de próstata se incluye el consumo de grasa animal, alcohol y tabaco, la obesidad, la vasectomía, el uso de ciertos medicamentos, la ingesta de vitamina D y E, algunos minerales y la actividad sexual. Sin embargo, los principales factores de riesgo son la edad avanzada y los antecedentes familiares de la enfermedad.

El cáncer de próstata puede dividirse en 3 grupos: esporádico, familiar y hereditario. Más del 85% de los casos son esporádicos, ocurren en hombres sin antecedentes familiares de la enfermedad. El cáncer de próstata familiar afecta a dos o más hombres en una familia, mientras que el hereditario se define por la presencia de la enfermedad en tres generaciones consecutivas o en al menos dos hombres menores de 55 años. Sumado a esto, hombres africanos presentan un mayor riesgo de tener cáncer de próstata en comparación con hombres blancos que viven en la misma área. Posiblemente, esto se debe a variaciones en genes como el receptor de andrógenos, aunque no se descarta las condiciones ambientales como migración o dietas alimentarias como factores contribuyentes (“Cancer Statistics Explorer Network”, 2024; Kral et al., 2011).

4.3 Detección

Inicialmente, la detección del cáncer de próstata se realizaba mediante el examen rectal digital. Sin embargo, este método es altamente variable entre examinadores y, en la mayoría de los casos, los tumores detectados ya se encuentran en etapas avanzadas.

Desde la década de 1980, se ha utilizado la medición del antígeno prostático específico (PSA), una glicoproteína secretada por las células epiteliales de la glándula prostática. Se considera anormal un valor superior a 4 ng/mL de PSA en sangre, aunque esta prueba puede dar falsos positivos, ya que un aumento de PSA también puede estar asociado a otras afecciones como BPH o prostatitis. Asimismo, un valor normal de PSA no garantiza la ausencia de cáncer de próstata (Chodak et al., 1989; Thompson et al., 2004).

Los valores anormales de PSA suelen derivar en la realización de una biopsia para confirmar la presencia de cáncer. La biopsia puede llevarse a cabo mediante una punción a través de la piel entre el ano y el escroto o mediante una biopsia transrectal a través de la pared rectal. Para localizar la glándula prostática, se emplean técnicas de imágenes de resonancia magnética o ultrasonido transrectal. Sin embargo, la biopsia puede conllevar complicaciones como síntomas del tracto urinario inferior, hematuria, disfunción eréctil, sangrado rectal y hematospermia, entre otros (Sekhoacha et al., 2022). A raíz de la biopsia, se puede determinar el Gleason Score, un sistema de clasificación histológica que mide e informa la agresividad del cáncer de próstata. Los grados de Gleason van del 1 al 5, donde 1 corresponde a células de cáncer de próstata más diferenciadas y 5 a células menos diferenciadas. A cada tumor se le asigna un grado de Gleason primario (el más prevalente) y uno secundario (el segundo más prevalente). La suma de estos dos grados da como resultado el Gleason Score del tumor.

Un gleason score menor o igual a 6 indica tumores con histología bien diferenciada, un puntaje de 7 refleja una diferenciación intermedia y una puntuación de 8 a 10 indica poca diferenciación de las células, lo que se asocia con un peor pronóstico. En 2014, la Sociedad Internacional de Patología Urológica propuso un sistema basado en de grupos de riesgo en lugar del Gleason score con el objetivo de mejorar la comunicación del riesgo tanto para pacientes como para médicos (Brawley et al., 2018; Woodfield et al., 2010). Los grupos se establecieron de la siguiente manera:

- Grupo 1: Gleason score ≤ 6
- Grupo 2: Gleason score 7 (3 + 4)
- Grupo 3: Gleason score 7 (4 + 3)
- Grupo 4: Gleason score 8
- Grupo 5: Gleason score 9 o 10

4.4 Herencia genética

Se han identificado mutaciones específicas en genes asociados al cáncer de próstata hereditario, y se ha observado que los pacientes que presentan estas mutaciones tienen mayor riesgo de desarrollar la enfermedad (Wen et al., 2015). En la evaluación genética de la herencia, se emplea la secuenciación de múltiples genes de hombres diagnosticados con cáncer de próstata, así como en aquellos con alto riesgo de padecerlo.

Algunos de los genes más utilizados como biomarcadores para el cáncer de próstata son los genes de BRCA, genes de HOX, genes de ATM y RNasa L. En la [tabla 1](#) se describen sus funciones y su utilidad como diagnóstico, pronóstico o predicción de la enfermedad.

Tabla 1. Genes de cáncer de próstata usadas como biomarcadores para la enfermedad, extraído de Sekhoacha et al., 2022.

Gen	Función	Diagnóstico, pronóstico o predictivo
Genes BRCA	Las mutaciones en la familia de genes BRCA inhiben la reparación del ADN.	Diagnóstico y predictivo
genes HOX	Mutaciones en estos genes se correlacionan con un mayor riesgo de cáncer de próstata agresivo y de aparición temprana	Predictivo
Genes ATM	Las mutaciones en la línea germinal en ATM están asociadas con metástasis temprana y una menor tasa de supervivencia.	Pronóstico
RNAse L	Las mutaciones pueden inactivar este gen, impidiendo su transcripción y su función protectora	Predictivo

El cáncer de próstata puede clasificarse como sensible a andrógeno o insensible a andrógenos, lo que indica el grado de estimulación por testosterona y proporciona información clave para la selección del tratamiento. El receptor de andrógeno (RA) desempeña un papel importante en el desarrollo, la actividad y la homeostasis de la glándula prostática, ya que regula la transcripción de genes mediante la unión de elementos a genes específicos en respuesta a los andrógenos. Sin embargo, mutaciones en el RA alteran su función, provocando un cambio en la transcripción de genes que favorecen la diferenciación celular e inducen una proliferación descontrolada. La primera línea celular donde se reportaron mutaciones en el RA fue

en LNCaP una línea celular sensible a andrógenos. En cáncer de próstata localizado mutaciones en el RA son más difíciles de encontrar (entre un 1%) mientras que están presentes en un 30-40% en metástasis o en cáncer de próstata resistente a terapia hormonal. Esto ha llevado al uso de la terapia de privación de andrógenos (ADT) y de la terapia antihormonal en el tratamiento del cáncer de próstata avanzado (Kral et al., 2011; Sekhoacha et al., 2022; Zhou et al., 2015).

4.5 Tratamientos

Dependiendo de los factores de pronóstico, como los niveles de PSA, el estadio clínico TNM, la puntuación de Gleason y otros factores como la edad, se define el tratamiento más adecuado para cada paciente con cáncer de próstata. Los tratamientos más comunes incluyen la vigilancia activa, quimioterapia, radioterapia, terapia hormonal, cirugía y crioterapia. Cada uno de ellos presenta efectos secundarios asociados, como toxicidad, reducción del recuento de glóbulos blancos y rojos, pérdida de cabello, neuropatía periférica, incontinencia, disfunción eréctil, metástasis y desarrollo de resistencia al tratamiento inicial (Sekhoacha et al., 2022).

La vigilancia activa es un programa estructurado que emplea el monitoreo continuo y la intervención diferida como estrategias principales (Choo et al., 2002). Se recomienda en pacientes con cáncer de bajo riesgo o con una esperanza de vida corta. Esta técnica se utiliza en tumores localizados. Presenta ciertas desventajas, como el riesgo de la progresión tumoral antes del inicio del tratamiento generando la necesidad de terapias más complejas con efectos secundarios (Costello, 2020; Sekhoacha et al., 2022).

La prostatectomía radical consiste en la extirpación quirúrgica de la glándula prostática mediante cirugía abierta o laparoscópica. Se indica en pacientes con cáncer de próstata localizado, sin evidencia de metástasis y que hayan recibido previamente radioterapia, quimioterapia o crioterapia (Brawley et al., 2018).

La terapia hormonal o terapia de privación de andrógenos, se utiliza en casos de cáncer de próstata avanzado o metastásico. Su mecanismo de acción consiste en bloquear la producción de testosterona y otras hormonas masculinas, previniendo que las células cancerosas sigan proliferando. Esto puede lograrse de dos maneras, mediante una orquiectomía (extirpación de los testículos) o por administración de análogos o antagonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (Crawford et al., 2015).

La quimioterapia usa fármacos antineoplásicos para eliminar o inhibir el crecimiento de las células cancerosas. El agente más utilizado en el tratamiento de cáncer de próstata es el docetaxel (Taxotere), un antimicrotubular que se une a la β -tubulina, inhibiendo la despolarización de los microtúbulos, bloqueando la mitosis, lo que induce la apoptosis (Zhu et al., 2013).

Por último, se utiliza la terapia combinada como estrategia de tratamiento, ya que aumenta la esperanza de vida del paciente y permite una supresión más efectiva del tumor. Un ejemplo de terapia combinada es la utilización de terapia hormonal y radioterapia o quimioterapia en estadios metastásicos (Iwamoto et al., 2022).

5. ARNs no codificantes

Las secuencias más estudiadas del genoma humano son aquellas que codifican proteínas; sin embargo, estas representan sólo alrededor del 2% de todo el genoma. Durante muchos años, el 98% restante fue considerado como “ADN basura”. En el año 2012 el proyecto ENCODE (Enciclopedia de Elementos del ADN) profundizó en esta porción del ADN en profundidad, revelándose que al menos el 80% del genoma humano presenta alguna actividad biológica (Romano et al., 2017).

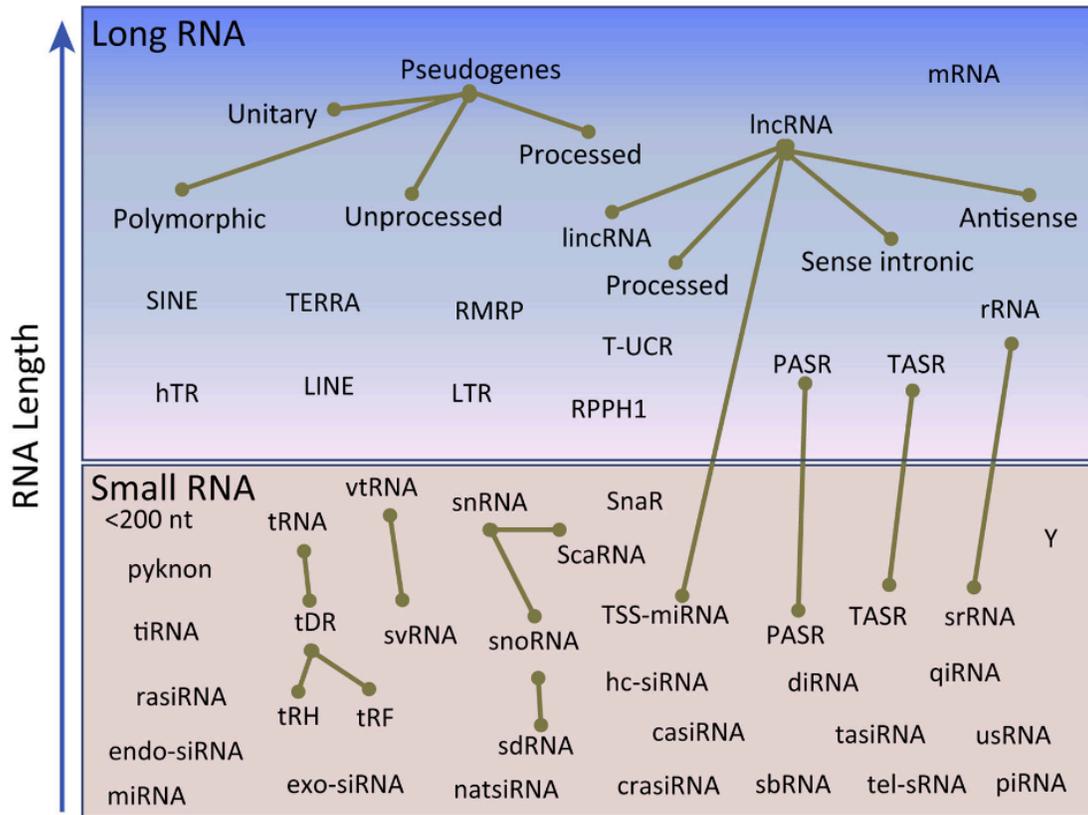
Este supuesto “ADN basura” está formado por elementos reguladores en cis/trans, intrones, pseudogenes, secuencias repetidas, telomeros y una porción que se transcribe como ARN no codificante (ARNnc) (Palazzo & Lee, 2015; Romano et al., 2017).

Dentro de los ARNnc, los más abundantes son el ARN ribosomal (ARNr) y el ARN de transferencia (ARNt), seguidos en menor proporción por otros tipos como el ARN nucleolar pequeño (snoARN), microARN, (miARN), ARN interferente pequeño (siARN), ARN nuclear pequeño (snARN), ARN Piwi-interactuante (piARN) y ARN no codificante largo (lncARN) ([tabla 2](#)).

Se estima que alrededor del 98% del ARN total en las células de mamíferos corresponde a ARN no codificante (Palazzo & Lee, 2015). Estos ARNs pueden clasificarse por su tamaño en ARNnc pequeños, con menos de 200 nucleótidos y ARNnc largos con 200 nucleótidos o más ([fig. 3](#)). También se pueden clasificar según su función, como ARNnc de mantenimiento como ARNr y ARNt o reguladores como miARN, piARN y lncARN (Vickers et al., 2015).

Tabla 2. Porcentaje de expresión estimada de distintos ARNs en una célula de mamífero. Adaptado de Palazzo & Lee, 2015.

ARN no codificante	Porcentaje de expresión en células de mamífero
ARNr	8,9%
ARNt	89%
ARNm	0,9%
hnARN	0,01%
ARN circular	0,02%
snARN	0,44%
snoARN	0,37%
miARN	0,30%
lncARN	0,04%



TiBS

Figura 3. Clasificación general de los ARNnc según su tamaño. En la parte superior se ubican los ARNnc largos (>200 nucleótidos), mientras que en la inferior se encuentran los ARNnc pequeños (<200 nucleótidos). Las líneas doradas indican ARNnc más pequeños que derivan de ARNs más largos. Extraído de Vickers et al., 2015.

5.1 micro ARNs

Los ARNnc más estudiados son los miARNs, los cuales median el silenciamiento post-transcripcional de genes al regular la traducción de los ARNs mensajeros (ARNm) a proteínas, mediante la degradación del ARNm o inhibiendo su traducción (Lin & Gregor, 2004). Se estima que los miARNs regulan la transcripción de más del 60% de los ARNm, participando en procesos como la proliferación celular, apoptosis y desarrollo (Lin & Gregor, 2004).

La biogénesis de los miARNs está dividida en dos etapas principales, catalizadas por dos enzimas RNAsas-III, Drosha y Dicer. Ambas enzimas son endonucleasas específicas de ARN doble cadena.

El miARN se sintetiza como un pri-miARN. La enzima Drosha está localizada predominantemente en el núcleo, escinde el pri-miARN para formar un pre-miARN de aproximadamente 70 pares de bases, el cual es exportado del núcleo al citoplasma por la Exportina 5 (Exp5), un transportador dependiente de Ran-GTP. En el citoplasma, el pre-miARN es nuevamente procesado pero esta vez por la enzima Dicer, que genera un ARN doble hebra compuesto por el miARN maduro y su hebra complementaria (Y. Lee et al., 2003). Dicer también facilita la transferencia de este ARN doble hebra al complejo proteico Argonauta, formando el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés). Dentro de RISC, se selecciona y retiene la hebra madura, que dirigirá el complejo a su gen blanco ([fig. 4](#)) (Lin & Gregor, 2004; Romano et al., 2017).

La hebra de miARN que se incorpora al complejo RISC es aquella con el extremo 5' más inestable. Al escindir el pre-miARN, Dicer genera dos hebras cuyo extremo 5' presenta diferente estabilidad. La hebra cuya región 5' está menos apareada a su hebra complementaria es la seleccionada como miARN maduro e incorporada al complejo RISC, mientras que la otra hebra es generalmente degradada (Lin & Gregor, 2004; Romano et al., 2017). Sin embargo, en los casos en que ambas hebras presentan estabilidad similar en el extremo 5', ambas tienen la misma probabilidad de incorporarse al RISC (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003).

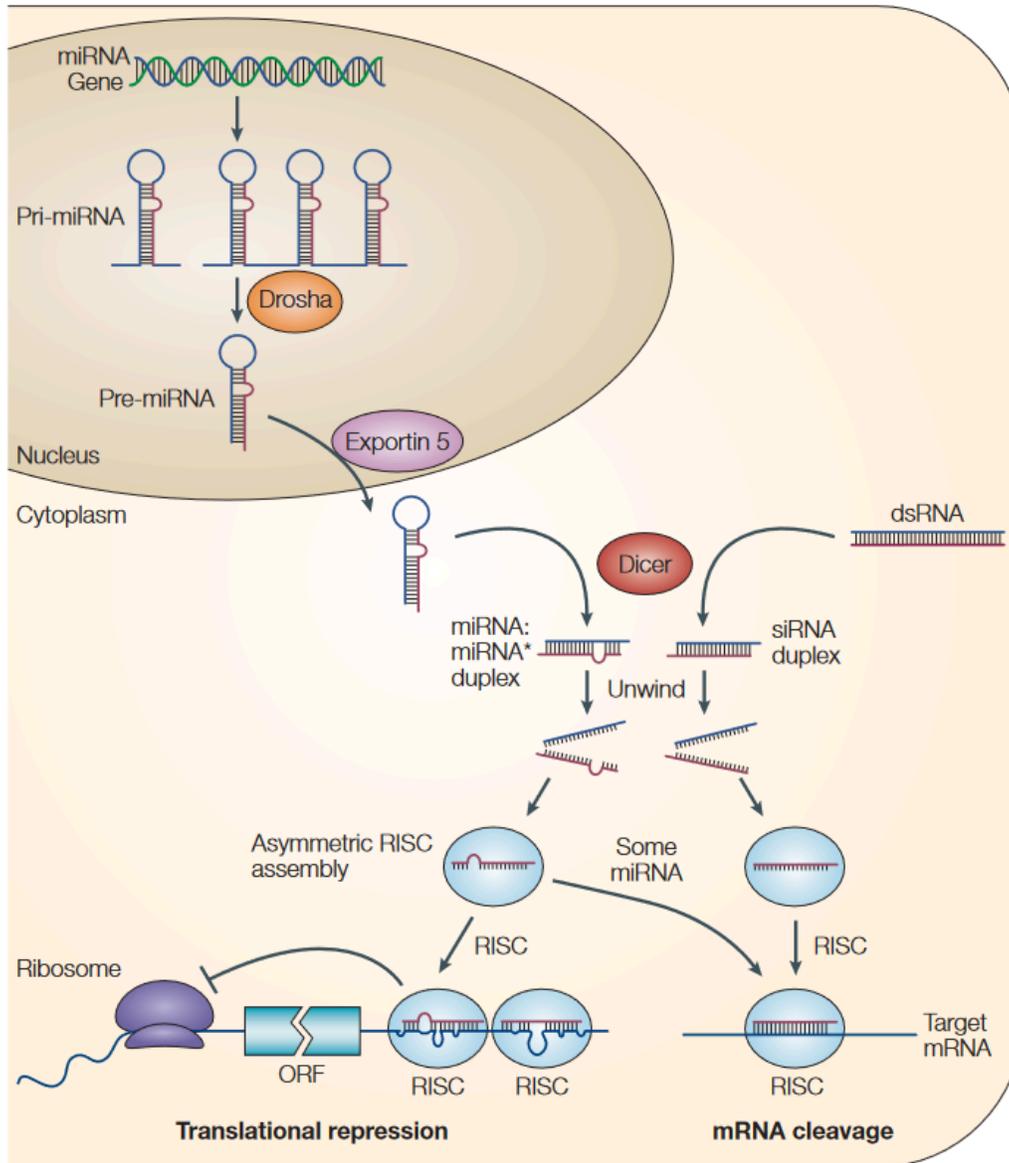


Figura 4. Ilustración representativa de la biogénesis y silenciamiento postranscripcional de miARN y siARN. Los genes de miARN se transcriben como Pri-miARN y son procesados a pre-miARN de aproximadamente 70 nucleótidos por Drosha, dentro del núcleo. Los pre-miARN son transportados al citoplasma por Exportin 5 donde son procesados por Dicer generando el miARN maduro (miARN) en dúplex con su hebra complementaria (miARN*). Dicer también procesa moléculas largas de dsARN en dúplex formando siARN. Solo una hebra del dúplex miARN:miARN* se carga en el complejo RISC y se dirige a su ARNm blanco para silenciarlo. Imagen extraída de Lin & Gregor, 2004.

El reconocimiento del ARNm blanco se da a través de apareamiento Watson-Crick entre la secuencia semilla del miARN, que está en los nucleótidos 2-8 (desde el extremo 5' del miARN), y el sitio dentro del 3'UTR de los ARNm blancos ([fig. 5](#)) (Bartel, 2018; Romano et al., 2017).

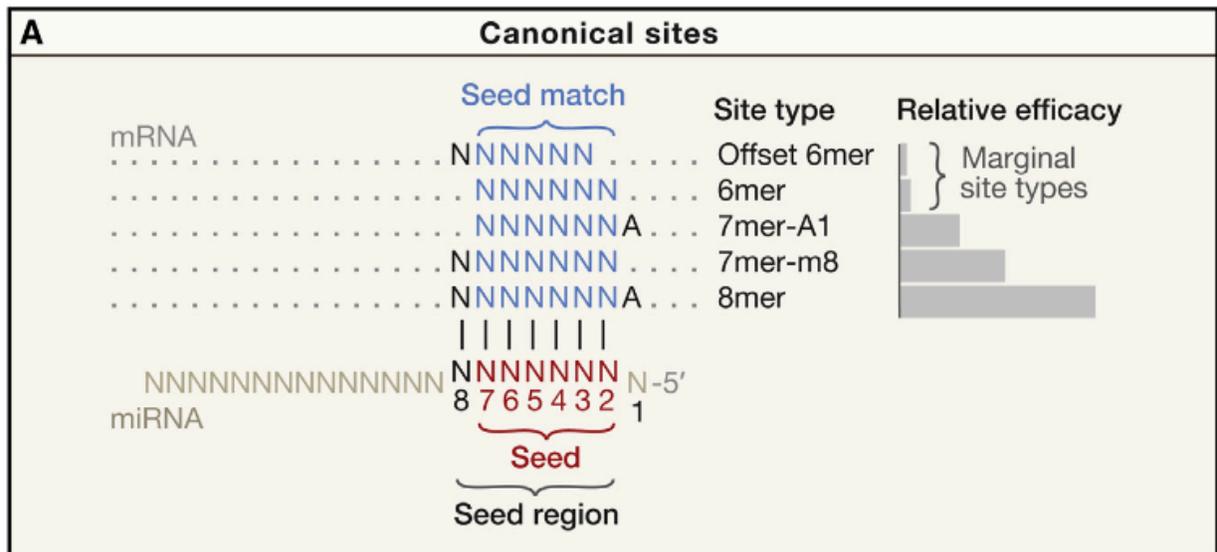


Figura 5. Sitios canónicos blanco de miARN en mamíferos. Estos sitios están formados por pares de bases Watson-Crick con la región semilla del miARN (posiciones 2 a 8 desde el extremo 5'). Los sitios canónicos más eficaces son los que presentan un apareamiento completo de 7 u 8 nucleótidos con la semilla, mientras que los sitios de 6 nucleótidos muestran una eficiencia menor. Imagen extraída de Bartel, 2018.

