





TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS PROGRAMA DE DESARROLLO DE LAS CIENCIAS BÁSICAS (PEDECIBA) ÁREA: BIOLOGÍA

Estudio de hsa-miR-183-5p en Cáncer de Próstata e identificación de sus blancos de acción

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA MONTEVIDEO -URUGUAY

40

Licenciada M. Carolina Ottati Braselli Orientador: Dra. María Ana Duhagon Serrat

5-Coccacact of cact cot of

Tribunal: Dr. Pablo Opezzo (Presidente) Dra. Mercedes Rodríguez (Vocal) Dra. Rosana Rodríguez (Vocal)

CAGAGACAGATCCACGA

110

Agradecimientos

En estas breves palabras quisiera agradecer profundamente a las personas que hicieron posible este trabajo.

En primer lugar agradecer a mi tutora, María Ana Duhagon por la dedicación y el apoyo recibido durante el transcurso de la tesis, por la paciencia y las enseñanzas transmitidas.

A Rafita, por su eterno positivismo, y por darme ánimo en todo momento.

A Beatriz por su infinita paciencia y generosidad. A Lucía, Pablito, Santi, a la incondicional Lore, y especialmente a Leti por transmitirme su calidez, entusiasmo y optimismo todas las mañanas en el laboratorio y por supuesto su auxilio en todo momento, a Lucía G. y a Santiago y Florencia, los peques del laboratorio.

A los anatomopatólogos: Manuel Méndez y Noemí Maedo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Policial por su paciencia para identificar las muestras y a mi padre, el Dr. Ottati por ser quien estableció el contacto.

A Guille, Vale y al Coya por su cooperación en los ensayos de microarreglos.

A PEDECIBA y CSIC por el apoyo financiero en 2012 y 2013.

A la Asociación de Universidades GRUPO MONTEVIDEO, por su Programa de Movilidad de Estudiantes de Posgrado, que me permitió financiar la estadía en San Pablo.

A la Dra. Edna Kimura y a todos los integrantes del laboratorio de Tiroides del Instituto de Ciencias Biomédicas de San Pablo, por su cálido y afectuoso recibimiento y hospitalidad durante nuestra estancia en 2013.

Especialmente a Cesar Fuziwara por su ayuda y asesoramiento en el diseño y realización de ensayos con vectores reporteros.

A los miembros del tribunal que aceptaron leer este trabajo.

Por supuesto, a mis padres y hermanos, por el apoyo incondicional y la comprensión durante este largo camino, gracias eternas.

A mis hermosos sobrinos: Juanma y Sebita, por todas las veces que venían a pedirme que jugara con ellos y se encontraban con una respuesta negativa, decirles gracias, gracias por entenderme y esperar.

A mis grandes amigas y confidentes: Xime y Fío. A Ana y Fabi por estar siempre apoyándome, compañeras en un principio y amigas incondicionales finalmente, gracias por estar siempre.

A Nati, Ile, Tati, Analiíta, Jorge, Ana S., Lore y Ale siempre presentes.

A Tomasso por sus palmaditas en la espalda cuando las cosas no andaban muy bien.

A todos, gracias por estar y estimularme a seguir día a día, a ellos les dedico esta tesis.

RESUMEI	V	10
INTRODU	ICCIÓN	11
Cáncer.		12
Biología	de la próstata	12
Cáncer o	de próstata (PCa)	14
General	idades de miRs	24
miRs en	Cáncer	30
miRs en	PCa	33
miR-183	8	34
Blancos	validados del clúster hsa-miR-183	39
ANTECE	DENTES	42
HIPÓTE	SIS DE TRABAJO	42
OBJETIVO	DS GENERALES Y ESPECÍFICOS	43
General		43
Específi	COS	43
MATERIA	LES Y MÉTODOS	44
MATER	IAI FS	
1	Medios de cultivo	45
1.	l íneas celulares	
2. 3	Muestras de nacientes	
з. Д	Vectores	
	Oligonucleótidos	
J. MÉTOD	OIS OIS	
	Cuantificación de ácidos nucleisos	
1.	Cuantinicación de Acidos nucleicos	
2.	Extracción de pequeñes APNs	
з. л	Cuantificación por aDCP do poqueños ARNS	
4. c	Cultives colubres	
5.	Cultivos celulares	
0. 7	Preparación de ADN en plásmideo	
7. o	Socuenciación de ADN elegenidice	
o. 0	Encove con genes reporteres	
9. 10	Verificación de ingreso y estabilidad del inhibidor y mimic de hsa-miR-183-5n	
10.	Retrotranscrinción de ARNm	
11.	Cuantificación por aPCP de blancos candidatos para miP-182-5n	
12.	Estudios de expresion génica global mediante ensavos de microarregios nor Affymetrix	
17.	Ensavos de proliferación celular	
14.		
15.	Ectudios in cilico	
10.	Loculios III Sillo	00
	10.1. Identification de genes blancos modulados por bra mie 192 on DCa	
17.	Análisis de las vías asociadas con los genes seleccionados	
RESULTA	DOS Y DISCUSION	69
1	Determinación de los niveles de expresión de hsa-miR-183-5n en PCa	
2.	Estudio de genes blancos regulados por hsa-miR-183	

3.	Moc	lulación del ARNm de genes blancos candidatos	
4.	Ensa	iyo con genes reporteros para genes blancos candidatos	
5.	Anál	isis del efecto global de mir-183 sobre la expresión génica	106
	5.1.	Genes seleccionados en estudios de microarreglos	106
	5.1.1.	Estudio del efecto de mir-183 en la expresión génica global	106
	5.1.2.	Estudio del efecto de mir-183 sobre la expresión de genes blanco directos	109
	5.2.	Posibles mecanismos de acción de hsa-miR-183:	111
	5.2.1.	Actividad de miR-183 en el inicio del tumor	
	5.2.2.	Actividad de miR-183 en la progresión del PCa avanzado	113
6.	Prop	iedades del fenotipo tumoral reguladas por hsa-miR-183-5p	
CONCLU	ISIONE	S	118
ANEXOS			
BIBLIOGRAFÍA			

Abreviaturas

Aa	Aminoácido/s
5αR1	5α-reductasa tipo I
5αR2	5α-reductasa tipo II
AD	Andrógeno-dependiente
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN copia
AI	Andrógeno-independiente
APE	Antígeno específico de próstata
AR	Receptor de Andrógenos
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
Ct	Threshold Cycle
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHT	5-α dihidrotestosterona
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	di-metil-sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FGF-2	Factor de crecimiento de fibroblastos 2
g/L	Gramos por litro
GEO	Gene Expression Omnibus
grs	Gramos
НВР	Hiperplasia Prostática Benigna
hK3	Kalikreina tisular 3
hK4	Prostasa
HPA	The Human Protein Atlas
IGF-1	Factor de crecimiento tipo insulina
IGFBP-3	Proteína de Unión al Factor de Crecimiento Tipo Insulina
Kb	Kilo pares de bases
kDa	Kilodalton
LB	Medio de cultivo de bacterias Luria-Bertani
Μ	Molar
mA	Miliamperios
MAB	Bloqueo Máximo de Andrógenos
mg	Miligramos
min.	Minutos
miRs	MicroRNAs
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MS	Milisegundos
Ν	Normal
ng	Nanogramo
NGF	Factor de Crecimiento Nervioso

nm	Nanómetro
NSCLC	Cáncer de pulmón no a células pequeñas
nt	Nucleótidos
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Cáncer de Próstata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PIN	Neoplasia intraepitelial prostática
POL II	ADN polimerasa II
POLIII	ADN polimerasa III
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por ARN
RPM	Revoluciones por minuto
rpm	Revoluciones por minuto
RPMI-1640	Roswell Park Memorial Institute
RT	Transcripción reversa
RTasa	Retrotranscriptasa
RTUP	Resección transuretral de la próstata
SDS	Dodecil sulfato sódico
seg	Segundos
TAE	Tampón Tris-acetato
TBE	Tampón Tris-borato
TE	Tampón Tris-EDTA
temp.	Temperatura
Tm	Temperatura de fusión
Tris	Trihidroximetil aminometano
U	Unidades de actividad enzimática
UTR	Región transcrita no traducida
v/v	Volumen/Volumen
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular
WebGestalt	WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