Actualmente, se reconoce que los miARNs desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del cáncer. El primer reporte que evidenció una desregulación de miARNs en cáncer fue el descubrimiento de que el cluster miR15a/16-1 se encuentra frecuentemente eliminado en leucemia linfocítica crónica, lo que demostró que ambos miARNs tienen actividad tumor supresora (Calin et al., 2002). A partir de este hallazgo inicial, se han reportado múltiples miARNs desregulados en distintos estadios y tipos de cáncer, algunos de ellos reprimidos en comparación con tejido normal (función tumor supresora) y otros sobreexpresión, ejerciendo funciones oncogénicas (Acunzo et al., 2015).

Uno de los mecanismos implicados en la desregulación de los miARNs en el cáncer es la alteración de la expresión o función de las enzimas involucradas en su biogénesis, como Drosha y Dicer. Asimismo, modificaciones epigenéticas en los promotores de los genes que codifican miARNs también pueden afectar su nivel de expresión. Dado que la pérdida del gen p53 es una de las alteraciones genéticas más comunes en el cáncer, se ha observado que su pérdida está asociada con la regulación transcripcional de ciertos miARNs. Específicamente, la pérdida de p53 induce la disminución de la expresión de ciertos miARNs vinculados en procesos como la apoptosis y la senescencia celular (Acunzo et al., 2015).

6. vaultARNs

La ribonucleoproteína vault es una partícula de gran tamaño con forma de barril simétrico y un peso molecular aproximado de 13 MDa ([fig. 6](#)). Está formada por 78 o 96 copias de la proteína mayor de vault (MVP, por sus siglas en inglés), junto con proteínas adicionales como proteína 1 asociada a telomerasa (TEP1) y poli (ADP-ribosa) polimerasa de vault vPARP (Anderson et al., 2007; Taube et al., 2024). Además, menos del 5% de la masa total de la partícula vault corresponde a ARNnc pequeños, conocidos como vault ARNs (vtARNs) (Stadler et al., 2009). Estas partículas se localizan principalmente en el citoplasma, aunque también se han observado en la membrana nuclear o próximo al complejo del poro nuclear (Stadler et al., 2009). La partícula vault está altamente conservada en eucariotas, incluyendo mamíferos, anfibios, aves e incluso en el eucariota inferior *Dictyostelium discoideum*. Su amplia conservación y distribución sugiere una función esencial en la célula eucariota, a pesar de que aún no se ha logrado dilucidar por completo (Kedersha et al., 1990).

Los vtARNs se consideraban originalmente asociados exclusivamente al complejo vault; sin embargo, estudios posteriores demostraron que menos del 5% del total de vtARNs se encuentran unido a la partícula vault. La mayoría de los vtARNs están libres en el citoplasma. En el genoma humano encontramos tres parálogos ubicados en el locus vtARN-1 del cromosoma 5q31 (vtARN1-1, vtARN1-2, vtARN1-3) y un cuarto

transcrito, inicialmente clasificado como precursor de miARN (pre-mir-886), pero posteriormente reclasificado como vtARN2-1 debido a su similitud de estructura primaria y secundaria (Stadler et al., 2009). Este último se localiza en un segundo locus independiente (Gallo et al., 2022; Taube et al., 2024).

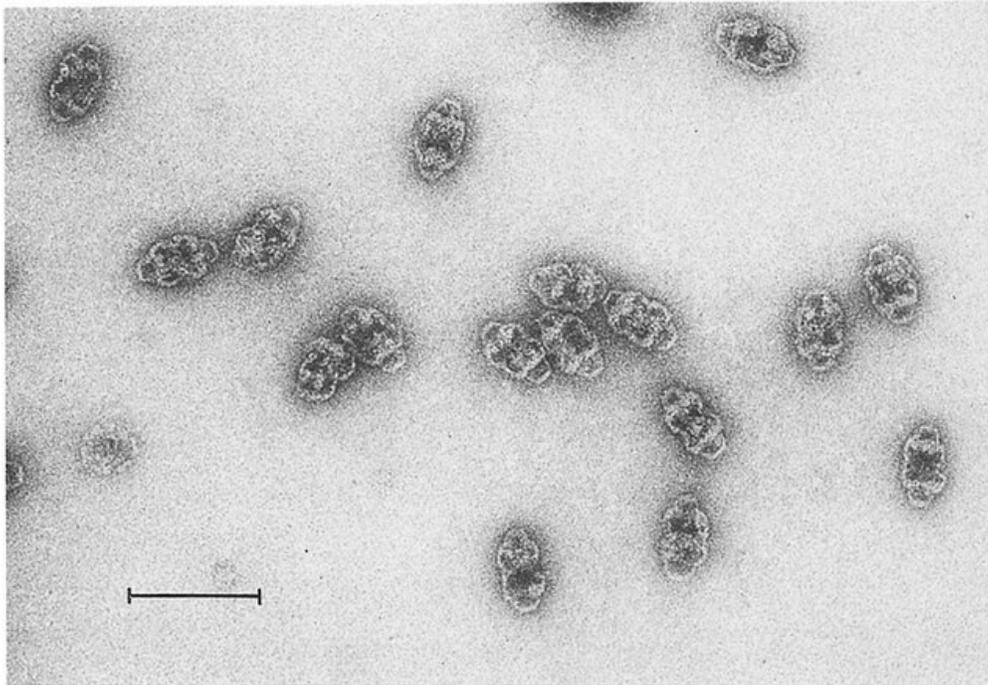


Figura 6. Micrografía electrónica de partícula Vault con tinción negativa con acetato de uranilo de tejido de hígado de rata. La barra de escala representa 100 nm. Imagen adaptada de Kedersha & Rome, 1986.

Los vtARNs son transcritos por la ARN polimerasa III (pol III), bajo el control de un promotor del tipo 2 de ARN pol III, tiene dos secuencias promotoras inteARNs llamadas Box A y Box B, que reclutan los factores de transcripción TFIIC y TFIIIB, facilitando así la unión de la pol III al sitio de inicio de la transcripción (Gallo et al., 2022). Los vtARNs tienen una longitud aproximada entre 80 y 100 nucleótidos y presentan una estructura secundaria conservada en forma de horquilla ([fig. 7](#)) (Gallo et al., 2022; Taube et al., 2024). Estos ARNnc se han asociados a diversos procesos celulares como protección de sufrir apoptosis inducida por infecciones virales (Amort et al., 2015), un posible rol

en trastornos neurodegenerativos (Daneshpour et al., 2025), y un rol en el desarrollo del cáncer (Fort & Duhagon, 2021) entre otras funciones reportadas.

Una fracción de aproximadamente el 3-5% del vtARN libre en el citoplasma es procesada para formar pequeños fragmentos denominados vtARN pequeños (svtARNs) (fig. 8). El primer reporte que menciona la existencia de fragmentos derivados de los vtARNs fue el trabajo de Persson de 2009. La secuenciación profunda de ARN pequeños en la línea celular de cáncer de mama MCF7 generó secuencias que coinciden con los extremos 3' y 5' de los vtARN1 y vtARN2 (Persson et al., 2009).

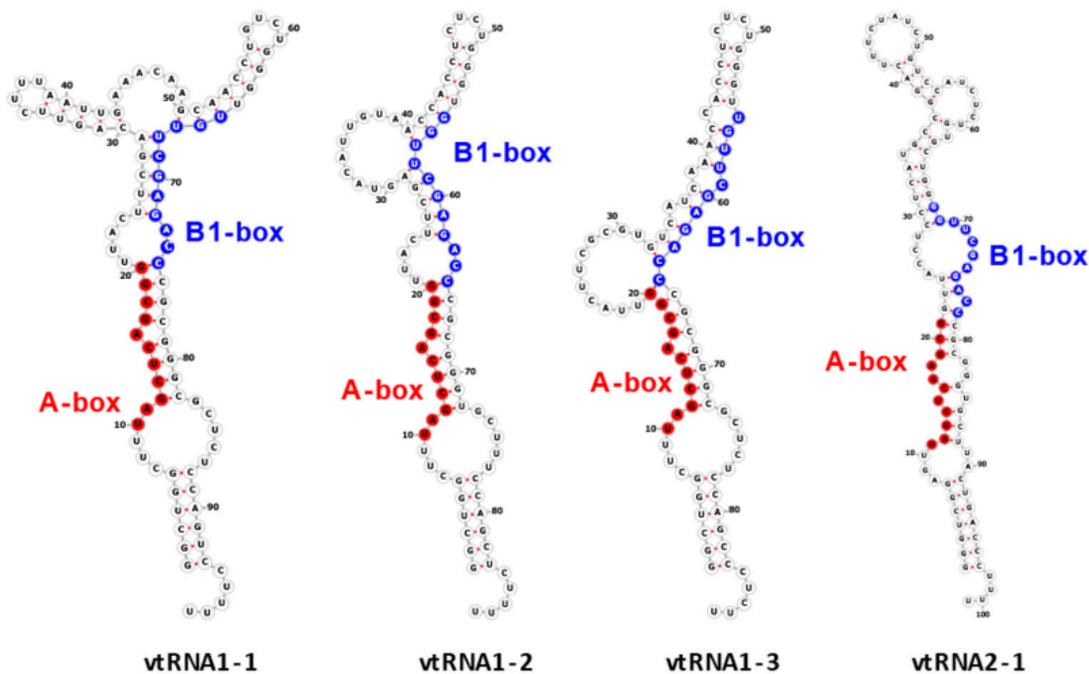


Figura 7. Estructura secundaria predicha de los vtARNs humanos (vtARN1-1, vtARN1-2, vtARN1-3 y vtARN2-1). Se destacan en los colores los promotores internos reconocidos por la ARN polimerasa III denominados A-box (rojo) y B1-box (azul). Imagen extraída de Taube et al., 2024.

Estos fragmentos derivados de los vtARNs son capaces de asociarse con proteínas de la familia Argonauta (parte del complejo RISC), lo que sugiere que podrían regular la expresión génica mediante un mecanismo similar al de los miARN (Persson et al.,

2009). Se ha demostrado que su procesamiento es independiente de Drosha, pero dependiente de Dicer, lo que indica una ruta no canónica de biogénesis de miARN (Fort et al., 2020; K. Lee et al., 2011; Persson et al., 2009). La metiltransferasa NSun2, que cataliza la metilación de m⁵C de ARN, tiene como uno de sus sustratos los vtARN. En particular, la metilación de vtARN1-1 puede inducir un patrón alternativo de procesamiento, generando fragmentos distintos a los canónicos, que podrían regular un conjunto diferente de ARNm (Hussain et al., 2013; Sajini et al., 2019). Por ejemplo, se ha observado que uno de estos fragmentos está implicado en la diferenciación de queratinocitos a partir de células progenitoras epidérmicas (Sajini et al., 2019).

El rol de los pequeños fragmentos derivados de vtARNs no se ha dilucidado completamente. Se ha observado que un fragmento proveniente de vtARN1-1 está implicado en la resistencia a múltiples fármacos en el cáncer de mama (Persson et al., 2009). Recientemente, se ha demostrado en cáncer de mama que un fragmento de vtARN1-2 es capaz de modular la expresión de proteínas de membrana celular a través del silenciamiento de ARN naciente (Alagia et al., 2023). Así mismo, el fragmento vtARN2-1-3p ha sido reportado como un regulador negativo de características de células neoplásicas, como la proliferación, migración e invasividad, en múltiples tipos de cáncer (Cao et al., 2013; Fort et al., 2020; Shen et al., 2018; Xiong et al., 2011). Otro posible rol se encuentra en los exosomas, las pequeñas vesículas secretadas por las células que median procesos de señalización intercelular y transporte de moléculas, donde pequeños fragmentos de vtARN han sido hallados en su interior (Z. Yu et al., 2014; Y. Zhang et al., 2019).

En esta tesis se profundizará en el estudio de un fragmento derivado de vtARN2-1, el vtARN2-1-5p (fragmento derivado del extremo 5' del vtARN), motivo por el cual se desarrollará las evidencias específicas de este fragmento con mayor detalle a continuación.

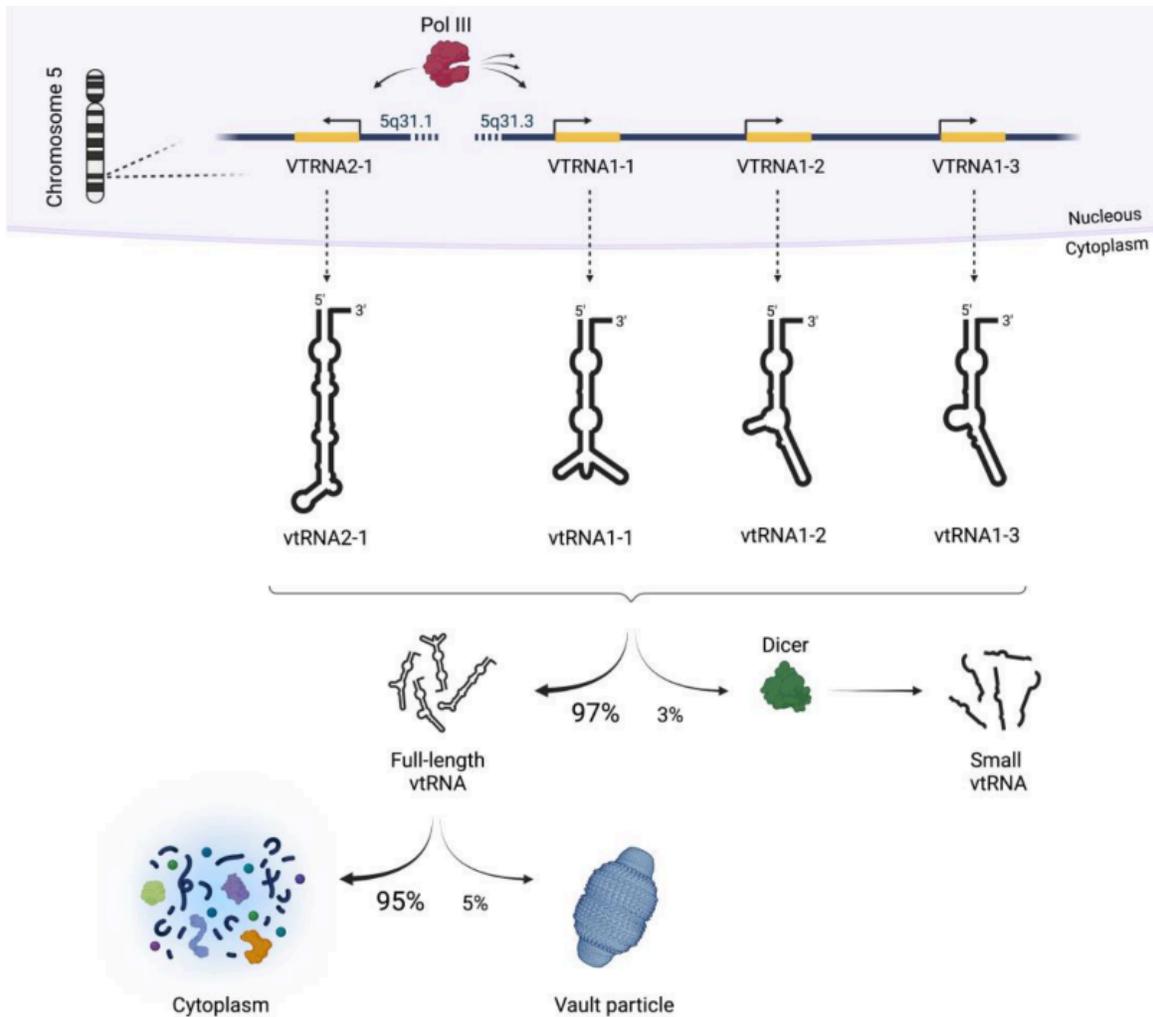


Figura 8. Esquema de los cuatro genes de vtARNs humanos localizados en el cromosoma 5, distribuidos en dos loci (5q31.1 y 5q31.3), son transcritos por la ARN polimerasa III. Los transcritos de vtARN pueden permanecer con su longitud completa, de los cuales ~95% quedan libres en el citoplasma y el 5% se asocia a la partícula Vault. Una pequeña fracción (~5%) es procesada por la enzima Dicer para generar pequeños fragmentos derivados de vtARNs. Imagen extraída de Gallo et al., 2022.

7. vaultARN2-1, el fragmento vtARN2-1-3p/5p y su relación con el cáncer

Como se mencionó previamente, el vtARN2-1 fue inicialmente clasificado como precursor de miARN y designado como pre-mir-886. Sin embargo, posteriormente fue reclasificado como vault ARN debido a su homología estructural y de secuencia con el

resto de los vtARNs, y por su asociación a la partícula vault (Nandy et al., 2009). Posteriormente, fue nuevamente renombrado por el grupo de Lee a nc886 por sus características independientes de su asociación a la partícula vault (K. Lee et al., 2011).

Diversos estudios han propuesto que el vtARN2-1 tiene un rol en varios tipos de cáncer. Se observó de manera consistente que el promotor de vtARN2-1 se encuentra hipermetilado en tejidos tumorales en comparación con tejidos normales, lo que sugiere una regulación epigenética de su expresión. Este fenómeno se ha observado en adenocarcinoma de próstata, leucemia y cánceres de pulmón, colon, gástrico, mama y esofágico (Cao et al., 2013; Fort et al., 2018; H.-S. Lee et al., 2014; K.-S. Lee et al., 2014; Romanelli et al., 2014; Treppendahl et al., 2012). En varios de estos tipos tumorales, además, se ha reportado una disminución en los niveles de expresión de vtARN2-1 en comparación con el tejido sano (Fort et al., 2018; H.-S. Lee et al., 2014; K.-S. Lee et al., 2014; Kunkeaw et al., 2013).

En estudios funcionales realizados en líneas celulares tumorales de próstata, esófago, estómago y de colangiocarcinoma, la sobreexpresión de vtARN2-1 genera la disminución de la proliferación celular y aumento de los niveles de apoptosis (Fort et al., 2018; Kunkeaw et al., 2013; H.-S. Lee et al., 2014; K.-S. Lee et al., 2014). Estos resultados apoyan la hipótesis de que vtARN2-1 podría actuar como un ARN no codificante con funciones supresoras de tumor en estos tejidos.

Con el objetivo de profundizar en la función molecular de vtARN2-1, Lee et al. (2011) identificaron proteínas que interactúan físicamente con esta molécula. Detectaron 49 proteínas que se unen de manera específica a vtARN2-1, entre ellas la proteína quinasa dependiente de ARN bicatenario (PKR). PKR es una serina/treonina quinasa, que desempeña diversas funciones celulares como la autofosforilación, la fosforilación de eIF-2 α , la transducción de señales, la regulación transcripcional a través de la vía I κ B/NF- κ B, y el control del crecimiento celular y la proliferación, actuando como potencial tumor supresor (García et al., 2006). En experimentos funcionales, el silenciamiento de vtARN2-1 en la línea celular modelo de cáncer de colon HCT116, resultó en la activación de PKR, acompañada por un aumento en la fosforilación de eIF2 α y la activación de la actividad de NF- κ B, el mismo fenómeno se observó

colangiocarcinoma (Kunkeaw et al., 2013; K. Lee et al., 2011). La sobreexpresión de vtARN2-1 en células de cáncer de próstata induce la producción de INF- β , de manera contraria, su degradación en células normales de próstata disminuye la capacidad de respuesta inmune celular, reforzando el vínculo del vtARN2-1 con la respuesta inmunológica y su función tumor supresor (Oliveira-Rizzo et al., 2025).

El knockdown del vtARN2-1 en carcinoma de células escamosas esofágico indujo la expresión de varios genes, incluido oncogenes. El grupo de Lee propuso al vtARN2-1 como un posible marcador pronóstico para el cáncer de esófago, debido a su alto nivel de expresión. La detección de su silenciamiento por metilación podría utilizarse para clasificar a los pacientes con mayor riesgo de recurrencia, ya que aquellos pacientes con niveles más bajos de expresión presentarían una recurrencia más temprana y sería recomendable utilizar tratamientos más agresivos (H.-S. Lee et al., 2014).

El vtARN2-1 es capaz de generar dos fragmentos derivados, denominados vtARN2-1-3p y vtARN2-1-5p, mediante una biogénesis no canónica que es independiente de la enzima DROSHA, pero dependiente de DICER ([fig. 9](#)) (Fort et al., 2020; K. Lee et al., 2011). Se ha observado que el fragmento vtARN2-1-3p puede asociarse a proteínas Argonautas del complejo RISC, al igual que los microARNs, lo que sugiere que podría ejercer funciones regulatorias similares a las de un miARN (Fort et al., 2020).