El cáncer de próstata (PCa) es la segunda causa de muerte por cáncer en Uruguay, estableciéndose un promedio de 550 muertes al año. Actualmente el único biomarcador de aplicación clínica para la detección temprana de PCa es el antígeno específico de próstata (APE). Su baja especificidad y sensibilidad hacen necesario la identificación de nuevos marcadores para reducir la morbilidad y evitar tratamientos innecesarios.

Los **microRNAs** (miRs) son moléculas pequeñas de ARN simple hebra, de aprox. 22 nt. que regulan la expresión génica mediante complementariedad de bases con el 3'UTR de mRNAs específicos. Participan en la regulación de varios procesos celulares: proliferación celular, diferenciación, apoptosis por lo que su expresión aberrante puede generar eventos patológicos complejos como las enfermedades infecciosas, cardiovasculares, neurodegenerativas y cáncer. Investigaciones recientes han demostrado perfiles únicos de expresión de miRs en diferentes tipos de cáncer, estadios y que juegan un rol importante en el inicio y progresión de diferentes patologías oncológicas, como el PCa. Debido a su gran estabilidad en plasma, suero, y tejidos fijados, los miR surgen como buenos candidatos para su uso como biomarcadores específicos en el diagnóstico y progresión de la enfermedad así como blancos terapéuticos. Estudios preliminares muestran un incremento en la expresión de hsa-miR-183 en muestras tumorales de PCa. Nuestro proyecto de investigación espera comprender cuál es la influencia de hsa-miR-183 en el fenotipo neoplásico de PCa; su origen y su progresión, e identificar y validar sus blancos moleculares.

Para ello, se determinaron los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en siete muestras pareadas de tejido normal y tumoral fijados en parafina provenientes de prostatectomías radicales, en líneas celulares de PCa; dependientes, sensibles e independientes de andrógenos, líneas celulares normales de próstata y tres líneas primarias de pacientes terminales con PCa.

Para el estudio de genes blancos regulados por hsa-miR-183, se utilizaron algoritmos de predicción de genes con sitios blancos de miRs (**miRecords**) y bases de datos de expresión génica de PCa (**ONCOMINE**). Se definió una lista primaria de genes que presentan una secuencia de reconocimiento para hsa-miR-183 y se evaluó el nivel traduccional a través de los datos de inmuno-histoquímica publicados en "The Human Protein Atlas". Se identificaron empíricamente genes blancos de hsa-miR-183-5p, mediante ensayos de microarraglos de **Affymetrix** y se realizó un estudio de las vías enriquecidas con los genes seleccionados mediante el software **WebGestalt**, luego de la transfección con las moléculas mimic miR-183-5p e inhibidor miR-183-5p en las líneas LNCaP y DU145. Se seleccionaron 7 genes: *foxo1, itgb1, pdcd4, bnc2, synpo, irs1* y *fndc3b* y se determinaron los niveles de expresión invertidos de ARNm en las líneas celulares LNCaP y Du145 al sobre-expresar y bloquear miR-183-5p y se realizó la evaluación de la interacción directa de *itgb1, irs1* y *fndc3b* con hsa-miR-183-5p, mediante estudios de ensayos reporteros. Finalmente, analizamos su posible efecto en la proliferación de células tumorales.

INTRODUCCIÓN

Cáncer

El cáncer es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división celular (Beck, Myers et al. 1978).

Fundamentalmente es una enfermedad genética y epigenética, que requiere la acumulación de alteraciones genómicas que inactivan genes supresores de tumores y activan proto-oncogenes (Kent and Mendell 2006).

A pesar de los avances en el conocimiento de los cambios moleculares y celulares involucrados en el inicio y progresión del cáncer, no ha habido una reducción sustancial en la proporción de muertes por dicha patología (Ferlay, Shin et al. 2010). De hecho, en el año 2007 se estimaron 12 millones de nuevos casos de cáncer y 7,6 millones de muertes en todo el mundo. Estimándose una incidencia y una mortalidad de aproximadamente 187.6 y 106 cada 100.000 habitantes respectivamente. Las neoplasias más extendidas a nivel mundial son el cáncer de pulmón, mama, colorectal, gástrico y próstata. El cáncer de próstata se presenta en más de 890.000 hombres, presentando una incidencia de 28 casos y una mortalidad de 7.5 individuos cada 100.000 habitantes (http://globocan.iarc.fr).

El 90% de estas muertes pueden ser atribuidas a enfermedades metastásicas que, por su heterogeneidad y complejidad, difícilmente responden a terapias convencionales como cirugía, radiación y quimioterapia (Thobe, Clark et al. 2011)

Biología de la próstata

La próstata es una glándula impar y mediana del aparato reproductor masculino, situada por debajo de la vejiga, delante del recto y alrededor de la uretra (Figura 1).

Es un órgano compuesto por tejido glandular, fusionado a una región con estroma y rodeados de una cápsula común. Presenta cuatro regiones glandulares diferentes, donde la zona periférica ocupa el 75% y la zona central el 25% de la masa prostática. El componente glandular presenta acinos y ductos morfológicamente similares y con funciones de reservorio. El sistema de acinos y ductos esta surcado por el epitelio columnar pseudoestratificado compuesto de células secretorias. Las células secretorias están separadas de la membrana basal y del estroma por una capa de células basales. Los componentes no glandulares de la próstata incluyen el esfínter pre-prostático, el estroma fibro-muscular, la capsula, vasos y nervios. El estroma fibro muscular está compuesto por células musculares lisas separadas por bandas de tejido denso y fibroso (Uhlen, Oksvold et al. 2010) (http://www.proteinatlas.org).



Figura 1: Imagen del sistema reproductor masculino. Se identifican órganos y estructuras, entre ellos la glándula prostática. Imagen tomada de la página web del Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)

Integrando la capa de células epiteliales: las células basales carecen de receptores de andrógenos (ARs), son andrógeno independientes y dan origen a un tipo celular intermedio denominado células transicionales que responden a andrógenos y son células pluripotenciales que generan células basales, células glandulares diferenciadas luminales y posiblemente las células neuroendócrinas. Las células secretorias derivan de las células transicionales, expresan ARs y son dependientes de la estimulación androgénica para su viabilidad y habilidad secretoria. Si los andrógenos son removidos, estas células glandulares mueren por apoptosis y la glándula prostática se vuelve regresiva. Secretan el antígeno prostático específico (APE), prostasa (hK4), poliaminas y prostaglandinas en los acinos y ductos al lumen (Arnold and Isaacs 2002). Las células neuroendócrinas juegan un rol en la regulación del crecimiento y función de las células secretorias. La capa de células del estroma: está compuesta por células musculares AR positivas, fibroblastos, adipocitos, células endoteliales, linfocitos y tejido neuromuscular embebido en matriz extracelular (con proteínas fibrilares como colágeno y fibronectinas). Las células musculares producen factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y neurotopinas como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y juegan un rol significativo en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de la próstata. NGF es secretada por las células del estroma, pero no es un factor de sobrevida del epitelio prostático normal. En contraste, es secretado por las células tumorales para regular la vía de sobrevida adquirida (Arnold and Isaacs 2002).

El estroma no solo soporta físicamente al epitelio glandular sino que también contribuye en el microambiente endocrino y parácrino. Las interacciones parácrinas entre epitelio-estroma son importantes para la morfogénesis del tejido normal prostático. En cáncer algunas vías de factores de crecimiento (el factor de crecimiento de fibroblastos: FGF), la familia de los factores de crecimiento tipo insulina (IGF), EGF y el factor de transformación (TGF-alfa) que son estimuladores de proliferación, ácido retinoico (diferenciación e invasividad), la familia TGFbeta y vitamina D3, se vuelven autócrinas, permitiendo que las células epiteliales crezcan de forma independiente del estroma (Montano and Djamgoz 2004). Por último, la función fundamental de la próstata es secretoria externa, produciendo el líquido prostático que contribuye en la formación del esperma (plasma seminal y espermatozoides), que representa aproximadamente un cuarto del volumen total del plasma seminal.