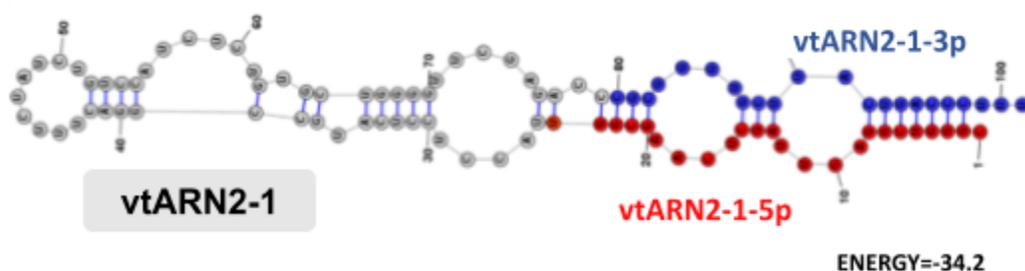


Figura 9. Estructura secundaria predicha del ARN no codificante vtARN2-1(RefSeq: NR_030583.2) basada en la energía libre mínima (MFE), generada con el software RNAstructure. Se destacan las regiones correspondientes a los fragmentos pequeños

derivados: vtARN2-1-5p (en rojo) y vtARN2-1-3p (en azul), que se originan a partir del procesamiento de la molécula completa. Imagen adaptada de Fort et al., 2020.

Diversos estudios proponen que el vtARN2-1-3p cumple un papel supresor tumoral en varios tipos de cáncer, incluyendo próstata, mama, vejiga, colon, pulmón y tiroides. En estos tejidos, se ha observado que su expresión es mayor en tejido normal en comparación con el tumoral (Fort et al., 2020; Nordentoft et al., 2012; Shen et al., 2018; Tahiri et al., 2014; Xiong et al., 2011; X.-F. Yu, 2011). Por lo contrario, algunos pocos estudios reportan al vtARN2-1-3p con un posible rol como oncogen en carcinoma renal, carcinoma colorrectal y carcinoma de células escamosas esofágico (Okumura et al., 2016; Schou et al., 2014; Z. Yu et al., 2014).

Ensayos funcionales han demostrado que la sobreexpresión de vtARN2-1-3p reduce la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata, tiroides y pulmón; induce un aumento en la apoptosis en cáncer de próstata; y disminuye la migración en cáncer de pulmón y tiroides (Cao et al., 2013; Fort et al., 2020; Xiong et al., 2011). En conjunto, estos hallazgos apoyan la hipótesis de que este fragmento actúa como un supresor tumoral, regulando procesos clave asociados con características clásicas del cáncer, como es la proliferación descontrolada, la resistencia a la muerte celular y la capacidad de invasión.

De forma opuesta el otro fragmento derivado de vtARN2-1 al 5', el vtARN2-1-5p ha sido reportado sobreexpresado en tejidos tumorales en comparación con tejidos normales en diversos tipos de cáncer, tales como cáncer de mama, cáncer oral, linfoma, en células de cáncer cervical y en plasma de pacientes con mieloma múltiple (Kong et al., 2015; Li et al., 2011; Liu et al., 2013; Xiang et al., 2019, 2019; Xiao et al., 2012; L.-L. Zhang et al., 2014). Asimismo, se ha observado una mayor expresión de este fragmento en tumores de vejiga de alto grado en comparación de tumores de bajo grado, lo que sugiere su potencial uso como biomarcador de cáncer vesical en distintos estadios (Khoshnevisan et al., 2015). Por el contrario, algunos estudios reportan una disminución en su expresión en carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón y

células madre de cáncer de colon humano (Gao et al., 2011; Han et al., 2012; X.-F. Yu, 2011).

En cuanto a estudios funcionales, la sobreexpresión del fragmento vtARN2-1-5p en células de cáncer cervical y mieloma múltiple se asocia con un aumento en la proliferación e invasión celular, así como con una disminución de la apoptosis. En contraste, la inhibición de este fragmento produce lo contrario (Kong et al., 2015; Li et al., 2011; Xiang et al., 2019). Estos hallazgos sugieren que el vtARN2-1-5p modula características moleculares asociadas a un fenotipo cancerígeno, postulándolo como un posible oncogen.

Se ha demostrado que la sobreexpresión de vtARN2-1-5p en la línea celular epitelial cervical H8 reduce la expresión de la proteína pro-apoptótica Bax, disminuyendo así la apoptosis y promoviendo la proliferación (Li et al., 2011). Resultados inversos se observaron al inhibir este fragmento en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 y en líneas celulares de mieloma humano KMS-11 y NCI-H929, reforzando la hipótesis de su potencial rol oncogénico (Xiang et al., 2019; L.-L. Zhang et al., 2014).

Se ha reportado que el fragmento vtARN2-1-5p se une directamente a las regiones no traducidas (UTRs) 5' y 3' del gen p53, así como al 3' de otros genes involucrados en su vía de señalización, como lo es Bax (Kong et al., 2015; Li et al., 2011). La sobreexpresión de vtARN2-1-5p en células de carcinoma cervical y mieloma múltiple reduce los niveles de expresión de p53 y Bax, mientras que su inhibición aumenta la expresión de ambas proteínas (Kong et al., 2015; Li et al., 2011; Xiang et al., 2019). Adicionalmente, el grupo de Kong realizó un ensayo de luciferasa reportera, donde co-transfectaron construcciones reporteras con la UTR de p53 y el mimic de vtARN2-1-5p. De esta manera, observaron una disminución de la actividad de luciferasa al sobreexpresar el fragmento, lo que sugiere que vtARN2-1-5p regula negativamente la expresión de p53 mediante la unión a la UTR, demostrando su rol funcional como miARN (Kong et al., 2015).

La única evidencia publicada de la función del vtARN2-1-5p en cáncer de próstata fue reportada por el grupo de Kong en la línea celular PC3. En este estudio, observaron

que la sobreexpresión del mimic de vtARN2-1-5p no afecta la proliferación ni la apoptosis celular.

La información resumida de la literatura del vtARN2-1-3p y vtARN2-1-5p se puede ver en la [tabla 3](#).

Tabla 3. Resumen de la literatura del vtARN2-1-3p y vtARN2-1-5p y su función como tumor supresor (color azul) u oncogén (color rojo).

Tejido	Literatura vtARN2-1-5p	Función 5p	Literatura vtARN2-1-3p	Función 3p
Pulmón	Gao et al., 2011	Supresor ●	Cao et al., 2013; Shen et al., 2018	Supresor ●
Colon	Yu, 2011	Supresor ●	Yu, 2011	Supresor ●
Vejiga	Khoshnevisan et al., 2015	Oncogén ●	Nordentoft et al., 2012	Supresor ●
Mama	Zhang et al., 2014	Oncogén ●	Tahiri et al., 2014	Supresor ●
Oral	Xiao et al., 2012	Oncogén ●	Xiao et al., 2012	Oncogén ●
Cervical	Kong et al., 2015; Li et al., 2011	Oncogén ●	-	-
Mieloma múltiple	Xiang et al., 2019	Oncogén ●	-	-
Linfoma	Liu et al., 2013	Supresor ●	-	-
Hígado	Han et al., 2012	Supresor ●	-	-
Tiroides	-	-	Dettmer et al., 2014	Supresor ●

En este contexto, este trabajo se centra en el estudio del fragmento vtARN2-1-5p y su posible implicancia en la regulación de características tumorales en células de cáncer de próstata. Dada la escasa información en este cáncer, se busca contribuir a la

caracterización funcional del fragmento vtARN2-1-5p y su posible rol en la biología del cáncer de próstata.

Antecedentes

En el marco de su doctorado el Dr. Rafael Fort investigó la presencia de los fragmentos derivados del vtARN2-1 en tejido de próstata, utilizando datos de *small-RNA-seq* disponibles de tejidos prostáticos y líneas celulares prostáticas tumorales y normales, disponibles en *Sequence Read Archive* (SRA) y en *Gene Expression Omnibus* (GEO). En este análisis se observó que la mayoría de las lecturas mapean con las secuencias anotadas como vtARN2-1-3p y vtARN2-1-5p en líneas celulares normales y tumorales de próstata ([fig.10](#)) (Fort et al., 2020).

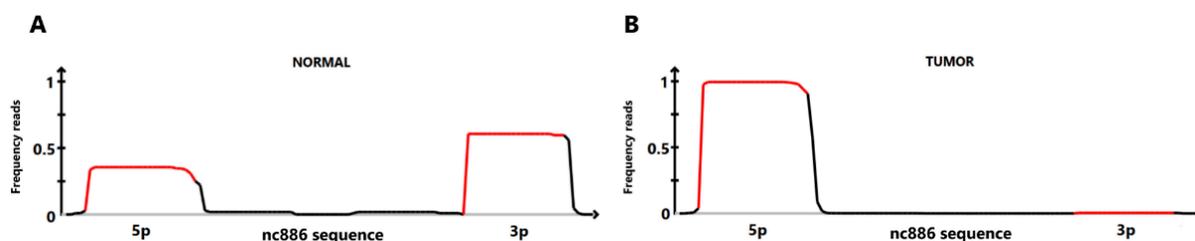


Figura 10. Mapeos de lecturas de ARNnc pequeños a lo largo de la secuencia del vtARN2-1. El procesamiento del vtARN2-1 genera fragmentos con características de microARN en líneas celulares de cáncer de próstata. (A) Se observan las lecturas obtenidas de células epiteliales de próstata (PrEc) y células estromales de próstata (PrSC) (GEO id: GSE26970). (B) Se observan las lecturas obtenidas de líneas celulares tumorales DU145, PC3 y LNCaP. (SRA id: SRP109305 and GEO id: GSE66035). En rojo se observan los fragmentos vtARN2-1-3p y vtARN2-1-5p. Imagen modificada de Fort et al., 2020.

Al extender el estudio de la expresión de vtARN2-1-5p a los datos de *small-RNA-seq* de la cohorte de Atlas del Genoma del Cáncer de Adenocarcinoma de Próstata TCGA-PRAD, se observó que la expresión del fragmento vtARN2-1-5p se asocia con peores parámetros clínicos en pacientes con cáncer de próstata. En primer lugar, se detecta una tendencia al aumento del fragmento en pacientes con recurrencia bioquímica, definida como el incremento de los niveles de PSA luego del tratamiento inicial ([fig. 11B](#)). También se evidencia una tendencia a que aumente su expresión en casos con presencia de tumor residual posterior a la prostatectomía o tratamiento con quimioterapia ([fig. 11C](#)). Por otro lado, se observaron niveles de vtARN2-1-5p

significativamente más altos en muestras con compromiso ganglionar (pathologic N1; [fig. 11D](#)), así como en estadios más avanzados del tumor según criterios clínicos (Clinical T), patológicos (Pathological T) y puntaje de Gleason ([fig. 11E, F y G](#) respectivamente). Estos resultados, postulan al vtARN2-1-5p como un posible oncogen en la biología del cáncer de próstata y lo asocian con una mayor agresividad tumoral.

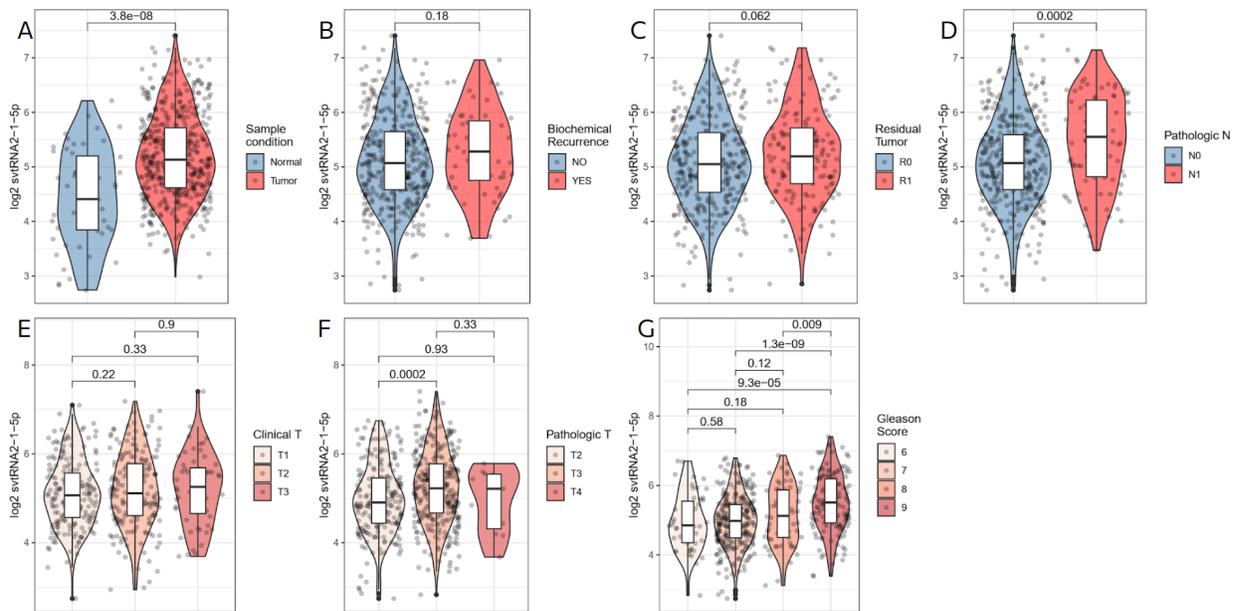


Figura 11. Expresión del vtARN2-1-5p en distintos parámetros clínicos. (A) tejido normal vs tejido tumoral, (B) recurrencia bioquímica, (C) tumor residual, (D) pathologic N, (E) Clinical T, (F) Pathologic T, (G) Gleason Score. Los gráficos se realizaron con los datos de Atlas del Genoma del Cáncer de Adenocarcinoma de Próstata TCGA-PRAD.

Con el objetivo de determinar si los fragmentos derivados del vtARN2-1 pueden cumplir una función similar a la de los miARN, nuestro grupo realizó un análisis transcriptómico de datos disponibles de ARN total de la línea celular DU145 y de la fracción de ARNs asociados a la proteína Argonauta (AGO) (Fort et al., 2020). Este análisis reveló que el vtARN2-1-5p se expresa en mayores niveles que el vtARN2-1-3p en la línea celular DU145, y también que varios miARNs canónicos como hsa-miR-301b, hsa-miR-130b y hsa-miR320b ([fig. 12](#)). Ambos fragmentos derivados del vtARN2-1 se encuentran asociados a la fracción AGO; sin embargo, a pesar de su menor expresión, el

vtARN2-1-3p está mayormente asociado a AGO en comparación con el vtARN2-1-5p (fig. 12). A su vez, los datos de secuenciación muestran que el vtARN2-1-5p se expresa 2730 veces más en la línea celular DU145 que en LNCaP y 40 veces más que en PC3.

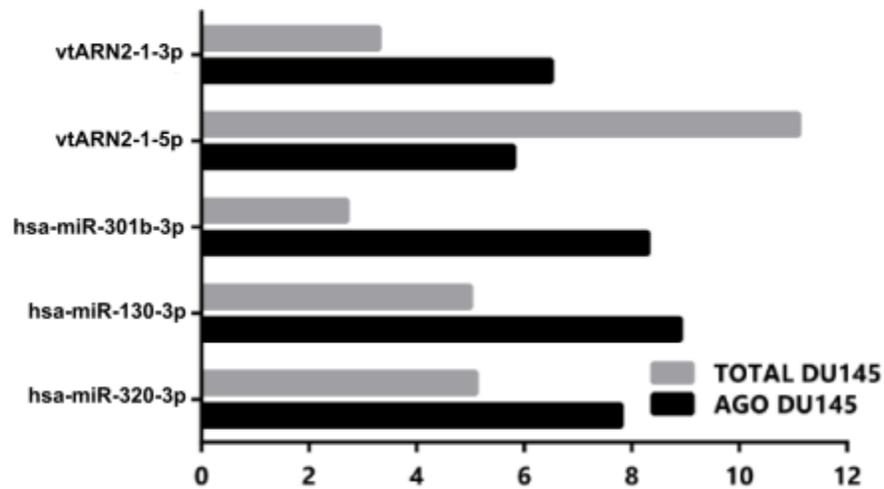


Figura 12. Análisis transcriptómico de la línea celular DU145 y la asociación de los fragmentos de vtARN2-1 y miARNs a la proteína Argonata (AGO). Se grafica la expresión normalizada, lecturas por millón (RPM), de pequeños ARNnc en el ARN total de la línea celular DU145 y la fracción *PAR-CLIP* de AGO.

Teniendo en cuenta los antecedentes de la literatura y los obtenidos por el grupo sobre el fragmento vtARN2-1-5p, se formuló una hipótesis para la realización de este trabajo y abordar su posible función en cáncer de próstata.

Hipótesis

El vtARN2-1-5p se encuentra sobreexpresado en células de cáncer de próstata y ejerce un rol oncogénico regulando negativamente las vías apoptóticas y favoreciendo procesos proliferativos.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto funcional de la modulación del vtARN2-1-5 sobre los fenotipos proliferativo y apoptótico en líneas celulares de cáncer de próstata.

Objetivos específicos

1. Cuantificar los niveles de vtARN2-1-5p en las líneas celulares modelo de cáncer de próstata.
2. Evaluar el efecto de la modulación del vtARN2-1-5p sobre la viabilidad celular en las líneas celulares LNCaP y PC3
3. Evaluar el efecto de la modulación del vtARN2-1-5p sobre el fenotipo apoptótico de las líneas celulares LNCaP y PC3
4. Predecir posibles genes blancos regulados por vtARN2-1-5p y las posibles vías y procesos celulares que podría modular.

Materiales y métodos

- Líneas celulares

Para este trabajo se realizó cultivo celular de tres líneas celulares de cáncer de próstata, PC3, LNCaP y DU145 obtenidas de ATCC (Manassas, VA, USA).

PC3 y DU145 son líneas celulares humanas que derivan de una metástasis ósea y una metástasis de cerebro, respectivamente, de un adenocarcinoma de próstata. Ambas líneas presentan una morfología de tipo epitelial ([fig. 13](#)) y forman tumores en ratones inmunodeprimidos. Sumado a esto, ninguna expresa receptores de andrógeno por lo que son insensibles a él. A su vez, el análisis citogenético revela que son células hipotriploides. La línea celular PC3 no expresa la proteína p53 (se encuentra deletado el locus), mientras que DU145 presenta una versión mutante de la misma. En cambio, LNCaP deriva de una metástasis en el nódulo linfático izquierdo supraclavicular de un adenocarcinoma de próstata, tiene una morfología epitelial y se observa la formación de tumores en ratones inmunodeprimidos pero a diferencia de PC3 y DU145, esta línea celular es sensible a andrógeno ya que expresa receptores específicos de alta afinidad a andrógenos. Con respecto a su cariotipo, son aneuploides con un número cromosómico tetraploide y expresa la proteína salvaje de p53.

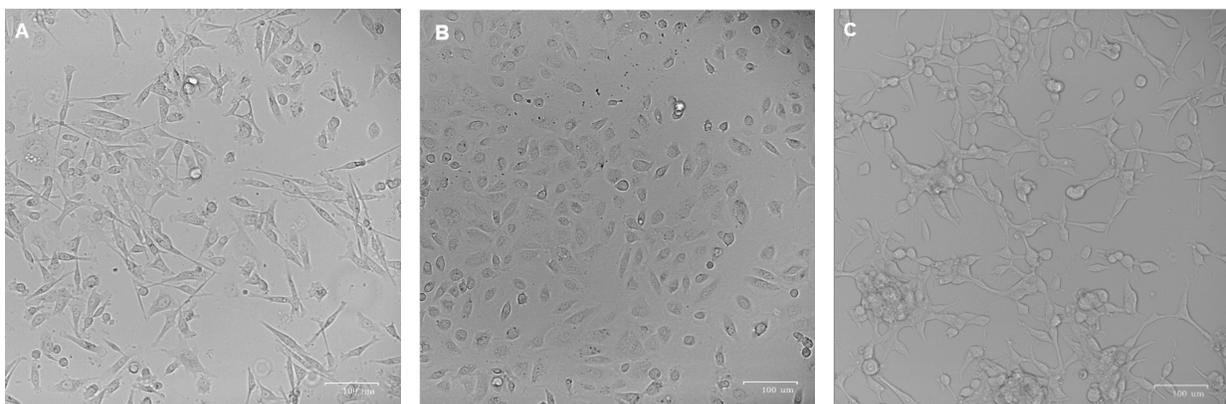


Figura 13. Fotos de las líneas celulares PC3 (A), DU145 (B) y LNCaP (C) en cultivo, tomadas con microscopio (MARCA ZOE) con contraste de fases. Las tres líneas celulares

exhiben una morfología epitelial, crecen adheridas a la placa formando una monocapa, a excepción de LNCaP que crece formando colonias. PC3 y DU145 crecen más adheridas que LNCaP.

- **Medio de cultivo**

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (R7755) (Capricorn™), por ser el indicado por el repositorio celular ATCC. Se suplementa el medio con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Capricorn™) descomplementado y 1% Penicilina/estreptomicina (10.000 U/mL, 10 mg/mL, respectivamente), el medio con sus agregados se lo menciona como medio RPMI completo.

- **Mantenimiento celular**

Se mantuvieron las células en medio RPMI 1640 completo a 37°C y una atmósfera con 5% de dióxido de carbono, en frascos T-25 tratados para células adherentes. Se observaron las células en el microscopio ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad) las células para evaluar su morfología y densidad. Se cambió el medio de cultivo cuando se observaba un viraje de color rojo a anaranjado debido al indicador colorimétrico de pH presente en el medio (rojo fenol), que indica que se acidificó.

Cuando la monocapa celular alcanzaba entre el 80 % y el 90 % de confluencia se realizaron subcultivos. Para esto, se extrae el medio condicionado y se realizan dos lavados con 1 mL de PBS 1X (Capricorn™) para eliminar restos de medio. Luego se añade 1 mL de tripsina-EDTA (Capricorn™) y se incuba por 3-5 minutos a 37°C y una atmósfera con 5% CO₂. La tripsina es una proteasa de serina que hidroliza proteínas, en cultivo celular se usa para cortar las adhesiones focales que adhieren las células a la botella de cultivo y las adhesiones células-células a través de cadherinas obteniendo las células de manera individual. Pasados los 3 minutos, se corrobora al microscopio óptico de que todas las células se desprendieron del frasco y se corta el tratamiento al agregar 2 mL de medio completo. El medio completo neutraliza la actividad de la tripsina evitando así dañar las células. Las células se centrifugan las células a 500 g por 5 minutos y se descarta el sobrenadante para continuar con el pellet que contiene

las células y deshacerse de la tripsina y de restos celulares. El pellet se resuspende en 2 mL de medio completo y se hace la dilución deseada para volver a cultivar en el frasco.

- **Descomplementación de Suero Fetal Bovino**

De manera de inactivar las proteínas del sistema del complemento presentes en el FBS, se descongeló una botella de FBS a 30°C, una vez que se descongeló por completo se pasó a 56°C por 30 minutos. Pasado el tiempo se pasó el FBS descomplementado a hielo y se fraccionó en la cabina de flujo laminar para almacenarlo a -20°C.