Andrógenos y ARs

Los andrógenos son hormonas sexuales, producidos en forma de testosterona (aprox. 90%) en los testículos por las células de Leydig, y regulados por el eje hipotálamo-pituitario-gonadal. Regulan la diferenciación y maduración de los órganos reproductivos masculinos y el desarrollo de características sexuales secundarias (Amory and Bremner 2003). Los andrógenos adrenales son secretados por la corteza adrenal y contribuyen a los efectos androgénicos (aprox. 10%), convirtiéndose en testosterona en tejidos periféricos (Dehm and Tindall 2006). Una vez que la testosterona ingresa a la célula se convierte en 5- α -dihidrotestosterona (DHT) por la 5- α -reductasa tipo l y tipo II (5 α R1, 5 α R2).

Por otro lado el AR es una fosfoproteína, miembro de la familia de receptores de ácido retinoico, hormona tiroidea y esteroidea que media la acción de la testosterona y de la DHT, uniéndose a elementos de respuesta hormonal en genes específicos, y regulando así su transcripción. Están presentes predominantemente en el sexo masculino y su función es la de promover el crecimiento y la diferenciación de las estructuras urogenitales masculinas, necesario para el comienzo y mantenimiento de la espermatogénesis (Grossmann, Huang et al. 2001, Arnold and Isaacs 2002, Di Lorenzo, Tortora et al. 2002).

Los andrógenos regulan el número total de células prostáticas estimulando continuamente la tasa de proliferación celular y al mismo tiempo inhibiendo la tasa de muerte celular. En la próstata en desarrollo, únicamente las células del estroma expresan AR. En la próstata adulta la expresión de AR se da principalmente en las células epiteliales aunque también se da en el estroma. En contraste, en el tejido tumoral, la expresión de AR es heterogénea, generándose un estado de independencia de andrógenos en etapas más avanzadas de enfermedad (Grossmann, Huang et al. 2001).

Cáncer de próstata (PCa)

Dentro de los tumores sólidos, el PCa es una de las enfermedades oncológicas de mayor incidencia en países occidentales y la segunda causa de muerte por cáncer en Uruguay (Figura 2) (Ferlay, Shin et al. 2010).

CANCER EN URUGUAY 2002-2006 PRINCIPALES SITIOS



Tasa ajustada por edad a la población mundial estándar expresada en casos x 100000.

Figura 2: Datos estadísticos de la incidencia y mortalidad de los diferentes tipos de cáncer en hombres en Uruguay, 2002-2006. Tomado del Ministerio de Salud Pública Dirección General de la Salud Programa Nacional de Control del Cáncer.

El PCa se presenta predominantemente en hombres de edad avanzada, aproximadamente a los 65 años y la tasa de crecimiento tumoral varía de lento a moderadamente rápida, aunque ciertos pacientes pueden presentar una sobrevida prolongada aun con cáncer metastásico.

Esta neoplasia presenta una incidencia diferencial según etnias. Los hombres de origen afroamericano presentan mayor riesgo de desarrollar PCa y presentan sintomatologías más severas, con una tasa de mortalidad dos veces superior en comparación con la de hombres de origen caucásico. Los factores genéticos asociados a la incidencia y mortalidad por PCa en individuos afroamericanos son controversiales, encontrando en esta población una mayor expresión de genes asociados a metástasis como: *amfr, cxcr4, ccr7, mmp9, psphl* y *crybb2*.

Así mismo, los factores ambientales como infecciones asociados a carcinogénesis; factores genéticos por ejemplo variaciones genéticas en los genes involucrados en Inmunidad innata como *msr1* y *rnasel*, la presencia de genes candidatos de susceptibilidad para el PCa o la interacción, contribuyen en la patología en estos individuos. La inflamación crónica también es causa de PCa y se da con mayor frecuencia en individuos afroamericanos. Los factores socio-económicos, como la disponibilidad o acceso a servicios de salud también estarían interaccionando (Wallace, Prueitt et al. 2008, Larkin, Zeidan et al. 2010).