- **Crioconservación celular**

Para mantener los cultivos de manera prolongada se congelaron las células a -80/-130°C en crioviales de 2 mL. Para almacenar las células en los crioviales se observaron al microscopio para asegurar un buen crecimiento y cuando estas llegaban a un 80% de confluencia se realizaba el tratamiento con tripsina como se explicó anteriormente. Una vez que las células estaban resuspendidas se contaban en cámara de Neubauer. Se toma el volumen de un millón de células en medio RPMI 1640 completo y se coloca en el criovial. Luego, se agrega el mismo volumen de medio RPMI 1640 completo suplementado con 10% más de suero fetal bovino y 10% DMSO, este último se añade para evitar la formación de cristales de hielo que pueden destruir las células.

- **Recuento en cámara de Neubauer**

Para obtener un número aproximado de células se contabilizó por cámara de Neubauer. Este es un grueso portaobjeto de cristal dividido en tres secciones, en donde la sección del medio cuenta con una cuadrícula de 3 mm x 3 mm dividida en 9 cuadrados que es capaz de visualizarse bajo el microscopio. Cuando se coloca el cubreobjetos la cuadrícula queda a una distancia exacta de 0,1 mm generando un volumen fijo de 0,1 μ L sobre cada uno de los cuadrados. Para contabilizar las células, se utilizaron los 4 cuadrados de los extremos que están divididos a su vez en 16

cuadrados. La media de células contabilizadas en esos 4 cuadrados es el número de células en 0,1 μ L de la suspensión de células. Usualmente se partió de una dilución 1/10 por lo que se calcula el número de células por mL de la suspensión original teniendo en cuenta la dilución.

- **Transfección celular**

Los ARNs miméticos o mimics son ARNs de doble cadena sintéticas, compuestas por una hebra guía diseñada para imitar la función del ARN endógeno y una hebra pasajera que es parcialmente complementaria a la guía y está químicamente modificada para favorecer la carga del ARN guía en el complejo RISC. En este caso, se solicitó a la empresa Dharmacon™ la síntesis de un mimic específico con la secuencia del vtARN2-1-5p previamente predicha, la secuencia utilizada se encuentra en la [tabla 4](#).

Se llevó a cabo la transfección de un ARN mimic de vtARN-1-5p y de un ARN mimic control, este último no está dirigido a ningún gen en la célula y marcado con Cy3, un colorante fluorescente con máximo de absorción/emisión en 547/563 nm (Dharmacon™, CP-004500-01) ([tabla 4](#)). La transfección fue realizada utilizando Lipofectamina™ 3000 (Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA), cuyo mecanismo de acción se basa en lípidos catiónicos que forman un “complejo de transfección” al interactuar con los ácidos nucleicos, este interactúa electrostáticamente con la membrana celular facilitando la internalización por endocitosis y posterior liberación intracelular de los ácidos nucleicos (“Molecular mechanism of Lipofectamine 3000”, s. f.).

Para la transfección, las células se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80-90% en botellas T-25. La semana del ensayo se levantaron las células como se describe en apartados anteriores, se cuantificaron en cámara de Neubauer y se sembró el número de células adecuado dependiendo el tipo de placa que se utilizó en cada ensayo y la línea celular.

Pasadas las 24 horas, se llevó a cabo el protocolo de transfección planteado por el fabricante (Invitrogen™). Tomando como ejemplo la transfección en una placa de 24 pocillos, se puso en un tubo eppendorf 50 μ L de medio Opti-MEM (Gibco™) y en otros

dos 25 μ L cada uno, nombrandolos como tubo 1, 2 y 3 respectivamente. Al tubo 1 se le añadieron 3 μ L de Lipofectamina 3000, mientras que al tubo 2 se agregaron 0,5 μ L para lograr una concentración final de 20 nM en el pocillo de ARN mimic vtARN2-1-5p y control fluorescente en el tubo 3 (la concentración de ARN varió en los ensayos). Posteriormente se agregó 25 μ L del tubo 1 al 2 y otros 25 μ L al tubo 3, se dejó incubando por 15 minutos a temperatura ambiente.

Tras la incubación, se agregó 50 μ L (10% del volumen total del pocillo) del tubo 2 a un pocillo y del tubo 3 a otro, quedando así una concentración final de ARN mimic y su respectivo control de 20 nM en cada pocillo, se pipeteo 2 veces arriba y abajo un para asegurar que los complejos se encuentren distribuidos de manera uniforme. Finalmente, 24 horas después de realizada la transfección se reemplazó el medio por medio RPMI 1640 completo.

Tabla 4. Secuencia del mimic vtARN2-1-5p utilizado para la transfección celular .

mimic vtARN2-1-5p	Secuencia
Hebra activa	5' C.G.G.G.U.C.G.G.A.G.U.U.A.G.C.U.C.A.A.G.C.G.G 3'
Hebra pasajera	5' G.C.U.U.G.A.G.C.U.A.A.C.U.C.C.G.A.C.C.C.G.U.U 3'
mimic control fluorescente	5' U.C.A.C.A.A.C.C.U.C.C.U.A.G.A.A.A.G.A.G.U.A.G.A 3'

- **Evaluación de la eficiencia de transfección**

La eficiencia de transfección se evaluó utilizando el mimic control fluorescente. La incorporación del mimic control fluorescente en las células se observó utilizando el microscopio ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad). Se tomaron imágenes de las células en campo claro y bajo la excitación de una longitud de onda de 556/20nM para observar la fluorescencia. Se superpusieron las imágenes con el fin de confirmar que la señal de fluorescencia provenía de las células y no del medio. La fluorescencia fue monitoreada a 24, 48 y 72 horas post-transfección para verificar su estabilidad en el tiempo.

Adicionalmente, se realizó un ensayo de cuantificación de fluorescencia utilizando el Citómetro de flujo C6 (BD Accuri™) para evaluar la eficiencia de la transfección. Para ello, se sembraron células PC3 y LNCaP en placas de cultivo de 6 pocillos tratadas para adherencia celular, en una densidad adecuada para obtener aproximadamente 500.000 de células por pocillo a las 72 horas. A las 24 horas de siembra, cuando las células ya se encontraban adheridas a la placa, se realizó el protocolo de transfección previamente descrito utilizando 20nM de mimic control en dos pocillos de cada línea celular. Se realizó un control en otros dos pocillos de cada línea celular, donde se agregó únicamente 20nM del mimic control, sin Lipofectamina, para evaluar la señal de fluorescencia observada simplemente por adherencia a la superficie celular. A otros 2 pocillos de cada línea celular no se les realizó ningún tipo de tratamiento, con el objetivo de medir la autofluorescencia de las células ([fig. 14](#)).

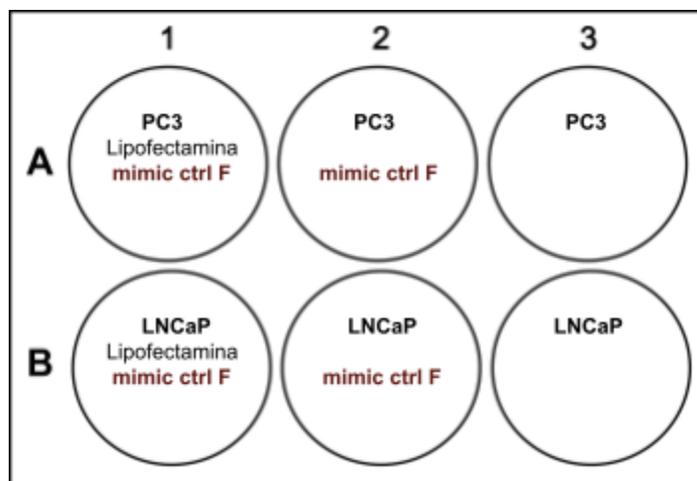


Figura 14. Diseño experimental para evaluar la eficiencia de transfección. Se sembraron las líneas celulares PC3 y LNCaP sin tratamiento, con lipofectamina y el mimic control fluorescente y sin la lipofectamina.

Pasadas las 48 horas de transfección se lavó con PBS 1X, se levantaron las células de la placa con tripsina, se centrifugaron y se suspendieron en 1 mL de PBS 1X. Luego se pasaron las muestras por el citómetro de flujo.

- Extracción de ARN

Se extrajo el ARN total de las líneas celulares parentales (*wild type*) y transfectadas con TRIzol (ambion®). Para esto, se dejaron crecer las células en placas de 6 wells hasta llegar a una confluencia de 80-90% donde esperamos tener aproximadamente 1×10^6 células por well, a cada well se le extrajo el medio y se le agregó 1 mL de TRIzol pipeteando arriba y abajo varias veces por todo el well para asegurar el lisado total de las células y el correcto homogeneizado. Se pasaron las muestras a eppendorfs de 1,5 mL y se almacenaron a -20°C hasta el día de la extracción.

Para realizar la extracción, los tubos se descongelaron a temperatura ambiente, se mezclaron por agitación y posteriormente se siguió el protocolo especificado por el fabricante. Las muestras se dejaron durante 5 minutos a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos.

Tras la incubación, se añadieron 0,2 mL de cloroformo, se mezclaron por agitación y se dejaron incubar por 3 minutos a T.A. Acto seguido se centrifugó a $12.000 \times g$ y 4°C por 15 minutos. Como resultado, se observó una fase inferior de fenol-cloroformo, una interfase y una fase superior acuosa. Con una pipeta, se extrajo cuidadosamente la fase acuosa, evitando tomar las otras fases y se separó en un tubo limpio.

A la fase acuosa obtenida se le añadieron 0,5 mL de isopropanol y se incubó por 10 minutos a 4°C , seguida de una centrifugación a $12.000 \times g$ a 4°C por 10 minutos. En esta etapa esperamos la precipitación total de ARN como un pellet blanco en el fondo del tubo. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente evitando la pérdida del pellet de ARN. Posteriormente, se lavó con 1 mL de etanol 75%. La mezcla se vortexó y se centrifugó a $7.500 \times g$ a 4°C durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante con una pipeta y se dejó secar el pellet de ARN por 10 minutos. Finalmente se resuspendió el pellet en 30 μL de agua libre de ARNasas y se incubó en baño de agua a 55°C por 10 minutos.

Una vez extraído el ARN, su concentración se determinó mediante la medición de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro NanoDrop Lite (Thermo scientific™), considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm corresponde a 44 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Asimismo, para estimar la pureza de las muestras se midió la absorbancia a 260 nm y 280 nm para obtener la relación 260/280 entre las absorbancias a esas dos longitudes de onda, lo que nos da una idea de la pureza del ARN. Se consideró una pureza óptima cuando este valor se encuentra entre 2,0 y 2,2 y aceptable cuando es mayor a 1,7. Valores menores a este nos indican contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas. El ARN extraído fue almacenado a -80°C hasta su uso.

- **Cuantificación del nivel de expresión de vtARN-1-5p y vtARN2-1-3p de las líneas celulares LNCaP, PC3, DU145 y RWPEI wild type**

La RT-qPCR se realizó utilizando el kit All-in-One™ miARN qRT-PCR Detection (GeneCopia™) para detección cuantitativa de miARN maduro, junto con cebadores específicos para vtARN2-1-5p, vtARN2-1-3p y U6 como gen de control endógeno obtenidos con la misma empresa ([tabla 5](#)). Para realizar el ADN copia (ADNc) se utilizaron los ARNs extraídos de las líneas celulares PC3, LNCaP y DU145 y se sumó el ARN de la línea no tumoral RWPEI que ya se tenía previamente en el laboratorio.

Este kit permite la transcripción reversa eficiente de microARNs a ADNc en un solo paso. Para esto añade una cola polyA en el extremo 3' del miARN maduro, seguida de la hibridación un oligo-dT adaptado que es complementario a la cola poly-A y presenta en su extremo 5' un fragmento universal característico que aumenta la longitud del ADNc con un fragmento conocido y mejora la eficiencia de la reacción en la qPCR. Para la retrotranscripción se utilizó 1 µg de ARN, 1 µL de 2 U/µL Poly A Polimerasa, 1 µL de SureCript™ RTasa Mix (20X), 4 µL 5xPAP/RT Buffer y agua libre de RNasa y DNasa hasta un volumen final de 20 µL. Tras la preparación de la mezcla la reacción se incubó a 37°C por 60 minutos, seguido de una incubación a 85°C durante 5 minutos con el objetivo de inactivar la enzima. Finalmente, el ADNc resultante se diluyó en una proporción 1:5 con agua esteril y se almacenó a -20°C.

Para la qPCR, se empleó el cebador Universal Adaptor PCR Primer (incluido en el kit) como cebador reverse, junto con un cebador forward específico para cada miARN analizado ([tabla 5](#)). Para la reacción de qPCR se mezcló 5 µL de 2x All-in-One qPCR Mix, 1 µL del cebador específico, 1 µL del Universal Adaptor PCR Primer (2 µM), 1 µL

del ADNc diluido $\frac{1}{6}$, 0,3 μ L de ROX Reference Dye y agua libre de RNasa/DNasa hasta un volumen final de 10 μ L. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI Step One (Applied Biosystems™) con una etapa de desnaturalización inicial a 95°C durante 10 minutos, seguido de 40 ciclos de 10 segundos de desnaturalización a 95°C, 20 segundos de hibridación a 60°C y 30 segundos de extensión a 72°C. También se realizó una curva de melting en un rango de temperatura de 65°C a 95°C con un aumento de temperatura de a 0,5°C finalizando con una incubación de 30 segundos a 30°C.

Tabla 5. Cebadores forward para RT-qPCR.

Gen	Secuencia
vtARN2-1-5p	5' C.G.G.G.U.C.G.G.A.G.U.U.A.G.C.U.C.A.A.G.C.G.G 3'
vtARN2-1-3p	5' C.G.C.G.G.G.U.G.C.U.U.A.C.U.G.A.C.C.C.U.U 3'
U6	5' C.C.A.T.T.C.C.C.G.A.G.C.C.T.T.T.C.A.A.C.C 3'

- **Cuantificación del nivel de expresión de vtARN2-1-5p de las líneas celulares transfectadas con mimics**

Para evaluar la sobreexpresión de vtARN2-1-5p, se utilizaron las líneas celulares PC3 y LNCaP. Cuando las células alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se levantaron y contaron en cámara de Neubauer preparando una suspensión con una concentración final de 80.000 cels/mL para PC3 y 100.000 cels/mL para LNCaP en 6 mL de medio RPMI 1640 completo.

A partir de estas suspensiones, se sembró una placa de 12 pocillos tratada para adherencia celular, se añadieron 1 mL de la suspensión en cada pocillo. Las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 horas para permitir la adhesión de las células.

Transcurrido este tiempo se realizó la transfección siguiendo el protocolo descrito en el apartado "Transfección celular", adaptándolo para la placa de 6 pocillos, haciendo 3 réplicas de cada condición PC3 y LNCaP transfectada con vtARN2-1-5p y 3 réplicas de PC3 y LNCaP transfectadas con el control fluorescente.

Pasadas 24 horas de transfección, se cambió el medio a las células por RPMI 1640 completo, a las 48 horas de la transfección se extrajo el medio y se agregó un mL de TRIzol a un pocillo de cada condición, se pipetea varias veces para asegurar el lisado completo de las células, se levanta y se pasa al siguiente pocillo de esa condición, así hasta levantar los 3 pocillos en 1 mL de TRIzol. Se realizó el protocolo de extracción de ARN explicado en el apartado anterior.

Finalmente, la cuantificación de la expresión del vtARN2-1-5p se realizó mediante RT-qPCR de la misma manera que se cuantificó en las líneas parentales (*wild type*).

- Ensayo de viabilidad celular con bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT)

Para el ensayo de MTT, se utilizaron las líneas celulares PC3, LNCaP y DU145. Cuando las células alcanzaron la fase exponencial de crecimiento se levantaron y contaron en cámara de Neubauer para preparar una suspensión con una concentración final de 70.000 cels/mL de PC3 y 100.000 cels/mL de LNCaP en medio RPMI 1640 completo. A partir de estas suspensiones se sembraron tres placas de 96 pocillos tratadas para adherencia celular, distribuyendo 10 pocillos con LNCaP y 10 pocillos de PC3 en cada placa. Cada pocillo contiene un volumen final de 100 μ L asegurando una concentración celular de 7.000 cels/pocillo y 10.000 cels/pocillo respectivamente. Se dejaron crecer durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ para permitir su adherencia.

Transcurrido este tiempo, se realizó la transfección de ARN mimic vtARN2-1-5p y control, siguiendo el protocolo descrito en el apartado de Transfección. Se hicieron distintos ensayos con distintas concentraciones de ARN 1 nM, 5 nM y 20 nM, con 5 réplicas por condición.

Después de 24 horas de transfección, se les cambió el medio y se procedió a evaluar la viabilidad celular mediante el ensayo MTT. Para ello, a una de las placas se le añadieron 20 μ L de MTT (5 mg/mL) en solución de PBS 1X a cada pocillo seguido de una incubación por 3 horas a 37°C y 5% CO₂.

El MTT es un compuesto amarillo y soluble en agua, que es reducido por acción de las deshidrogenasas celulares, convirtiéndose en cristales de formazán, los cuales son violetas e insolubles en agua. Por esta razón, pasado el tiempo de incubación se retiró cuidadosamente el medio con pipeta y se añadieron 200 μ L de DMSO para solubilizar los cristales de formazán, se mezcló mediante pipeteo.

La absorbancia se midió en un espectrofotómetro Varioskan[®] Flash Multimode (Thermo Scientific) a longitudes de onda de 570 nm y 690 nm. Se expresaron los resultados como la diferencia 570 nm - 690 nm para corregir la señal de fondo y facilitar el análisis de datos.

El procedimiento se repitió con una segunda placa a las 48 horas de transfección y con la última a las 72 horas.

El diseño de la placa de cultivo se muestra en la [figura 15](#).

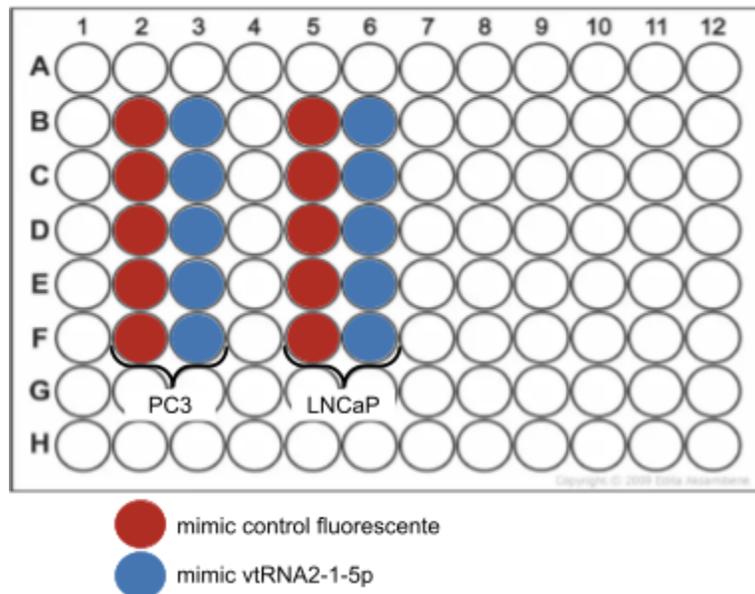


Figura 15. Diseño experimental del ensayo de viabilidad celular con MTT. Se plaquean 10 pocillos con las líneas celulares modelo de cáncer de próstata PC3 y 10 pocillos con LNCaP. En rojo se muestran los pocillos que fueron transfectados con el mimico control y en azul con el mimico del vtARN2-1-5p.

- **Ensayo de apoptosis celular**

Para evaluar la apoptosis celular, se utilizó el Kit Dead Cell Apoptosis Kits with Annexin V for Flow Cytometry (Invitrogen™). La Anexina V es una proteína que se une preferentemente a la fosfatidilserina, un fosfolípido normalmente localizado predominantemente en la cara intracelular de la membrana plasmática. Durante la apoptosis la fosfatidilserina es translocada a la cara extracelular de la membrana marcando a las células para su reconocimiento por la fagocitosis. En este kit, la Anexina V está conjugada de manera recombinante a Alexa Fluor™ 488, un fluoróforo que permite su detección. A su vez, el kit incluye Yoduro de Propidio (PI) un colorante fluorescente rojo que se une a los ácidos nucleicos. El PI es impermeable en las células viables y apoptóticas tempranas, pero tiñe a las células muertas, permitiendo diferenciar células vivas (sin fluorescencia), apoptóticas (verde), apoptóticas tardías (rojo y verde) y necróticas (rojo).

Cultivo celular

Para llevar a cabo este ensayo se utilizaron las líneas celulares PC3 y LNCaP. Cuando alcanzaron la fase exponencial de crecimiento, se levantaron y se contaron en cámara de Neubauer, se prepararon suspensiones de 100.000 cels/mL de PC3 y 120 cels/mL de LNCaP en medio RPMI 1640 completo.

Se sembraron dos placas de 12 pocillos tratadas para adherencia celular, distribuyendo 1 mL por pocillo con 12 pocillos de PC3 y 12 de LNCaP. Se incubaron por 24 horas a 37°C y 5% CO₂ para permitir su adhesión. Pasado ese tiempo se realizó el protocolo de transfección descrito en “Transfección celular”, generando 3 pocillos de PC3 transfectadas con el mimic vtARN2-1-5p, 4 pocillos de PC3 transfectadas con el mimic control, lo mismo para LNCaP y 10 pocillos sin transfectar, ver esquema en la ([fig. 16](#)).

A las 24 horas post-transfección, se reemplazó el medio de todas las condiciones, incluyendo los pocillos sin transfección.

Tratamiento con Docetaxel

A las 48 horas post-transfección, se realizó un tratamiento con docetaxel, una droga utilizada en terapias contra el cáncer, con el objetivo de inducir la muerte por apoptosis. Se incubaron las células por una hora con 10 nM de docetaxel para la línea PC3 y 5 nM de docetaxel para LNCaP y a continuación, se cambió el medio. Como control, dos pocillos de cada línea celular no recibieron tratamiento con docetaxel (uno transfectado con el mimic control y otro sin transfectar).

Ensayo de apoptosis

A las 24 horas post-tratamiento, se llevó a cabo el ensayo de apoptosis siguiendo el protocolo planteado por el fabricante. Para esto, se preparó buffer de unión a Anexina 1X con agua desionizada. También se preparó 100 µg/mL de solución de trabajo de PI diluyendo en buffer de unión a Anexina 1X. Se le retiró el medio a las células y se recolectó en tubos Eppendorfs 1,5 mL, se lavaron las células con 400 µL de PBS 1X, seguidamente se añadieron 300 µL de Tripsina y una vez desprendidas las células se agregaron 300 µL de medio RPMI 1640 completo y se transfirió a los tubos iniciales. Se centrifugó por a 500 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 100 µL en buffer 1X de unión a Anexina.

Se añadieron 2,5 µL de Anexina V conjugada a Alexa Fluor y 1 µL de solución de trabajo de PI 100 µg/mL a cada muestra, se mezcló e incubó por 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 400 µL de buffer de unión a Anexina 1X, se mezcló por pipeteo y se mantuvieron las muestras en hielo y protegidas de las luz, mientras se analizaron en citómetro de flujo C6 (BD Accuri™).

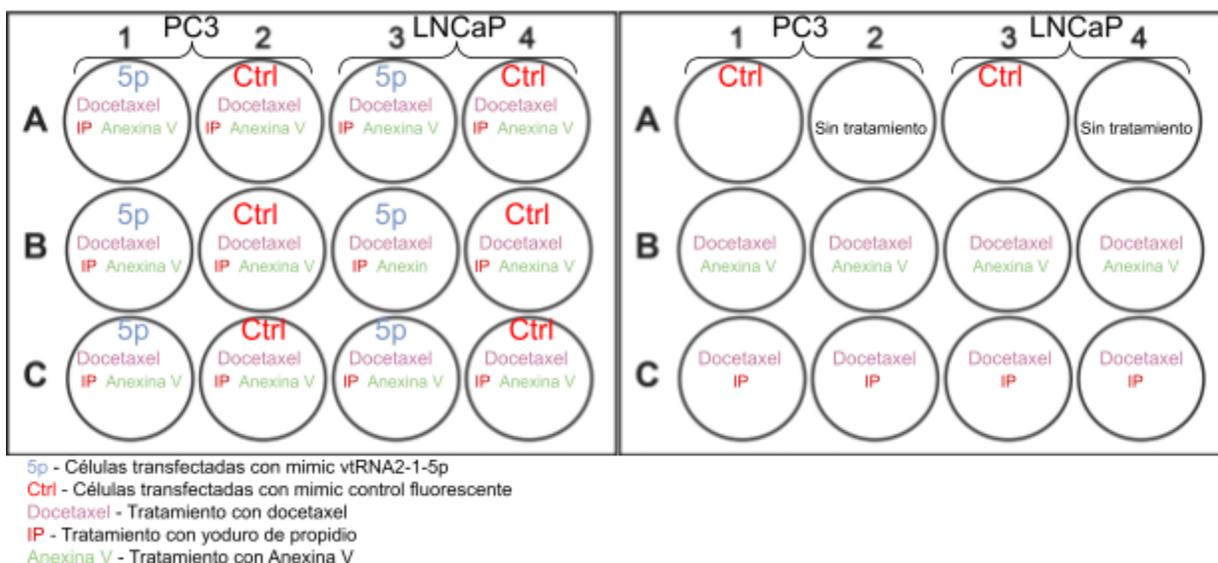


Figura 16. Diseño experimental del ensayo de apoptosis por citometría de flujo en líneas celulares PC3 y LNCaP. En la parte superior del pocillo se muestra con qué mimic fue transfectado (mimic vtARN2-1-5p con color celeste, mimic control con color rojo), seguido se muestra si fue tratado con docetaxel (violeta) o no, y por último si se incubaron las muestras con PI (bordó) y Anexina V (verde).

- **Análisis de la actividad de los posibles genes blancos del vtARN2-1-5p**

Los microARNs (miARNs) regulan la traducción de los ARNs mensajeros (ARNm) al unirse a sus secuencias blanco en la región 3' UTR del ARNm. Esta interacción puede provocar la degradación, inhibir su traducción o, en algunos casos, estabilizarlo (Fabian et al., 2010). La predicción de blancos de un miARN se basa en la identificación de secuencias complementarias en el extremo 3'UTR del ARNm, donde la región conocida como "semilla" del miARN reconoce su sitio diana mediante apareamiento de bases Watson-Crick. La región semilla abarca, generalmente, desde el nucleótido 2 al 8 del miARN, aunque su longitud puede variar (Bartel, 2018). En este trabajo, se utilizaron sitios canónicos de unión a la región semilla para la predicción de genes blanco, los cuales se muestran en la [figura 5](#).

Para la búsqueda de genes blancos predictivos de vtARN2-1-5p, se descargó un archivo multi-fasta con las secuencias de los transcritos según la base de datos de BioMart (<https://www.ensembl.org/info/data/biomart/index.html>) utilizando la anotación de *Ensembl Genes*, para el genoma humano. Se filtraron las regiones 3'UTR de los genes codificantes de proteína. Posteriormente, el archivo multi-fasta con las secuencias y los identificadores de genes se procesó con el comando *grep* para buscar la secuencia complementaria reversa de la región semilla de vtARN2-1-5p. Específicamente se definieron los sitios de unión *seed match* en sus diferentes variantes: *Offset 6mer*, *6mer*, *7mer-m8*, *7mer-A*, *8mer* (Bartel, 2018). Se generaron archivos independientes para cada sitio canónico de unión, que contenían los identificadores de los genes para los cuales se encontró complementariedad en el 3'UTR con la región semilla.

Posteriormente, estos archivos se consolidaron en una hoja de Excel, donde se eliminaron los genes repetidos. Finalmente, la lista de identificadores se subió a *Enrichr* (<https://maayanlab.cloud/Enrichr/enrich>) con el objetivo de analizar enriquecimiento en vías y términos de ontología génica para estos genes. Para ello, se utilizaron las bases de datos *WikiPathways 2024 Human* y *GO Cellular Component 2024*.

- **Análisis estadístico**

Los datos fueron graficados y analizados estadísticamente utilizando el software GraphPad Prism 8 (La Jolla, California, EE. UU., www.graphpad.com). Los resultados se presentan como la media \pm el desvío estándar. Las diferencias entre los grupos experimentales se evaluaron mediante un análisis de varianza de dos vías (2 way ANOVA). Se consideró estadísticamente significativo un $p < 0,05$, representado como (*), mientras que las diferencias no significativas se indicaron como (ns).

Resultados y discusión

- Extracción de ARN en líneas celulares de próstata

Con el fin de cuantificar por RT-qPCR la expresión de vtARN2-1-5p y vtARN2-1-3p en las líneas celulares de cáncer de próstata Du145, PC3, LNCaP y en la línea no tumoral RWPE1, se cultivaron las células Du145, PC3 y LNCaP y se procedió a realizar la extracción de ARN total con TRIzol® (Ambion®). Las muestras de RWPE1 no fueron cultivadas ya que se tenía células previamente almacenadas en TRIzol®. Se evaluó la concentración y pureza (relación A260/A280) del ARN mediante espectrofotometría (Nanodrop™, Thermo scientific™). En la [tabla 6](#) se presenta la concentración y la relación A260/280.

Tabla 6. Concentración y pureza del ARN total extraído de las líneas celulares .

Línea celular	Concentración (ng/μL)	260/280
Du145	1276,1	2,00
PC3	606,7	1,97
LNCaP	732,4	1,97
RWPEI	267.8	1.94

Las extracciones de ARN realizadas tuvieron un buen rendimiento, las concentraciones obtenidas fueron suficientes para los ensayos posteriores. La pureza de los ARNs fue óptima, con valores de A260/A280 superiores a 1,9 en todas las muestras, lo que indica una muestra de ARN de pureza óptima respecto a contaminación con proteínas.

- Cuantificación del vtARN2-1-5p/3p en líneas celulares de cáncer de próstata

Una vez obtenido el ARN en concentración y calidad necesaria se procedió a realizar la retrotranscripción. Se sintetizó ADN copia (ADNc) a partir de ARN 1μg de cada muestra, utilizando el kit All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection (GeneCopoeia™). Se

realizó la cuantificación de vtARN2-1-5p y vtARN2-1-3p por PCR en tiempo real (qPCR), utilizando los cebadores específicos para cada fragmento y cebadores del ARN pequeño nuclear U6 para usar como gen endógeno normalizador. Se realizaron controles negativos de cada cebador, donde no se le agregó ADN molde y no se obtuvo amplificación de estos controles de acuerdo a lo esperado. En la [figura 17A](#) se muestra el número de ciclos donde amplifica cada uno de los fragmentos vtARN2-1-5p y vtARN2-1-3p en las distintas líneas celulares y en la [figura 17B](#) se grafica el cambio relativo de los fragmentos con respecto a la línea celular RWPE1.

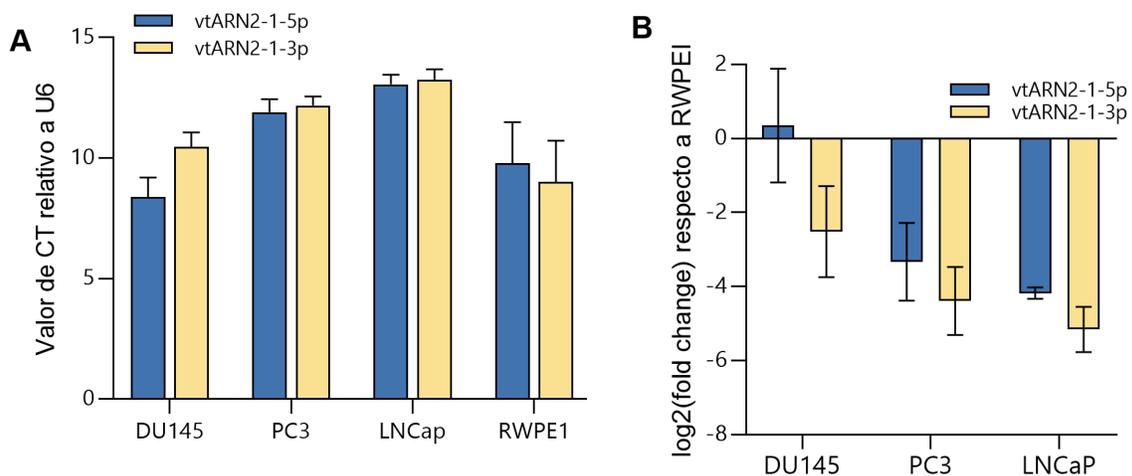


Figura 17. Cuantificación relativa de vtARN2-1-5p y vtARN2-1-3p por RT-qPCR en líneas celulares de próstata. (A) Se grafica el número de ciclos (CT) donde amplifica cada gen en cada línea celular, normalizado con el gen ARN nuclear U6. (B) Se grafica el logaritmo en base 2 del cambio relativo respecto a la línea celular RWPE1.

Se observó que el vtARN2-1-5p presenta mayor expresión (menores valores de CT) que vtARN2-1-3p en la línea celular tumoral DU145, mientras que en RWPE1 ocurre lo contrario, con respecto a PC3 y LNCaP no vemos un cambio en la expresión de los fragmentos ([fig. 17A](#)). A su vez, ambos fragmentos se encuentran menos expresados en las líneas tumorales en comparación con RWPE1, a excepción de DU145, donde el vtARN2-1-5p se encuentra sobreexpresado ([fig. 17B](#)). Este resultado es esperado por lo reportado por Fort et al., 2018 y 2020, donde se evidencia que en LNCaP y PC3 los

niveles de expresión de vtARN2-1 son muy bajos debido a que el promotor de vtARN2-1 se encuentra silenciado epigenéticamente. En contraste, DU145 expresa mayores niveles de vtARN2-1 debido a bajos niveles de metilación en su promotor Fort et al., 2018 y 2020.

Con base en estos resultados, se seleccionaron las líneas celulares tumorales PC3 y LNCaP para sobreexpresar a vtARN2-1-5p mediante transfección de un mimic sintético y realizar los estudios funcionales, ya que presentan niveles bajos de expresión de vtARN2-1-5p.

- **Evaluación de la eficiencia de transfección**

Para controlar y evaluar la eficiencia de transfección, se utilizó un mimic control fluorescente, lo cual permitió hacer un seguimiento mediante fluorescencia de las moléculas a transfectar. Las células fueron inicialmente sembradas en una placa de 12 pocillos y, tras 24 horas de cultivo, se realizó la transfección de 20 nM del mimic control utilizando Lipofectamina™ 3000 como agente de transfección.

Se realizó una inspección inicial de la fluorescencia utilizando el microscopio ZOE™ Fluorescent Cell Imager (Bio-Rad), se comprobó la distribución homogénea del mimic fluorescente en los pocillos transfectados. Luego de 72 horas post transfección se observaron las células y se obtuvieron fotografías, primero en campo claro para identificar células en los pocillos y luego bajo la fluorescencia del mimic control (fluorescencia color rojo) para identificar la señal del mismo. En la [figura 18](#), se muestran las imágenes obtenidas, observándose la fluorescencia proveniente del mimic control.

Al superponer las imágenes de campo claro y fluorescencia, logramos observar que la señal de fluorescencia del mimic coincide en gran medida con la ubicación de las células. Esto sugiere que el mimic control está ingresando a la célula como deseamos ([fig. 18](#)). A su vez, se observó que la señal de fluorescencia del mimic control era continua a las 24, 48 y 72 horas. De esta manera, verificamos que la señal no disminuye significativamente por degradación y/o dilución a lo largo de los tiempos en donde planeamos realizar los experimentos funcionales.

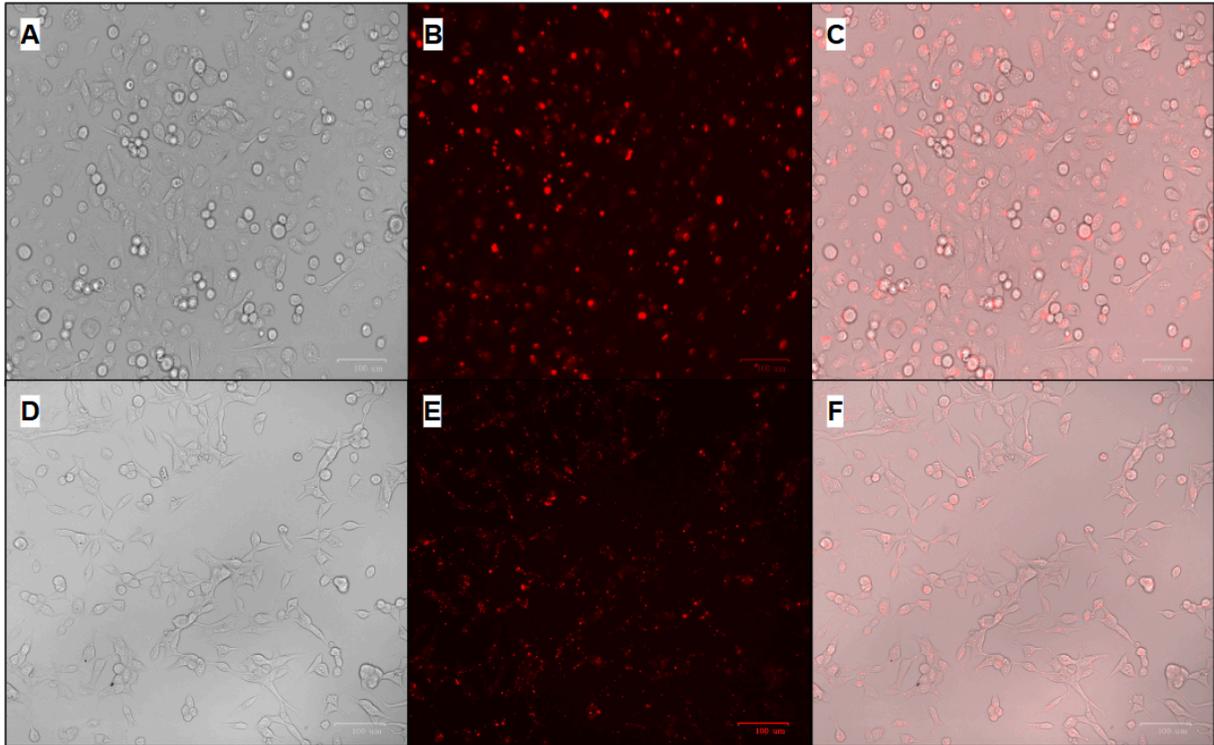


Figura 18. Evaluación de la eficiencia de transfección mediante microscopía. Imágenes microscópicas de las líneas celulares. Se muestra la línea celular PC3 en campo claro (A), Fluorescencia del mimic control (B) y superposición de ambas (C) y lo mismo se muestra para la línea celular LNCaP (D, E y F).

Para obtener una medida cuantitativa de la eficiencia de transfección procedimos a realizar un ensayo por citometría de flujo. Para ello, se analizaron células transfectadas con el mimic control fluorescente de manera convencional, otras con el mimic control fluorescente pero sin la adición del agente de transfección (se evalúa si la señal de fluorescencia corresponde a la internalización del ARN o a la adhesión a la membrana celular), y finalmente, otras células sin tratar para evaluar la autofluorescencia de base de las mismas ([fig. 19](#)).

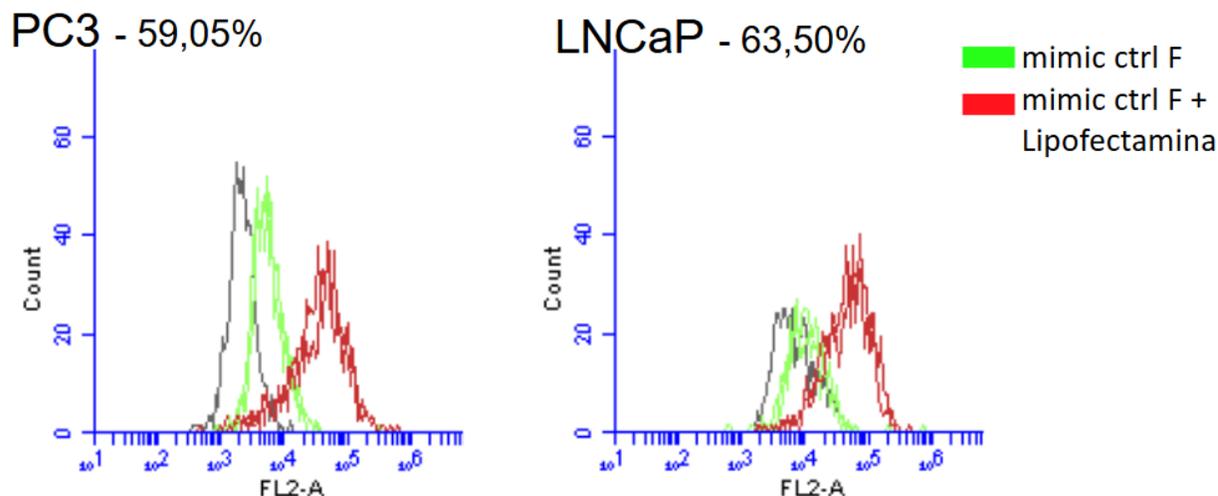


Figura 19. Evaluación de la eficiencia de transfección por citometría de flujo de células. Histograma de conteos de células y de intensidad de fluorescencia (escala logarítmica). En color gris se muestra el histograma de las células sin tratar, en color verde las células expuestas al mimic control fluorescente sin agente de transfección, y en color rojo las células transfectadas con el mimic control fluorescente con lipofectamina. En la parte superior de la imagen se indica el porcentaje de eficiencia de transfección para cada línea celular calculado como % de células transfectadas - % de células con mimic sin agente de transfección.

Luego de analizar por citometría de flujo a las diferentes células ensayadas establecimos el umbral de autofluorescencia de las líneas celulares PC3 y LNCaP. A continuación, analizamos la fluorescencia de las células del mimic control sin la adición del reactivo de transfección (entendido como adhesión inespecífica del mimic a las células), y observamos que un 33,25% en PC3 y un 2,05% en LNCaP de células superaban el umbral de autofluorescencia. Esta fluorescencia que persiste luego de 2 lavados con PBS 1X se entiende como adhesión inespecífica del mimic control a la membrana celular, dada la ausencia del agente de transfección que permitiría su internalización. En el caso de las células transfectadas con el mimic control fluorescente y la adición del agente de transfección un 92,30% y un 67,20% de células superaron el umbral de autofluorescencia para PC3 y LNCaP, respectivamente. Se procedió a corregir estos valores restando la fluorescencia inespecífica, observándose un rendimiento de transfección global de 59,05% para PC3 y 65,5% para LNCaP ([fig. 19](#)). Estas eficiencias de transfección corregidas indican una buena proporción de

células en las que estaría ingresando el mimic control fluorescente en la condiciones testeadas. Estos niveles de transfección serían adecuados para generar cambios significativos a nivel molecular tras la transfección.

Llamativamente, se observaron diferencias en la adhesión inespecífica del mimic control fluorescente para las líneas celulares PC3 y LNCaP que consideramos podría deberse a diferencias en las propiedades fisicoquímicas de las membranas de las mismas. Esto podría explicarse por diferencias en componentes de membrana, que generan variaciones en la densidad de carga de la superficie, afectando la atracción o repulsión de las moléculas como el mimic ARN. Entre los componentes diferenciales ya reportados para las líneas celulares LNCaP y PC3 se encuentran diversas proteínas de membrana involucradas en la adhesión celular (Bonaccorsi et al., 2000). Asimismo, estas diferencias en la adhesión se pueden percibir mediante observación de la morfología celular al microscopio óptico en un mismo sustrato, ver figuras [13](#) y [18](#).

- **Cuantificación del vtARN2-1-5p en líneas celulares transfectadas**

Para confirmar la correcta transfección y sobreexpresión del mimic vtARN2-1-5p, se realizó RT-qPCR de células PC3 y LNCaP transfectadas con 20 nM del mimic vtARN2-1-5p o del mimic control en iguales condiciones a las testeadas anteriormente. Luego de 48 horas post-transfección, se procedió a hacer la extracción del ARN total utilizando TRIzol[®], seguida de la retrotranscripción para generar el ADNc. Por último, la expresión de vtARN2-1-5p fue cuantificada mediante qPCR, utilizando al ARN nuclear U6 como transcripto endógeno normalizador. Se graficó el cambio relativo de la expresión de vtARN2-1-5p en las líneas celulares transfectadas con el mimic vtARN2-1-5p respecto a las transfectadas con control mimic fluorescente ([fig. 20](#)).