El PCa presenta un riesgo aumentado en pacientes con antecedentes familiares, estando influenciado por la edad de aparición y numero de familiares afectados. Actualmente se han definido varios locus de susceptibilidad, entre ellos: *hpc1, rnasel* (1q25), *pcap* (1q42.2-43), *hpcx* (Xq27-28), *capb* (1p36), *hpc20*(20q13), 8p (8P21-23), 8q (8q24), así como diferentes genes de susceptibilidad: *amacr, brca1, brca2, chek2, elac2, hpc2, hoxb13, klf6, mlh1, msh2, msh6 o pms2, msr1, nbs1* (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Según lo establecido antes, podemos definir al PCa como un tumor heterogéneo, un desórden neoplásico complejo (multifactorial), donde para comprender su inicio y progresión, es necesario elucidar y entender los mecanismos moleculares involucrados en el desarrollo de la glándula prostática normal.

Como dijimos anteriormente, las interacciones entre células del estroma y células epiteliales mediante factores autócrinos y parácrinos y la producción local de andrógenos y factores de crecimiento están involucrados en el desarrollo y función de la glándula normal. Así la regulación del crecimiento y apoptosis de células epiteliales está controlado por la secreción andrógeno-dependiente de factores de crecimiento parácrinos, que, durante el desarrollo normal de la glándula, actúan como mitógenos de las células epiteliales de la próstata. Este balance homeostático se desestabiliza en PCa, y el análisis de la desregulación de las relaciones funcionales entre los factores de crecimiento y sus receptores es importante para determinar la patogénesis del PCa (Montano and Djamgoz 2004).

Según el grupo de Potter el primer "hit" se origina por mutaciones en las células epiteliales, que causa la disrupción de las funciones celulares y estructurales, y el segundo "hit", en las células mesenquimales resultando en la disrupción de la homeostasis tisular. De esta forma el estroma no puede cumplir las funciones regulatorias, sobre las células epiteliales (comienzan a sintetizar sus propios factores de crecimiento y se vuelven autónomas), con la consecuente acumulación de cambios genéticos y pérdida del control reciproco de las células del estroma para finalmente dar inicio a la formación del tumor (Potter, Horniger et al. 2001).

Clasificación de procesos tumorales en PCa

Los **procesos tumorales benignos** que afectan la glándula prostática son de dos clases: los quísticos, raros, y el adenoma prostático también denominado adenofibroma o **Hiperplasia Prostática Benigna** (HBP). Los **tumores malignos** se denominan primarios o secundarios y dentro de los primarios se encuentra el **Adenocarcinoma prostático o PCa** que se desarrolla a partir de las células epiteliales prostáticas representando el 95 a 98% de la totalidad de los casos de PCa, siendo el resto, carcinomas de células escamosas, células transicionales o sarcomas. Se origina generalmente en los acinos prostáticos, y en los ductos en menor proporción. Generalmente surge en las zonas periféricas de la glándula. La mayoría son multifocales (85%), siendo los nódulos únicos, mucho menos habituales (10%). Los síntomas asociados a esta patología son similares a los generados por el adenoma prostático: flujo débil de orina o excreción frecuente de orina, dolor o ardor durante la micción, presencia de sangre en la orina o en el semen, entre otros.

El PCa presenta una historia natural de progresión a partir de la denominada neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (con lesiones de bajo y alto grado confinadas a la capsula/ductos); pasando por carcinoma invasivo local andrógeno-dependiente (caracterizado por una pérdida de la lámina basal, proliferación de las células luminales y basales y expresión de metaloproteinasa 2 de la matriz y kalikreinas); dando lugar al carcinoma metastásico andrógeno-independiente o invasivo (más agresivo y capaz de invadir de forma local a las vesículas seminales),

afectando generalmente pulmón y huesos, provocando finalmente la muerte del paciente (Tindall and Rittmaster 2008) (Figura 3).