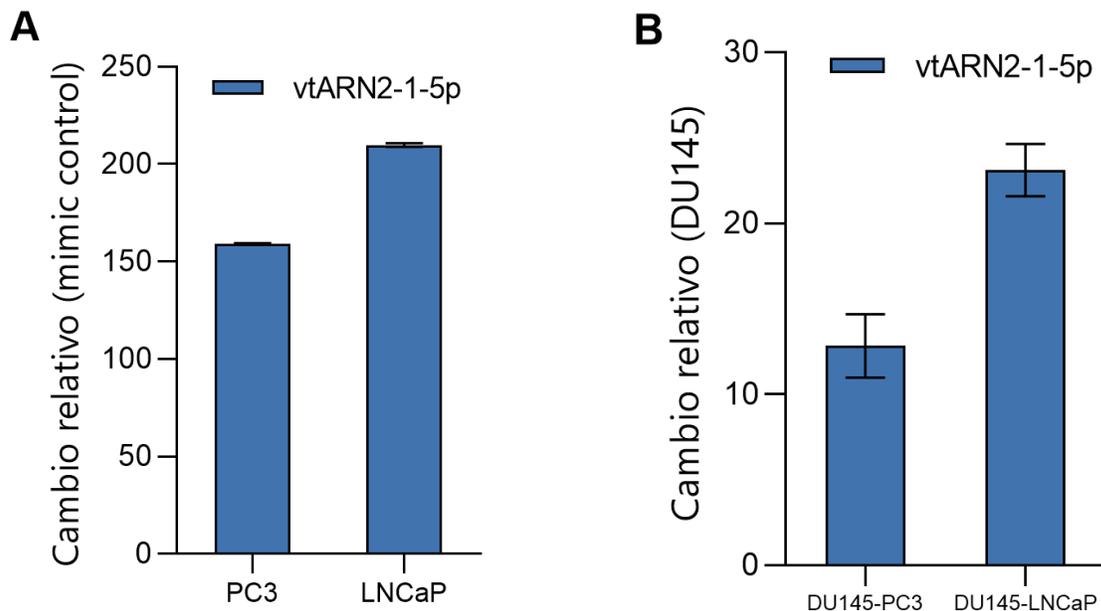


Figura 20. Gráfico de barras del cambio relativo en la expresión de vtARN2-1-5p determinado por RT-qPCR. (A) Se grafica el cambio relativo de la expresión del vtARN2-1-5p en PC3 y LNCaP con respecto al control. (B) Se grafica el cambio relativo de la expresión basal del vtARN2-1-5p en DU145 en comparación con la expresión de PC3 o LNCaP.

La transfección con el mimic vtARN2-1-5p provocó un aumento en su expresión, de unas 159 veces en PC3 y 210 veces en LNCaP. Comparativamente, en las células parentales observamos que los niveles de expresión endógenos de vtARN2-1-5p en DU145 es aproximadamente 13 veces más alta que PC3 y 23 veces más alta que LNCaP. Por tanto, si bien logramos buenos niveles de sobreexpresión de vtARN2-1-5p estos se encuentran por encima de los niveles endógenos de DU145. Sin embargo, se encuentran dentro de los niveles fisiológicos de la expresión de microARNs y es comparable con lo reportado en la literatura para este ARN, en el trabajo de Knog y colaboradores transfectaron 50nM del mimic vtARN2-1-5p (Kong et al., 2015; Li et al., 2011). De todas maneras, no podemos descartar que los niveles de sobreexpresión obtenidos puedan generar algún problema fisiológico en las células. Globalmente,

consideramos que 20 nM es una buena concentración de partida para en los ensayos iniciales testear los efectos de la sobreexpresión de vtARN2-1-5p.

- **Evaluación de la viabilidad celular**

Con el objetivo de determinar si el vtARN2-1-5p participa en la modulación de la viabilidad celular en las líneas celulares de cáncer de próstata, se realizó un ensayo de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).

Este ensayo se basa en el principio de que la actividad mitocondrial se mantiene constante en la mayoría de las células viables, y que una disminución en el número de células viables se correlaciona de forma lineal con dicha actividad (Riss et al., 2013). La enzima succinato deshidrogenasa es capaz de reducir el MTT a cristales insolubles de formazán. Los cristales son posteriormente solubilizados en DMSO, generando una solución de color violeta cuya absorbancia se mide a 570 nm, lo cual permite cuantificar la viabilidad celular.

La transfección de las líneas celulares PC3 y LNCaP con 20nM del mimic vtARN2-1-5p no mostró diferencias significativas en la viabilidad celular en comparación con las células transfectadas con el mimic control fluorescente ([fig. 21 A y D](#)). Adicionalmente, se repitió el ensayo utilizando concentraciones menores (5 nM y 1 nM) para evaluar que existiera una sobrecarga de ARN exógeno que afectara artificialmente los resultados obtenidos de viabilidad ([fig. 21 B, C, E y F](#)). Cuando disminuimos las concentraciones (5 nM y 1 nM) tampoco observamos cambios significativos en la viabilidad celular para ninguna de las líneas celulares testeadas ([fig. 21 B, C, E y F](#)). Estos resultados sugieren que el vtARN2-1-5p no modula la viabilidad celular de las células tumorales de próstata PC3 y LNCaP, bajo las condiciones experimentales utilizadas.

Complementariamente, también se cuantificó la viabilidad celular de DU145 transfectada con 20 nM, para evaluar si en una línea celular que ya expresa altos niveles de vtARN2-1-5p endógenos podríamos generar algún cambio que no fuera compatible con células que no poseen niveles altos del mismo. De todas maneras, no se observaron cambios significativos para esta línea celular ([fig. 21 G](#)). Conjuntamente

los resultados evidencian que en las condiciones testeadas no se observan cambios en la viabilidad celular producto de la sobreexpresión de vtARN2-1-5p para las líneas celulares modelos de cáncer de próstata LNCaP, PC3 y Du145.

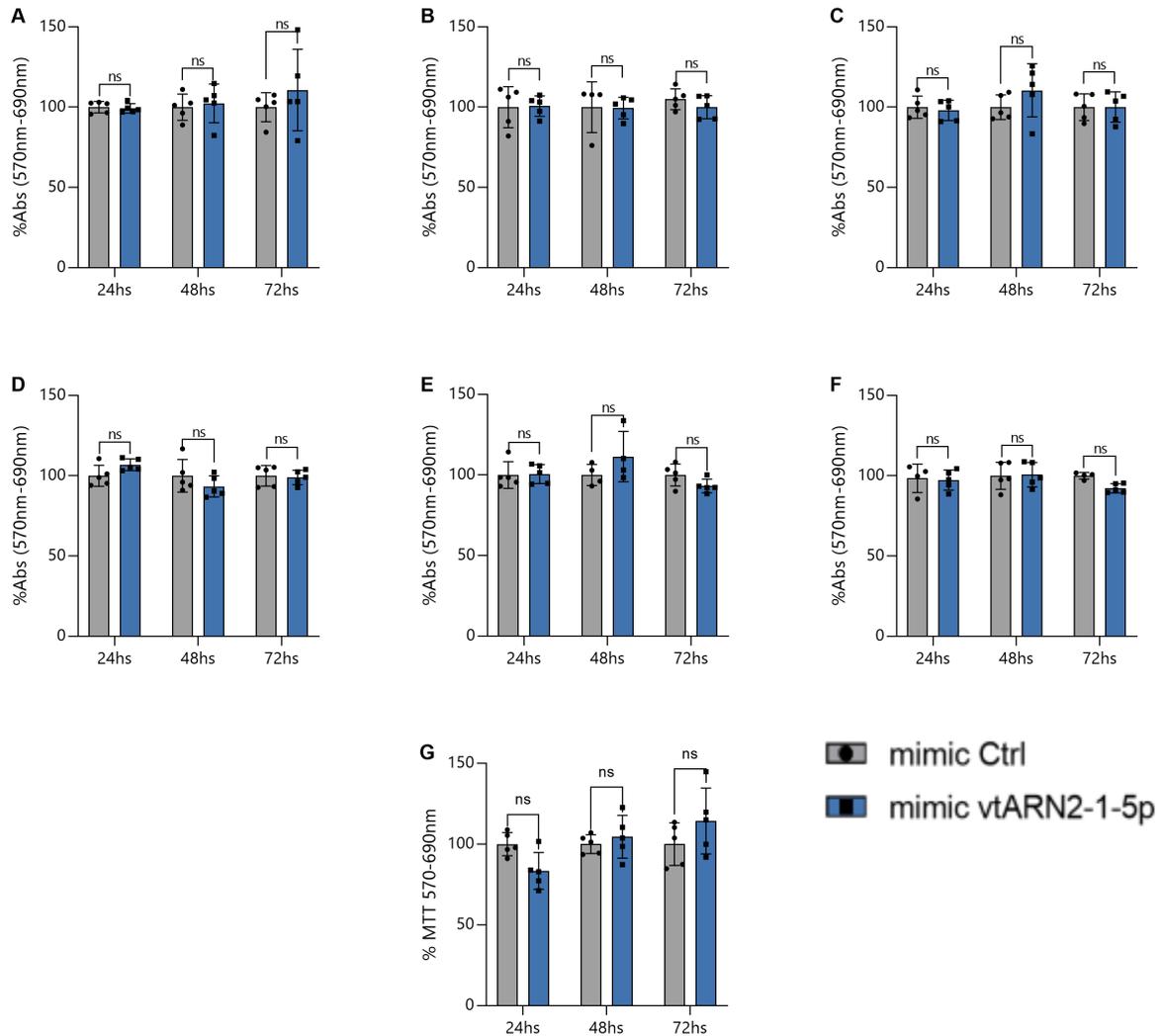


Figura 21. Evaluación de la viabilidad celular mediante ensayos de MTT. Gráficos de barras que muestran la viabilidad celular de la sobreexpresión de vtARN2-1-5p. Se muestran la línea PC3 transfectada con 20 nM (A), 5 nM (B) y 1 nM (C), LNCaP transfectado con 20 nM (D), 5 nM (E) y 1 nM (F) y DU145 transfectado con 20 nM (G) de ARN mimic vtARN2-1-5p (barras azules) y su respectivo control mimic fluorescente (barras grises). Las diferencias no significativas se indicaron como (ns).

- Evaluación de la apoptosis

A continuación, se evaluó si el vtARN2-1-5p es capaz de modular otro fenotipo tumoral importante para el cáncer como lo es la resistencia a la apoptosis. Para ello, se utilizó el Kit de Dead Cell Apoptosis Kits with Annexin V for Flow Cytometry (Invitrogen™). Este kit permite determinar entre células viables (IP-/Anexina V-), células apoptóticas tempranas (IP-/Anexina V+), células apoptóticas tardías (IP+/Anexina V+) y células necróticas (IP+/Anexina V-).

Se indujo la apoptosis mediante tratamiento con Docetaxel durante una hora como se ha reportado en la literatura (Yang et al., 2019). El Docetaxel es una droga de quimioterapia utilizada en el tratamiento del cáncer de próstata. Luego se analizó por citometría de flujo la fluorescencia correspondiente a cada señal y se cuantificó el porcentaje de células en cada categoría ([fig. 22](#)).

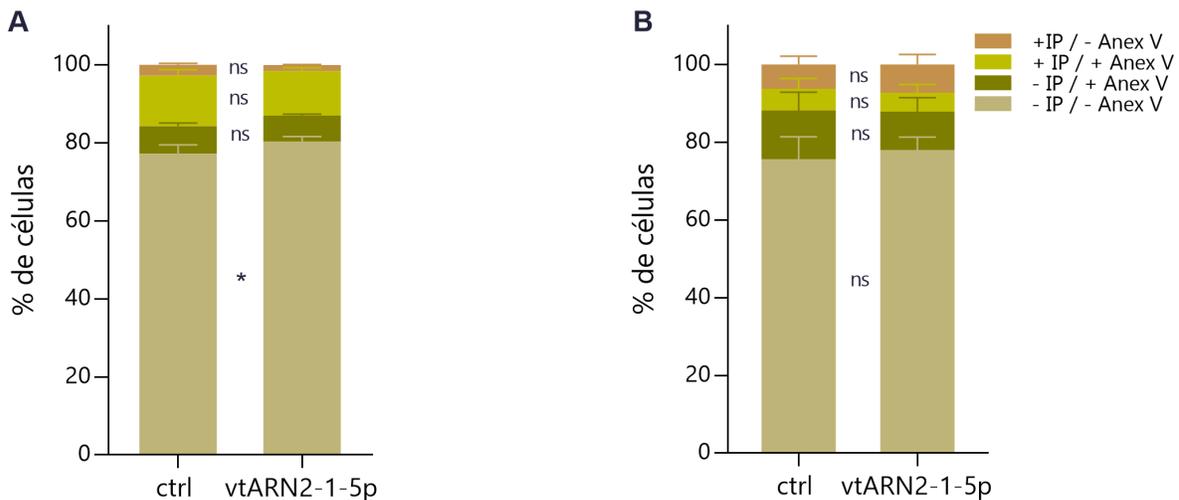


Figura 22. Análisis de apoptosis temprana mediante citometría de flujo. Se muestran los porcentajes de células vivas (- IP/- Anex V), en apoptosis temprana (- IP /+ Anex V), apoptosis tardía (+ IP /+ Anex) y necrosis (+ IP /- Anex V) en las líneas celulares PC3 (A) y LNCaP (B), transfectadas con el mimic control o el mimic vtARN2-1-5p.

Solo para la línea celular PC3, se observó que la sobreexpresión del vtARN2-1-5p contribuye con una mayor proporción (3,1%) de células viables tras el tratamiento con Docetaxel, en comparación con el mimic control fluorescente. Si bien también se

observó una tendencia a la disminución de células en apoptosis temprana y necrosis, estas diferencias no alcanzan a ser significantes ([fig 22 A](#)). Para LNCaP no se detectaron cambios significativos entre las condiciones analizadas ([fig 22 B](#)).

Estos resultados sugieren que el fragmento vtARN2-1-5p podría generar cierta (3,1%) protección frente a la muerte celular inducida por Docetaxel en la línea celular PC3, que iría de acuerdo a la hipótesis funcional. Sin embargo, consideramos que es un efecto leve y que probablemente el mismo no tenga un impacto fisiológico que sea biológicamente significativo. En este mismo sentido, el fragmento vtARN2-1-5p no mostró modulación de las fracciones de células en cada grupo para la línea celular LNCaP.

Globalmente, los resultados de viabilidad celular y apoptosis temprana evidencian que el vtARN2-1-5p no sería capaz de modular estos atributos tumorales en las condiciones testeadas. Los resultados obtenidos por nosotros para la viabilidad celular y apoptosis de PC3 concuerdan con lo reportado previamente por Kong y colaboradores en 2015. Esto inicialmente nos parecía congruente con que la línea celular PC3 posee el gen de p53 deletado y por tanto, no se evidenciaría el efecto funcional relacionado a su modulación. El gen p53 es uno de los blancos de acción validados experimentalmente para vtARN2-1-5p en cáncer de cérvix. En este contexto, consideramos que si se podría observar un cambio en el fenotipo de la línea celular LNCaP por modulación de p53, debido a posee un status *wild type* (WT) para el gen p53 ó para DU145 que expresa una versión mutada de p53. Esto podría generar un interesante modelo para su validación como blanco del vtARN2-1-5p. Sin embargo, el conjunto de resultados obtenidos evidencia que este no sería el caso y por tanto, debemos evaluar otros atributos tumorales y/o plantear una nueva hipótesis para el efecto de vtARN2-1-5p en cáncer de próstata.

- **Búsqueda de blancos de vtARN2-1-5p**

Con el objetivo de identificar posibles genes blanco de acción de vtARN2-1-5p y dilucidar nuevas posibles vías biológicas que puedan ser moduladas por este ARNnc, realizamos la búsqueda de genes blancos para vtARN2-1-5p. Esto lo hicimos mediante

la predicción bioinformática de complementariedad entre la región semilla de vtARN2-1-5p y las secuencias 3'UTR de todos los genes humanos codificantes. Para ello, se descargaron las secuencias de los 3'UTR de genes codificantes de proteínas del genoma humano de la base de datos de anotación *Ensembl Genes*. Se buscó aquellas secuencias que tuvieran complementariedad inversa con la región semilla del vtARN2-1-5p. Se consideraron 5 tipos de interacción según las regiones semillas canónicas: *Offset 6mer*, *6mer*, *7mer-m8*, *7mer-A*, *8mer* descritas por Bartel y colaboradores en 2018 (Bartel, 2018). Como resultado, se obtuvieron 2759 genes (grupo de genes blanco predictivo marginal) con un sitio de unión potencial para alguna de las regiones semilla. A su vez, se seleccionó un grupo de posibles genes blancos con complementariedad con regiones semilla de 7 nucleótidos o más (*7mer-m8*, *7mer-A*, *8mer*), por tratarse de interacciones más estables y por tanto con mayor posibilidad de generar un efecto funcional (Bartel, 2018), obteniéndose 944 genes (grupo de genes blanco predictivo fuertes).

Ambas listas de genes fueron sometidas al análisis de enriquecimiento funcional utilizando la herramienta *Enrichr*, analizando el vínculo en vías de señalización (*WikiPathway 2024* y *KEGG 2021 Human*) y términos ontológicos de componentes celulares (*GO Cellular Component 2025*).

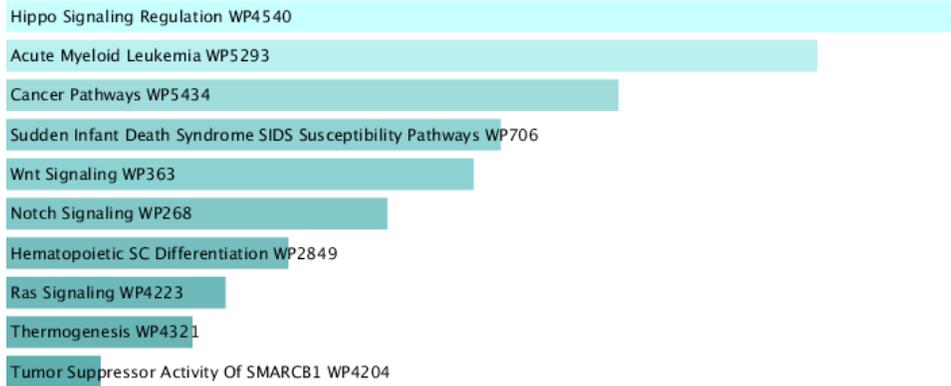
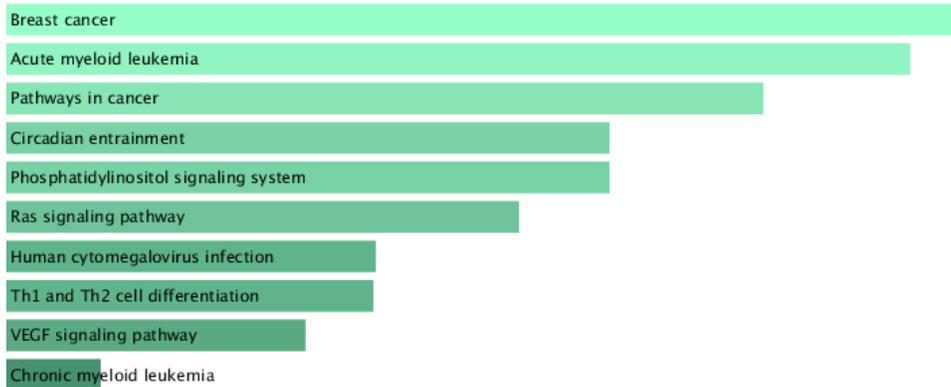
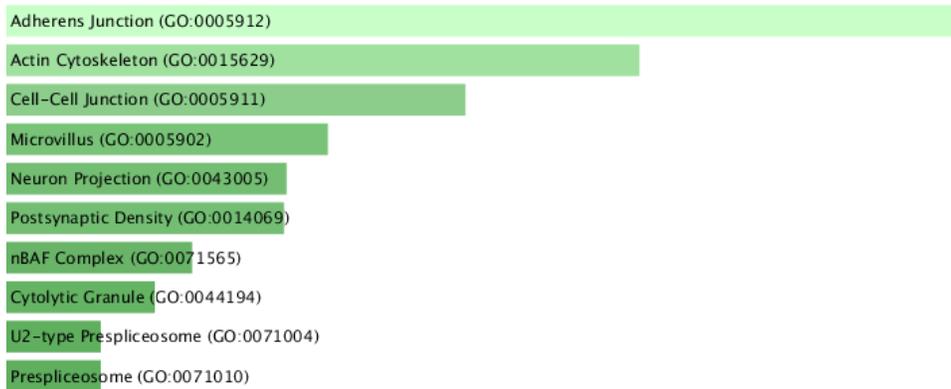
A**WikiPathway 2024 Human****B****KEGG 2021 Human****C****GO Cellular Component 2025**

Figura 23. Asociación de los genes blanco predictivo marginal de vtARN2-1-5p con vías, procesos y términos ontológicos. Top 10 términos enriquecidos en las bases de datos *WikiPathway 2024 Human* (A), *KEGG 2021 Human* (B), y de *Gene Ontology Cellular Component 2025* (C), para el grupo genes blanco predictivo marginal. Las barras evidencian

el valor de significancia estadística (-log₁₀(p-valor)) para la asociación del término.

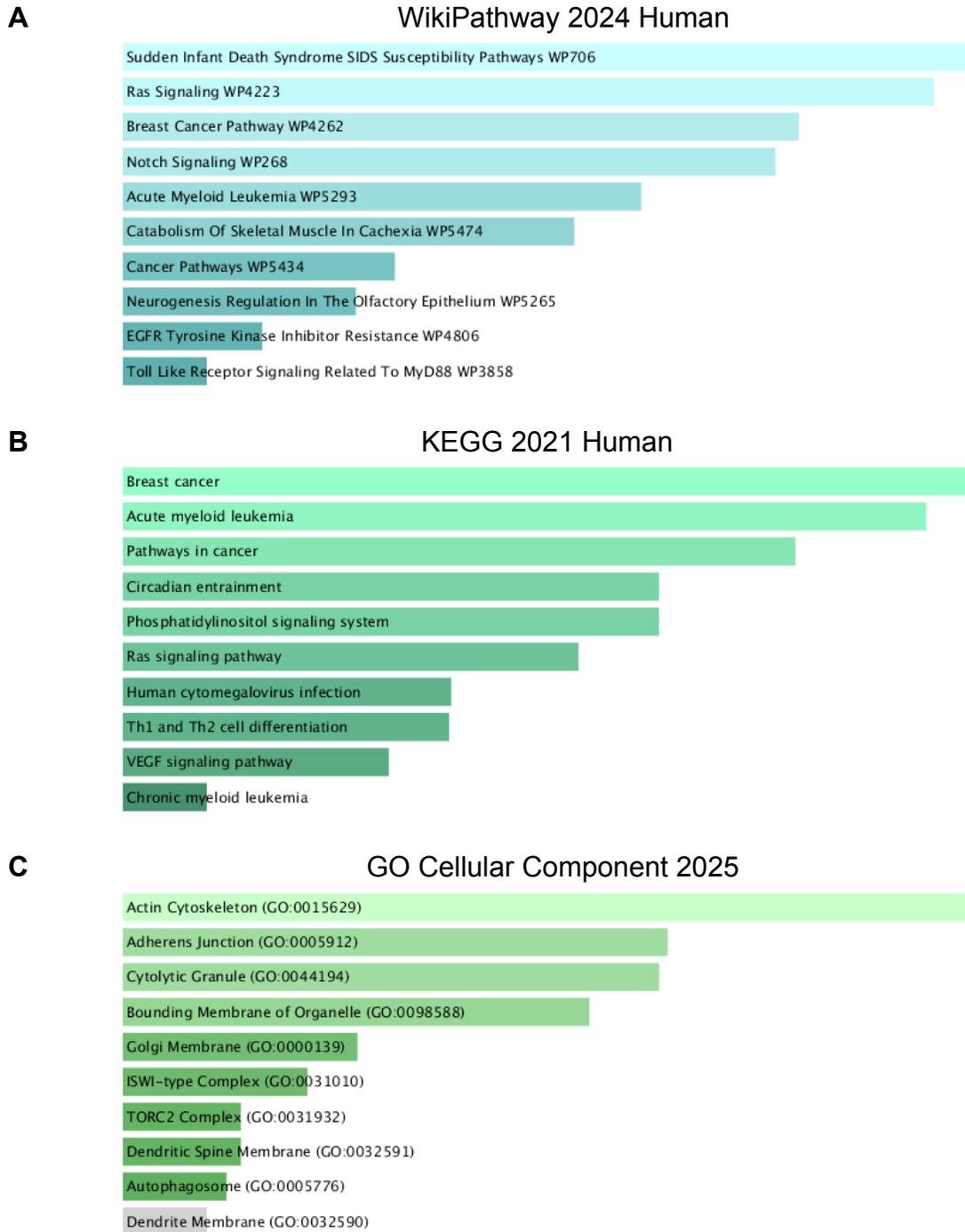


Figura 24. Asociación de los genes blanco predictivo fuertes de vtARN2-1-5p con vías,

procesos y términos ontológicos. Top 10 términos enriquecidos en las bases de datos *WikiPathway 2024 Human* (A), *KEGG 2021 Human* (B), y de *Gene Ontology Cellular Component 2025* (C), para el grupo de genes blanco predictivo fuertes. Las barras evidencian el valor de significancia estadística ($-\log_{10}(\text{p-valor})$) para la asociación del término.

En las [figuras 23](#) y [24](#) se muestran los 10 términos enriquecidos de vías y términos de ontología génica asociados a vtARN2-1-5p en función de los genes blancos predictivos. Hipotetizamos que las vías asociadas podrían verse moduladas porque posiblemente los genes predictivos puedan ser silenciados por el vtARN2-1-5p, por poseer en su 3' UTR un sitio complementario a la región semilla de vtARN2-1-5p. En las [tablas 7](#) y [8](#) se muestran específicamente aquellas vías que tienen un p-valor ajustado menor a 0,1 y alguno de los genes vinculados en esas vías.

Tabla 7. Vías de *WikiPathways 2024 Human* significativamente enriquecidas en el grupo de genes blanco predictivo marginal. Se muestra el término, el P-valor ajustado, el número de genes implicados y algunos ejemplos relevantes.

Término	P-valor ajustado	Número de genes	Ejemplo de genes
Hippo Signaling Regulation WP4540	0,02763582559	29	FLT4, LEF1, IGF1R
Acute Myeloid Leukemia WP5293	0,02763582559	22	STAT5B, SPI1, STAT3
Cancer Pathways WP5434	0,04632164745	99	KEAP1, CALML3
Sudden Infant Death Syndrome SIDS Susceptibility Pathways WP706	0,05433210493	38	IL1RN, ADCYAP1R1
Wnt Signaling WP363	0,05433210493	16	PRKCB, CSNK1D

Tabla 8. Vías enriquecidas en el grupo de genes blanco predictivo fuertes. Se muestra el término, el P-valor ajustado, el número de genes implicados y algunos ejemplos relevantes.

Término	P-valor ajustado	Número de genes	Ejemplo de genes
Sudden Infant Death Syndrome SIDS Susceptibility Pathways WP706	0,03818258262	20	NTRK2, CHRNA7
Ras Signaling WP4223	0,03818258262	22	PLA2G2F, SHC2
Breast Cancer Pathway WP4262	0,04007449457	19	JAG2, NOTCH3
Notch Signaling WP268	0,04007449457	9	LFNG, NOTCH1

Entre las vías enriquecidas se destacan las vías “Hippo Signaling Regulation ID:WP4540” que es una vía de señalización que es capaz de regular el tamaño de los órganos, la proliferación celular, la apoptosis y la renovación de células madres, actuando como supresor de tumor (Zhao et al., 2010). Por otro lado, “Cancer Pathways ID:WP5434” agrupa múltiples vías alteradas en distintos tipos de cáncer (Hanspers & Weitz, 2025). Otra vía destacada es “Wnt Signaling ID:WP363” implicada en el mantenimiento de células madres cancerosas, metástasis y regulación inmune (Zhan et al., 2017). “Ras Signaling WP4223” es una vía que entre sus variadas funciones, controla la proliferación, supervivencia, crecimiento, migración y diferenciación celular. Por último, la vía “Notch Signaling WP268” esta vía puede actuar tanto como supresor de tumor, así como oncogénico en varios tipos de cáncer. Su desregulación se ha asociado con la transición epitelial-mesenquimal y la angiogénesis así como la proliferación, la invasión y la metástasis (Shi et al., 2024).

Si bien entre las vías predichas se incluyen procesos como proliferación y apoptosis, nuestros ensayos fenotípicos indican que vtARN2-1-5p no modula estos procesos en las líneas PC3 y LNCaP en las condiciones testadas. Sin embargo, otras rutas señaladas se relacionan con procesos de migración, invasión, diferenciación celular y metástasis, lo cual abre nuevas hipótesis experimentales a testear.

Consideramos interesante mencionar que en este trabajo los ensayos fueron realizados con líneas celulares derivadas de metástasis, por lo que no se puede descartar que el efecto del vtARN2-1-5p sea relevante en etapas tempranas del desarrollo tumoral, actuando en el desarrollo del tumor primario y ahí sí favorecer la proliferación, migración o progresión tumoral y sea por esta razón que no evidenciamos cambios significativos en estas líneas celulares.

- **Comparación metodológica con estudios previos**

Diversas publicaciones han modulado la expresión del vtARN2-1-5p en líneas celulares tumorales. Por este motivo, a continuación se presentan y comparan las metodologías utilizadas en dichos estudios con la empleada en este trabajo.

El grupo de Li y colaboradores utilizó la línea celular epitelial cervical humana H8 (inmortalizada con HPV16), a la cual transfectaron con 50nM del mimic vtARN2-1-5p, y la línea siHa (HPV16+, derivada de carcinoma de células escamosas de cuello uterino humano), a la que transfectaron con un siARN inhibidor del vtARN2-1-5p, ambas líneas celulares también fueron transfectadas con un control negativo. Al realizar un ensayo de viabilidad celular por MTT con las células H8 transfectadas con el mimic vtARN2-1-5p, observaron un aumento significativo de la viabilidad de las células. Por otro lado, realizaron un ensayo de apoptosis en las células SiHa transfectadas con el inhibidor y se observó un aumento de la apoptosis (Li et al., 2011). Es importante destacar que en este reporte o al menos nosotros no fuimos capaces de encontrar la secuencia de mimic de vtARN2-1-5p utilizada.

Posteriormente, en el trabajo de Kong y colaboradores se corroboró estos resultados en las líneas SiHa y HeLa, transfectando el mimic y el inhibidor del vtARN2-1-5p con sus respectivos controles. La secuencia utilizada para sintetizar el mimic vtARN2-1-5p y el inhibidor coinciden con la secuencia utilizada en este trabajo. A través de un ensayo de MTT, reportaron un aumento en la viabilidad en ambas líneas celulares transfectadas con el mimic vtARN2-1-5p y una disminución de la viabilidad celular cuando se inhibe el fragmento. Además, observaron que el inhibidor del vtARN2-1-5p

reducía también la expresión de su precursor el vtARN2-1, mientras que la sobreexpresión no genera cambios en el (Kong et al., 2015).

En otro estudio, Zhang y colaboradores (L.-L. Zhang et al., 2014) transfectaron células MCF7 (línea celular de cáncer de mama) con un mimic de vtARN2-1-5p y un plásmido con un inhibidor con sus respectivos controles. En los ensayos de MTT, observaron una disminución de la viabilidad celular tras la inhibición del vtARN2-1-5p, aunque no presentan un análisis estadístico en el gráfico, ni se aclara con qué grupo control se realizó la comparación. En el ensayo de apoptosis con tinción de Hoechst33342/PI, reportan un aumento significativo de la apoptosis en las células transfectadas con el inhibidor respecto al control, sin observar diferencias en las células que sobreexpresan el vtARN2-1-5p (L.-L. Zhang et al., 2014).

Finalmente, Xiang y colaboradores en 2019 sobreexpresó el vtARN2-1-5p mediante un plásmido lentiviral en células KMS-11 (línea celular de linfocitos de mieloma múltiple) y lo inhibieron con un plásmido de interferencia en células NCI-H929 (linfocitos B de un paciente con mieloma), la secuencia del vtARN2-1-5p utilizada en el plásmido no coincide completamente con la del mimic utilizado en este trabajo. No coincide con la secuencia verificada mediante análisis de datos de transcriptómica de ARNnc pequeños realizada por nuestro grupo (Fort et al. 2020) y tesis de grado del Licenciado Jake Sheppard. Xiang y colaboradores determinaron el efecto del vtARN2-1-5p en el crecimiento celular por un ensayo de CCK-8, detectaron que la sobreexpresión aumentaba la proliferación de las células KMS-11 (línea celular de mieloma humano), mientras que la inhibición disminuía la proliferación en NCI-H929 (línea celular de mieloma humano). A su vez, los ensayos de apoptosis mostraron que la sobreexpresión de vtARN2-1-5p disminuye la tasa de células KMS-11 apoptóticas, mientras que la inhibición promueve la apoptosis en NCI-H929 (Xiang et al., 2019).

En resumen, no se brindan o no fuimos capaces de encontrar las secuencias utilizadas para la sobreexpresión e inhibición del vtARN2-1-5p en los reportes de Li y Zhang, en el caso de Xiang y colaboradores la secuencia que reportan es diferente a la utilizada en el trabajo de Kong y a la que logramos confirmar bioinformáticamente (Kong et al., 2015; Li et al., 2011; Xiang et al., 2019; L. Zhang et al., 2020). Por lo tanto, no podemos

comparar directamente los resultados reportados previamente por otros grupos respecto a vtARN2-1-5p. De hecho, no podemos asegurar que los mismos sean estrictamente análogos a los testeados en este trabajo a diferencia del trabajo de Kong y colaboradores que utiliza la misma secuencia de vtARN2-1-5p que la utilizada en el presente trabajo. Adicionalmente, en base a lo reportado por Kong y colaboradores y experiencia previa en el laboratorio decidimos utilizar la estrategia de un mimic y no utilizar un inhibidor para vtARN2-1-5p, debido a que el inhibidor no solo va a tener complementariedad para el vtARN2-1-5p, sino que también por la naturaleza de su origen la tendrá con su precursor completo el vtARN2-1. Por tanto, el inhibidor podría afectar los niveles de expresión del vtARN2-1 como mostraron Kong y colaboradores (Kong et al., 2015).

Con respecto a la predicción de blancos de acción de vtARN2-1-5p, Li y colaboradores proponen al ARNm Bax como blanco del mismo. Sin embargo, reportan que solo cinco nucleótidos en la región semilla son complementarios a la región 3' UTR del ARNm de Bax (Li et al., 2011). Según la literatura específica del miARNs, la región semilla de un miARN es a partir de 6 nucleótidos, y es por eso que con nuestra estrategia no encontramos a Bax entre nuestros genes blancos predictivos. Sumado a esto, reportan que al sobreexpresar el vtARN2-1-5p, disminuye la expresión de Bax y al inhibir el fragmento, Bax aumenta, pero no se muestra un ensayo de reportero que valide que esta regulación sea por la unión específica de vtARN2-1-5p al 3' UTR de Bax (Li et al., 2011; Xiang et al., 2019).

Otro gen importante en el cáncer, reportado en los trabajos de Kong y Xiang como posible gen blanco de acción de vtARN2-1-5p es p53. Kong y colaboradores, muestran que el vtARN2-1-5p tiene complementariedad con p53 a través de un seed no canónico (poco frecuentes), los cuales no fueron tenidos en cuenta para la búsqueda de blancos de este trabajo, y es por este motivo que no encontramos a p53 como posible gen blanco regulado por vtARN2-1-5p. Sin embargo, a pesar de ser una interacción no canónica en el reporte de Kong y colaboradores realizan un ensayo reportero que valida que el vtARN2-1-5p puede unirse al 5' y 3' UTR de p53, y es capaz de disminuir

su expresión cuando este se sobreexpresa en cérvix (Kong et al., 2015; Xiang et al., 2019).

Conclusiones y perspectivas

Los antecedentes de este trabajo postulan a vtARN2-1-5p como un posible oncogén en la próstata, dado que se observó elevada su expresión en tejidos de cáncer de próstata respecto al tejido normal adyacente, y su expresión se asocia a peores parámetros clínicos de la enfermedad ([fig 11](#)). Además, se ha sugerido que podría cumplir una función tipo microARN al interactuar con el complejo RISC. En este trabajo, se buscó profundizar en el rol funcional de este pequeño fragmento derivado al 5' del vtARN2-1 en la biología del cáncer de próstata.

Mediante RT-qPCR, se confirmó que el vtARN2-1-5p se encuentra más expresado que el vtARN2-1-3p en las líneas celulares DU145, PC3 y LNCaP. A su vez, se observó que su expresión es menor en PC3 y LNCaP respecto a la línea no tumoral RWPE1. Esto era esperable debido al silenciamiento epigenético del precursor reportado en estas líneas celulares (Fort et al., 2018). En contraste, en DU145 la expresión del vtARN2-1-5p es mayor que en RWPE1, apoyando su posible rol en contextos tumorales.

El método de transfección utilizado resultó ser muy eficiente para lograr la sobreexpresión de vtARN2-1-5p. La incorporación del mimic control fluorescente permitió hacer un seguimiento de la transfección y confirmar su entrada en las células. Mediante ensayos de RT-qPCR se confirmó un incremento del vtARN2-1-5p en las líneas celulares PC3 y LNCaP, alcanzando un nivel de expresión suficientemente alto para evaluar cambios en atributos tumorales en células de próstata.

Los ensayos de viabilidad celular (ensayos de MTT) mostraron que la sobreexpresión del vtARN2-1-5p (20nM, 5nM y 1nM) no afecta la viabilidad de las líneas celulares PC3, LNCaP y DU145. En cuanto al fenotipo apoptótico, no se observaron efectos en células LNCaP, y sí bien podemos observar que en PC3 la sobreexpresión de vtARN2-1-5p genera una leve protección (3%) frente a la muerte celular inducida por Docetaxel, no podemos afirmar que este cambio sea una protección significativa biológicamente.

Dado que los ensayos fenotípicos se realizaron con líneas celulares derivadas de metástasis, se podría hipotetizar que el vtARN2-1-5p podría cumplir funciones en etapas más tempranas del desarrollo tumoral y, es por este motivo, que no logramos ver cambios en estas líneas celulares ya avanzadas en la carcinogénesis. Por esto, se considera necesario profundizar en su estudio utilizando líneas celulares modelos que representan estadios iniciales del cáncer de próstata como RWPE1.

Por último, se llevó a cabo la predicción bioinformática de genes blanco de acción del vtARN2-1-5p, lo cual permitió identificar vías de señalización asociadas a diversos procesos tumorales como la proliferación, migración, invasión, diferenciación y apoptosis. Estos resultados abren la posibilidad de explorar otros posibles fenotipos que este ARNnc podría modular que aún no hemos explorado.

En conjunto, los resultados obtenidos no permiten confirmar que el vtARN2-1-5p actúa como un oncogén en cáncer de próstata, ya que no logra modular características fenotípicas como viabilidad celular y la apoptosis como si se reportó en otros tipos de cáncer (Kong et al., 2015; Li et al., 2011; Xiao et al., 2012; L.-L. Zhang et al., 2014). Sin embargo, los datos obtenidos y las vías predichas nos motivan a continuar explorando su rol en otros aspectos de la biología tumoral.

Como perspectiva futura, entendiendo que logramos transfectar eficientemente al vtARN2-1-5p y que este podría afectar otros atributos tumorales hasta ahora no evaluados; es que se propone realizar un análisis transcriptómico en las líneas celulares PC3 y LNCaP sobreexpresando el vtARN2-1-5p. Estos ensayos nos permitirían identificar los genes que varían su expresión cuando se sobreexpresa el ARNnc. A partir de estos resultados, se podrían proponer nuevos ensayos funcionales, así como evaluar su posible rol como microARN.

También se propone confirmar si el vtARN2-1-5p se incorpora en la proteína AGO, y así verificar su posible función tipo miARN. Para esto, se plantea cultivar las líneas celulares PC3 y LNCaP sobreexpresando el vtARN2-1-5p e inmunoprecipitar la proteína AGO utilizando un anticuerpo específico. Luego, evaluar mediante RT-qPCR la presencia del vtARN2-1-5p en la fracción enriquecida de argonata.

La continuación de este proyecto puede aportar a la caracterización de un pequeño ARNnc en el cáncer de próstata y a la comprensión del rol de fragmentos de ARNnc poco estudiados en la progresión tumoral, lo que finalmente podría contribuir a la investigación de nuevos diagnósticos y tratamientos en el cáncer de próstata.

Bibliografía

- Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D., & Croce, C. M. (2015). MicroRNA and cancer – A brief overview. *Advances in Biological Regulation*, 57, 1-9.
<https://doi.org/10.1016/j.jbior.2014.09.013>
- Alagia, A., Tereňová, J., Ketley, R. F., Di Fazio, A., Chelysheva, I., & Gullerova, M. (2023). Small vault RNA1-2 modulates expression of cell membrane proteins through nascent RNA silencing. *Life Science Alliance*, 6(6), e202302054.
<https://doi.org/10.26508/lsa.202302054>
- American Cancer Society. (2023, agosto 1). *Tests Used on Biopsy and Cytology Samples to Diagnose and Classify Cancer*.
<https://www.cancer.org/cancer/diagnosis-staging/tests/biopsy-and-cytology-tests/testing-biopsy-and-cytology-samples-for-cancer/special-tests.html#:~:text=Although%20IHC%20stains%20are%20used,as%20breast%20and%20stomach%20cancer.>
- Amort, M., Nachbauer, B., Tuzlak, S., Kieser, A., Schepers, A., Villunger, A., & Polacek, N. (2015). Expression of the vault RNA protects cells from undergoing apoptosis. *Nature Communications*, 6(1), 7030. <https://doi.org/10.1038/ncomms8030>
- Anderson, D. H., Kickhoefer, V. A., Sievers, S. A., Rome, L. H., & Eisenberg, D. (2007). Draft Crystal Structure of the Vault Shell at 9-Å Resolution. *PLoS Biology*, 5(11), e318.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050318>
- Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20-51.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>
- Bhowmick, N. A., Neilson, E. G., & Moses, H. L. (2004). Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature*, 432(7015), 332-337. <https://doi.org/10.1038/nature03096>
- Bonaccorsi, L., Carloni, V., Muratori, M., Salvadori, A., Giannini, A., Carini, M., Serio, M., Forti, G., & Baldi, E. (2000). Androgen Receptor Expression in Prostate Carcinoma Cells

- Suppresses $\alpha\beta4$ Integrin-Mediated Invasive Phenotype¹. *Endocrinology*, 141(9), 3172-3182. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7640>
- Brawley, S., Mohan, R., & Nein, C. D. (2018). Localized Prostate Cancer: Treatment Options. *American Family Physician*, 97(12), 798-805.
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes *miR15* and *miR16* at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(24), 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Cancer Statistics Explorer Network. (2024, noviembre 5). *National Cancer Institute*.
- Cao, J., Song, Y., Bi, N., Shen, J., Liu, W., Fan, J., Sun, G., Tong, T., He, J., Shi, Y., Zhang, X., Lu, N., He, Y., Zhang, H., Ma, K., Luo, X., Lv, L., Deng, H., Cheng, J., ... Zhan, Q. (2013). DNA Methylation-Mediated Repression of miR-886-3p Predicts Poor Outcome of Human Small Cell Lung Cancer. *Cancer Research*, 73(11), 3326-3335. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-3055>
- Chodak, G. W., Keller, P., & Schoenberg, H. W. (1989). Assessment of Screening for Prostate Cancer Using the Digital Rectal Examination. *Journal of Urology*, 141(5), 1136-1138. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)41192-X](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)41192-X)
- Choo, R., Klotz, L., Danjoux, C., Morton, G. C., DeBoer, G., Szumacher, E., Fleshner, N., Bunting, P., & Hruby, G. (2002). Feasibility study: Watchful waiting for localized low to intermediate grade prostate carcinoma with selective delayed intervention based on prostate specific antigen, histological and/or clinical progression. *The Journal of Urology*, 167(4), 1664-1669.
- Cooper, J. (Ed.). (2023). *Occupational Therapy in Oncology and Palliative Care* (second edition). John Wiley & Sons.