Figura 3: Etapas de la progresión del PCa. Tomado de (Tindall and Rittmaster 2008).

Aproximadamente el 90% de los pacientes con enfermedad avanzada presentan metástasis ósea, asociada con dolores óseos, perdida de movilidad y compresión espinal. Otros órganos afectados incluyen al hígado, pulmón y cerebro (Gitenay and Baron 2009).

Diagnóstico de PCa

La detección y diagnóstico precoz de PCa se realiza de forma rutinaria mediante tacto rectal y cuantificación del antígeno específico de próstata en sangre (APE) y ante la sospecha clínica de PCa, se debe confirmar sistemáticamente mediante biopsia prostática perineal o transrectal. A partir de la biopsia el patólogo clasifica el tumor mediante un sistema denominado score de Gleason, donde se caracteriza el tejido tumoral prostático basado en características microscópicas del crecimiento tumoral y se describen las diferencias entre el aspecto de las células normales y las células cancerosas (Figura 4. A.). El score de Gleason esta correlacionado con el riesgo de diseminación del tumor. Cuanto más bajo es el score, menor es la probabilidad de diseminación del tumor (Figura 4. B.). Este parámetro, así como la determinación de la estatificación se determinan para evaluar la progresión del tumor en el paciente y determinar el tratamiento a seguir.



Figura 4: A. El sistema de score de Gleason está definido por un rango gradual de Gleason que va de 1 a 5. Se representa el esquema del aspecto diferencial de las células y la progresión desde las células diferenciadas hasta el estadio anaplásico de desdiferenciación, con pérdida de la arquitectura normal del tejido glandular. **B.** Asociación entre los diferentes niveles de Gleason y características fenotípicas patológicas. El grado de Gleason 1 (score de Gleason 2 (1+1)), no es usado a nivel de la clínica debido a que es imposible de distinguirlo de la adenosis. Lo grados de Gleason correspondientes a los dos patrones de crecimiento dominantes en cáncer de próstata son combinados para definir el score de Gleason y consecuentemente el score de Gleason presenta un rango de 4 (2+2) a 10 (5+5).

La estadificación (Figura 5) es la etapa siguiente al diagnóstico y fundamental para plantear la terapéutica adecuada, y se determina con el tacto rectal y el estudio de alguna de los siguientes parámetros clínicos: *fosfatasa acida sérica, centellograma óseo, imágenes por resonancia magnética nuclear* (IRMN), imágenes radiológicas de ganglios y vasos linfáticos, *biopsia de vesículas seminales, tomografía axial computada* y *ecografía* entre otros (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).



Figura 5: Estadificación: Estadio I al IV, las células cancerosas crecen dentro de la próstata, a través de la capa externa de la próstata hacia el tejido cercano y luego hasta los ganglios linfáticos u otras partes del cuerpo. Imagen tomada de la página web del Instituto Nacional de Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)

El pronóstico (posibilidad de recuperación) y el plan terapéutico deriva de una correcta estadificación (si afecta parte de la próstata, compromete toda la próstata o se diseminó hasta otras partes del cuerpo), del puntaje de Gleason (grado histológico del tumor) y la concentración del APE en sangre. Con frecuencia, se considera que los cambios en las tasas basales de APE son marcadores tumorales del avance del tumor (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Tratamiento de PCa

El tratamiento de vanguardia para el PCa proporciona una supervivencia prolongada, sin enfermedad para muchos pacientes con enfermedad localizada, pero rara vez es curativo para pacientes con metástasis ósea y/o ganglionar. Debido a que la enfermedad es de evolución lenta, los afectados pueden morir de otras enfermedades sin haber padecido ninguna sintomatología propia del tumor.