- Costello, A. J. (2020). Considering the role of radical prostatectomy in 21st century prostate cancer care. *Nature Reviews Urology*, 17(3), 177-188.
<https://doi.org/10.1038/s41585-020-0287-y>
- Crawford, E. D., Higano, C. S., Shore, N. D., Hussain, M., & Petrylak, D. P. (2015). Treating Patients with Metastatic Castration Resistant Prostate Cancer: A Comprehensive Review of Available Therapies. *Journal of Urology*, 194(6), 1537-1547.
<https://doi.org/10.1016/j.juro.2015.06.106>
- Daneshpour, A., Rezvanimehr, A., Niktalab, P., Sharif, H., Yazdanpanah, N., Saleki, K., & Rezaei, N. (2025). Exploring the role of vault complex in the nervous system: A literature review. *Reviews in the Neurosciences*, 36(3), 327-338.
<https://doi.org/10.1515/revneuro-2024-0112>
- Estadificación del cáncer. (2022, octubre 14). [NIH]. *National Cancer Institute*.
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/estadificacion>
- Evan, G. I., & Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411(6835), 342-348. <https://doi.org/10.1038/35077213>
- Fabian, M. R., Sonenberg, N., & Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annual Review of Biochemistry*, 79(1), 351-379.
<https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060308-103103>
- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2019). Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *International Journal of Cancer*, 144(8), 1941-1953.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31937>
- Fort, R. S., & Duhagon, M. A. (2021). Pan-cancer chromatin analysis of the human vtRNA genes uncovers their association with cancer biology. *F1000Research*, 10, 182.
<https://doi.org/10.12688/f1000research.28510.2>

- Fort, R. S., Garat, B., Sotelo-Silveira, J. R., & Duhagon, M. A. (2020). vtRNA2-1/nc886 Produces a Small RNA That Contributes to Its Tumor Suppression Action through the microRNA Pathway in Prostate Cancer. *Non-Coding RNA*, 6(1), Article 1.
<https://doi.org/10.3390/ncrna6010007>
- Fort, R. S., Mathó, C., Geraldo, M. V., Ottati, M. C., Yamashita, A. S., Saito, K. C., Leite, K. R. M., Méndez, M., Maedo, N., Méndez, L., Garat, B., Kimura, E. T., Sotelo-Silveira, J. R., & Duhagon, M. A. (2018). Nc886 is epigenetically repressed in prostate cancer and acts as a tumor suppressor through the inhibition of cell growth. *BMC Cancer*, 18(1), 127.
<https://doi.org/10.1186/s12885-018-4049-7>
- Gallo, S., Kong, E., Ferro, I., & Polacek, N. (2022). Small but Powerful: The Human Vault RNAs as Multifaceted Modulators of Pro-Survival Characteristics and Tumorigenesis. *Cancers*, 14(11), 2787. <https://doi.org/10.3390/cancers14112787>
- Gao, W., Shen, H., Liu, L., Xu, J., Xu, J., & Shu, Y. (2011). MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 137(4), 557-566.
<https://doi.org/10.1007/s00432-010-0918-4>
- García, M. A., Gil, J., Ventoso, I., Guerra, S., Domingo, E., Rivas, C., & Esteban, M. (2006). Impact of Protein Kinase PKR in Cell Biology: From Antiviral to Antiproliferative Action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 70(4), 1032-1060.
<https://doi.org/10.1128/MMBR.00027-06>
- Grado del tumor. (2022, agosto 1). [NIH]. *National Cancer Institute*.
<https://www.cancer.gov/espanol/cancer/diagnostico-estadificacion/diagnostico/grado-del-tumor>
- Han, Z.-B., Zhong, L., Teng, M.-J., Fan, J.-W., Tang, H.-M., Wu, J.-Y., Chen, H.-Y., Wang, Z.-W., Qiu, G.-Q., & Peng, Z.-H. (2012). Identification of recurrence-related microRNAs in

- hepatocellular carcinoma following liver transplantation. *Molecular Oncology*, 6(4), 445-457. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2012.04.001>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.cd-21-1059>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hanspers, K., & Weitz, E. (2025, marzo 4). *Cancer pathways (WP5434)*. <https://www.wikipathways.org/instance/WP5434>
- Hussain, S., Sajini, A. A., Blanco, S., Dietmann, S., Lombard, P., Sugimoto, Y., Paramor, M., Gleeson, J. G., Odom, D. T., Ule, J., & Frye, M. (2013). NSun2-Mediated Cytosine-5 Methylation of Vault Noncoding RNA Determines Its Processing into Regulatory Small RNAs. *Cell Reports*, 4(2), 255-261. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.029>
- Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2024, mayo 8). *Entender los cambios y los trastornos de la próstata*. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/significado-cambios-en-la-prostata>
- Iwamoto, H., Izumi, K., Makino, T., & Mizokami, A. (2022). Androgen Deprivation Therapy in High-Risk Localized and Locally Advanced Prostate Cancer. *Cancers*, 14(7), 1803. <https://doi.org/10.3390/cancers14071803>
- Kedersha, N. L., Miquel, M. C., Bittner, D., & Rome, L. H. (1990). Vaults. II. Ribonucleoprotein structures are highly conserved among higher and lower eukaryotes. *The Journal of Cell Biology*, 110(4), 895-901. <https://doi.org/10.1083/jcb.110.4.895>
- Kedersha, N. L., & Rome, L. H. (1986). Isolation and characterization of a novel ribonucleoprotein particle: Large structures contain a single species of small RNA. *The Journal of Cell Biology*, 103(3), 699-709. <https://doi.org/10.1083/jcb.103.3.699>
- Khoshnevisan, A., Parvin, M., Ghorbanmehr, N., Hatefi, N., Galehdari, H., Ziaee, S. A. M., &

- Mowla, S. J. (2015). A Significant Upregulation of miR-886-5p in High Grade and Invasive Bladder Tumors. *Urology Journal*, 12(3), 2160-2164.
- Khvorova, A., Reynolds, A., & Jayasena, S. D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell*, 115, 209-216.
- Kong, L., Hao, Q., Wang, Y., Zhou, P., Zou, B., & Zhang, Y. (2015). Regulation of p53 expression and apoptosis by vault RNA2-1-5p in cervical cancer cells. *Oncotarget*, 6(29), 28371-28388. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4948>
- Kral, M., Rosinska, V., Student, V., Grepl, M., Hrabec, M., & Bouchal, J. (2011). GENETIC DETERMINANTS OF PROSTATE CANCER: A REVIEW. *Biomedical Papers*, 155(1), 3-9. <https://doi.org/10.5507/bp.155.2011.001>
- Kunkeaw, N., Jeon, S. H., Lee, K., Johnson, B. H., Tanasanvimon, S., Javle, M., Pairojkul, C., Chamgramol, Y., Wongfieng, W., Gong, B., Leelayuwat, C., & Lee, Y. S. (2013). Cell death/proliferation roles for nc886, a non-coding RNA, in the protein kinase R pathway in cholangiocarcinoma. *Oncogene*, 32(32), 3722-3731. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.382>
- Lee, H.-S., Lee, K., Jang, H.-J., Lee, G. K., Park, J.-L., Kim, S.-Y., Kim, S.-B., Johnson, B. H., Zo, J. I., Lee, J.-S., & Lee, Y. S. (2014). Epigenetic silencing of the non-coding RNA nc886 provokes oncogenes during human esophageal tumorigenesis. *Oncotarget*, 5(11), 3472-3481. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1927>
- Lee, K., Kunkeaw, N., Jeon, S. H., Lee, I., Johnson, B. H., Kang, G.-Y., Bang, J. Y., Park, H. S., Leelayuwat, C., & Lee, Y. S. (2011). Precursor miR-886, a novel noncoding RNA repressed in cancer, associates with PKR and modulates its activity. *RNA*, 17(6), 1076-1089. <https://doi.org/10.1261/rna.2701111>
- Lee, K.-S., Park, J.-L., Lee, K., Richardson, L. E., Johnson, B. H., Lee, H.-S., Lee, J.-S., Kim, S.-B., Kwon, O.-H., Song, K. S., Kim, Y. S., Ashktorab, H., Smoot, D. T., Jeon, S. H.,

- Kim, S.-Y., & Lee, Y. S. (2014). Nc886, a non-coding RNA of anti-proliferative role, is suppressed by CpG DNA methylation in human gastric cancer. *Oncotarget*, 5(11), 3944-3955. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.2047>
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415-419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>
- Li, J.-H., Xiao, X., Zhang, Y.-N., Wang, Y.-M., Feng, L.-M., Wu, Y.-M., & Zhang, Y.-X. (2011). MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, 120(1), 145-151. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.09.009>
- Lin, H., & Gregor, H. (2004). *MicroRNAs: SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION*. 5, 522-531. <https://doi.org/doi:10.1038/nrg1379>
- Liu, C., Iqbal, J., Teruya-Feldstein, J., Shen, Y., Dabrowska, M. J., Dybkaer, K., Lim, M. S., Piva, R., Barreca, A., Pellegrino, E., Spaccarotella, E., Lachel, C. M., Kucuk, C., Jiang, C.-S., Hu, X., Bhagavathi, S., Greiner, T. C., Weisenburger, D. D., Aoun, P., ... Chan, W. C. (2013). microRNA expression profiling identifies molecular signatures associated with anaplastic large cell lymphoma. *Blood*, 122(12), 2083-2092. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-08-447375>
- Lowe, S. W., Cepero, E., & Evan, G. (2004). Intrinsic tumour suppression. *Nature*, 432(7015), 307-315. <https://doi.org/10.1038/nature03098>
- Lowe, S. W., & Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis*, 21(3), 485-495. <https://doi.org/10.1093/carcin/21.3.485>
- Molecular mechanism of Lipofectamine 3000. (s. f.). *Labster Theory pages*. <https://theory.labster.com/mechanism-lipofectamine-3000/>
- Nandy, C., Mrázek, J., Stoiber, H., Grässer, F. A., Hüttenhofer, A., & Polacek, N. (2009).

- Epstein–Barr Virus-Induced Expression of a Novel Human Vault RNA. *Journal of Molecular Biology*, 388(4), 776-784. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.03.031>
- Nordentoft, I., Birkenkamp-Demtroder, K., Agerbæk, M., Theodorescu, D., Ostenfeld, M. S., Hartmann, A., Borre, M., Ørntoft, T. F., & Dyrskjøt, L. (2012). miRNAs associated with chemo-sensitivity in cell lines and in advanced bladder cancer. *BMC Medical Genomics*, 5(1), 40. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-40>
- Okumura, T., Kojima, H., Miwa, T., Sekine, S., Hashimoto, I., Hojo, S., Nagata, T., & Shimada, Y. (2016). The expression of microRNA 574-3p as a predictor of postoperative outcome in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Surgical Oncology*, 14(1), 228. <https://doi.org/10.1186/s12957-016-0985-3>
- Oliveira-Rizzo, C., Colantuono, C. L., Fernández-Alvarez, A. J., Boccaccio, G. L., Garat, B., Sotelo-Silveira, J. R., Khan, S., Ignatchenko, V., Lee, Y. S., Kislinger, T., Liu, S. K., Fort, R. S., & Duhagon, M. A. (2025). Multi-Omics Study Reveals Nc886/vtRNA2-1 as a Positive Regulator of Prostate Cancer Cell Immunity. *Journal of Proteome Research*, 24(2), 433-448. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.4c00521>
- Palazzo, A. F., & Lee, E. S. (2015). Non-coding RNA: What is functional and what is junk? *Frontiers in Genetics*, 6. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00002>
- Persson, H., Kvist, A., Vallon-Christersson, J., Medstrand, P., Borg, Å., & Rovira, C. (2009). The non-coding RNA of the multidrug resistance-linked vault particle encodes multiple regulatory small RNAs. *Nature Cell Biology*, 11(10), 1268-1271. <https://doi.org/10.1038/ncb1972>
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., & Woezella, T. J. (2013). *Cell Viability Assays*. 357-388.
- Romanelli, V., Nakabayashi, K., Vizoso, M., Moran, S., Iglesias-Platas, I., Sugahara, N., Sugahara, N., Simón, C., Simón, C., Hata, K., Hata, K., Esteller, M., Esteller, M., Court,

- F., Court, F., Monk, D., & Monk, D. (2014). Variable maternal methylation overlapping the *nc886/vtRNA2-1* locus is locked between hypermethylated repeats and is frequently altered in cancer. *Epigenetics*, *9*(5), 783-790. <https://doi.org/10.4161/epi.28323>
- Romano, G., Veneziano, D., Acunzo, M., & Croce, C. M. (2017). Small non-coding RNA and cancer. *Carcinogenesis*, *38*(5), 485-491. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgx026>
- Sajini, A. A., Choudhury, N. R., Wagner, R. E., Bornelöv, S., Selmi, T., Spanos, C., Dietmann, S., Rappsilber, J., Michlewski, G., & Frye, M. (2019). Loss of 5-methylcytosine alters the biogenesis of vault-derived small RNAs to coordinate epidermal differentiation. *Nature Communications*, *10*(1), 2550. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10020-7>
- Schou, J. V., Rossi, S., Jensen, B. V., Nielsen, D. L., Pfeiffer, P., Høgdall, E., Yilmaz, M., Tejpar, S., Delorenzi, M., Kruhøffer, M., & Johansen, J. S. (2014). miR-345 in Metastatic Colorectal Cancer: A Non-Invasive Biomarker for Clinical Outcome in Non-KRAS Mutant Patients Treated with 3rd Line Cetuximab and Irinotecan. *PLoS ONE*, *9*(6), e99886. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099886>
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P. D. (2003). Asymmetry in the Assembly of the RNAi Enzyme Complex. *Cell*, *115*(2), 199-208. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00759-1](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00759-1)
- Sekhoacha, M., Riet, K., Motloug, P., Gumenku, L., Adegoke, A., & Mashele, S. (2022). Prostate Cancer Review: Genetics, Diagnosis, Treatment Options, and Alternative Approaches. *Molecules*, *27*(17), 5730. <https://doi.org/10.3390/molecules27175730>
- Sharma, S., Kelly, T. K., & Jones, P. A. (2010). Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, *31*(1), 27-36. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp220>
- Shen, J., Zhou, W., Bi, N., Song, Y.-M., Zhang, F.-Q., Zhan, Q.-M., & Wang, L.-H. (2018). MicroRNA-886-3P functions as a tumor suppressor in small cell lung cancer. *Cancer Biology & Therapy*, *19*(12), 1185-1192. <https://doi.org/10.1080/15384047.2018.1491505>

Shi, Q., Xue, C., Zeng, Y., Yuan, X., Chu, Q., Jiang, S., Wang, J., Zhang, Y., Zhu, D., & Li, L. (2024). Notch signaling pathway in cancer: From mechanistic insights to targeted therapies. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 128.

<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01828-x>

Sociedad de Oncología Médica y Pediátrica del Uruguay. (2024, noviembre 7). *Noviembre azul. Mes de concientización y prevención del cáncer de próstata.*

<https://www.sompu.org.uy/informacion/novedades/noviembre-azul-mes-de-concientizacion-y-prevencion-del-cancer-de-prostata-1#:~:text=Mes%20de%20concientizaci%C3%B3n%20y%20prevenci%C3%B3n%20del%20c%C3%A1ncer%20de%20pr%C3%B3stata,-Jueves%2C%2007%20de&text=En%20Uruguay%2C%20el%20c%C3%A1ncer%20de,al%20menos%2010%20a%C3%B1os%20antes.>

Stadler, P. F., Chen, J. J.-L., Hackermüller, J., Hoffmann, S., Horn, F., Khaitovich, P., Kretzschmar, A. K., Mosig, A., Prohaska, S. J., Qi, X., Schutt, K., & Ullmann, K. (2009). Evolution of Vault RNAs. *Molecular Biology and Evolution*, 26(9), 1975-1991.

<https://doi.org/10.1093/molbev/msp112>

Tahiri, A., Leivonen, S.-K., Lüders, T., Steinfeld, I., Ragle Aure, M., Geisler, J., Mäkelä, R., Nord, S., Riis, M. L. H., Yakhini, Z., Kleivi Sahlberg, K., Børresen-Dale, A.-L., Perälä, M., Bukholm, I. R. K., & Kristensen, V. N. (2014). Deregulation of cancer-related miRNAs is a common event in both benign and malignant human breast tumors. *Carcinogenesis*, 35(1), 76-85. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt333>

Taube, M., Lisiak, N., Totoń, E., & Rubiś, B. (2024). Human Vault RNAs: Exploring Their Potential Role in Cellular Metabolism. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(7), 4072. <https://doi.org/10.3390/ijms25074072>

Thompson, I. M., Pauler, D. K., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Parnes, H. L., Minasian, L. M., Ford, L. G., Lippman, S. M., Crawford, E. D., Crowley, J. J., & Coltman,

- C. A. (2004). Prevalence of Prostate Cancer among Men with a Prostate-Specific Antigen Level ≤ 4.0 ng per Milliliter. *New England Journal of Medicine*, 350(22), 2239-2246. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa031918>
- Treppendahl, M. B., Qiu, X., Sogaard, A., Yang, X., Nandrup-Bus, C., Hother, C., Andersen, M. K., Kjeldsen, L., Möllgaard, L., Hellström-Lindberg, E., Jendholm, J., Porse, B. T., Jones, P. A., Liang, G., & Grønbæk, K. (2012). Allelic methylation levels of the noncoding VTRNA2-1 located on chromosome 5q31.1 predict outcome in AML. *Blood*, 119(1), 206-216. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-06-362541>
- Tzelves, L., Protopogou, V., & Varkarakis, I. (2022). Denonvilliers' Fascia: The Prostate Border to the Outside World. *Cancers*, 14(3), 688. <https://doi.org/10.3390/cancers14030688>
- Vickers, K. C., Roteta, L. A., Hucheson-Dilks, H., Han, L., & Guo, Y. (2015). Mining diverse small RNA species in the deep transcriptome. *Trends in Biochemical Sciences*, 40(1), 4-7. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.10.009>
- Wen, S., Chang, H.-C., Tian, J., Shang, Z., Niu, Y., & Chang, C. (2015). Stromal Androgen Receptor Roles in the Development of Normal Prostate, Benign Prostate Hyperplasia, and Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology*, 185(2), 293-301. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.10.012>
- Woodfield, C. A., Tung, G. A., Grand, D. J., Pezzullo, J. A., Machan, J. T., & Renzulli, J. F. (2010). Diffusion-Weighted MRI of Peripheral Zone Prostate Cancer: Comparison of Tumor Apparent Diffusion Coefficient With Gleason Score and Percentage of Tumor on Core Biopsy. *American Journal of Roentgenology*, 194(4), W316-W322. <https://doi.org/10.2214/AJR.09.2651>
- Woods, D. B., & Vousden, K. H. (2001). Regulation of p53 Function. *Experimental Cell Research*, 264(1), 56-66. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5141>
- Xiang, P., Liu, Y., Liu, L., Lin, Q., Liu, X., Zhang, H., Xu, J., & Fang, B. (2019). The Biological

- Function and Clinical Significance of miR-886-5p in Multiple Myeloma. *Acta Haematologica*, 142(4), 208-216. <https://doi.org/10.1159/000499620>
- Xiao, W., Bao, Z.-X., Zhang, C.-Y., Zhang, X.-Y., Shi, L.-J., Zhou, Z.-T., & Jiang, W.-W. (2012). Upregulation of miR-31* Is Negatively Associated with Recurrent/Newly Formed Oral Leukoplakia. *PLoS ONE*, 7(6), e38648. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038648>
- Xiong, Y., Zhang, L., Holloway, A. K., Wu, X., Su, L., & Kebebew, E. (2011). MiR-886-3p Regulates Cell Proliferation and Migration, and Is Dysregulated in Familial Non-Medullary Thyroid Cancer. *PLoS ONE*, 6(10), e24717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024717>
- Yang, C., Zhang, W., Wang, J., Chen, P., & Jin, J. (2019). Effect of docetaxel on the regulation of proliferation and apoptosis of human prostate cancer cells. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.9998>
- You, J. S., & Jones, P. A. (2012). Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin? *Cancer Cell*, 22(1), 9-20. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.06.008>
- Yu, X.-F. (2011). miR-93 suppresses proliferation and colony formation of human colon cancer stem cells. *World Journal of Gastroenterology*, 17(42), 4711. <https://doi.org/10.3748/wjg.v17.i42.4711>
- Yu, Z., Chen, D., Su, Z., Li, Y., Yu, W., Zhang, Q., Yang, L., Li, C., Yang, S., Ni, L., Gui, Y., Mao, Z., & Lai, Y. (2014). miR-886-3p upregulation in clear cell renal cell carcinoma regulates cell migration, proliferation and apoptosis by targeting PITX1. *International Journal of Molecular Medicine*, 34(5), 1409-1416. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2014.1923>
- Zhan, T., Rindtorff, N., & Boutros, M. (2017). Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, 36(11), 1461-1473. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.304>
- Zhang, L., Wang, Y., Qin, Z., Gao, X., Xing, Q., Li, R., Wang, W., Song, N., & Zhang, W. (2020). Correlation between Prostatitis, Benign Prostatic Hyperplasia and Prostate Cancer: A

- systematic review and Meta-analysis. *Journal of Cancer*, 11(1), 177-189.
<https://doi.org/10.7150/jca.37235>
- Zhang, L.-L., Wu, J., Liu, Q., Zhang, Y., Sun, Z.-L., & Jing, H. (2014). MiR-886-5p inhibition inhibits growth and induces apoptosis of MCF7 cells. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 15(4), 1511-1515. <https://doi.org/10.7314/apjcp.2014.15.4.1511>
- Zhang, Y., Liu, Y., Liu, H., & Tang, W. H. (2019). Exosomes: Biogenesis, biologic function and clinical potential. *Cell & Bioscience*, 9(1), 19. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0282-2>
- Zhao, B., Li, L., & Guan, K.-L. (2010). Hippo signaling at a glance. *Journal of Cell Science*, 123(23), 4001-4006. <https://doi.org/10.1242/jcs.069070>
- Zhou, Y., Bolton, E. C., & Jones, J. O. (2015). Androgens and androgen receptor signaling in prostate tumorigenesis. *Journal of Molecular Endocrinology*.
- Zhu, Y., Liu, C., Nadiminty, N., Lou, W., Tummala, R., Evans, C. P., & Gao, A. C. (2013). Inhibition of ABCB1 Expression Overcomes Acquired Docetaxel Resistance in Prostate Cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 12(9), 1829-1836.
<https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0208>