El enfoque de tratamiento dependerá de la edad y el estado del paciente. Entre los tratamientos estándar se encuentran: **la espera cautelosa**, observación cautelosa de la condición del paciente o **vigilancia activa**, donde se realiza un seguimiento del paciente mediante exámenes regulares de tacto rectal, prueba de APE, ecografía transrectal y biopsia con aguja transrectal. Administrando un tratamiento si el tumor progresa (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Cuando el tumor está confinado a la glándula prostática (tumor intracapsular, biopsia prostática positiva y exámenes para-clínicos de estadificación indiquen ausencia de diseminación), se indica generalmente la **prostatectomía radical**; perineal o retropúbico, en el cual se extirpa la próstata, el tejido circundante, las vesículas seminales y en algunos casos se indica la extirpación de los ganglios linfáticos. La **linfadenectomía pélvica** y la **resección transuretral de la próstata (RTUP)** son indicadas para determinar la extirpación de la próstata o no y para aliviar los síntomas que causan un tumor antes de administrar otro tratamiento del cáncer respectivamente. La **radioterapia definitiva**, puede ser externa o interna aumentando la recidiva de la enfermedad en aquellos pacientes donde el tumor es extra-capsular, o presenta márgenes positivos.

Existen también varias **estrategias hormonales** para el tratamiento de PCa, sin embargo, el efecto de este tratamiento es paliativo y la mayoría de los pacientes presentan recidiva. En estos pacientes, la transición desde el estadio de carcinoma invasivo al metastásico esta caracterizado por un cambio del estado andrógeno-dependiente (AD) al estado andrógeno-independiente (AI), consecuencia de la ausencia en respuesta apoptótica al tratamiento (PCa hormono-refractario). En este sentido hay un cambio en el eje AR desde las vías parácrinos dependientes de las células del estroma hacia vías autócrinas. Este cambio puede estar dado por varios mecanismos, mutaciones puntuales en el dominio de unión del AR, activándose de forma constitutiva o alteraciones en las interacciones entre el AR y algunos de sus coactivadores. Así mismo, la amplificación del gen *ar* podría incrementar la sensibilidad de las células a los niveles bajos de andrógenos producidos por las glándulas adrenales. Se ha reportado que la región cromosómica que contiene a *ar* (Xq11-q13), esta amplificada en el 30% de las próstatas que recurren luego de terapias de ablación de andrógenos (Arnold and Isaacs 2002).

Los posibles tratamientos hormonales son: *castración bilateral (orquiectomia),* el *bloqueo de la acción periférica de la testosterona* con antiandrógenos como acetato de ciproterona, la bicalutamida, entre otros, la *estrogenoterapia* inhibe la liberación de hormona luteinizante (LH), reduciendo los niveles de testosterona en forma comparable a la castración bilateral, el *bloqueo máximo de andrógenos* (MAB de maximal androgen blockade) combina el tratamiento anti-androgénico y ablación de andrógenos (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Cuando en el tratamiento paliativo ha fracasado la terapia hormonal, se puede plantear la radioterapia local como co-adyuvante de los dolores óseos o sobre la próstata cuando existe compromiso ureteral. También se puede administrar ciclofosfamida y fosfato de extramustina, como quimioterápicos. La forma en que se administra la **quimioterapia** depende del tipo y el estadio del cáncer que se está tratando, pudiendo ser sistémica o regional (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Tanto la cirugía, la radioterapia o la quimioterapia producen efectos secundarios en los pacientes tratados, siendo la impotencia y los problemas urinarios común a los tres tratamientos.

La terapia biológica es un tratamiento en el que se usa el sistema inmunitario del paciente para combatir el proceso tumoral, un ejemplo es el sipuleucel-T en cáncer metastásico. Los bisfosfonatos, como el clodronato, reducen la enfermedad y el dolor óseo en cáncer metastásico; así también lo hace el denosumab, un anticuerpo monoclonal que retrasa el daño y dolor а nivel ósea (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Se están probando nuevos tipos de tratamiento en ensayos clínicos como la *criocirugía* o *crioterapia*, aunque no se ha demostrado ni la respuesta inmunológica ni la regresión de las metástasis con este procedimiento, la ecografía enfocada de alta intensidad (ultrasonido) que destruye células tumorales, y la radioterapia con haz de protón (en estudio para el PCa) (Instituto Nacional del Cáncer (http://www.cancer.gov/espanol)).

Biomarcadores en PCa

Los métodos de tamíz utilizados para la detección temprana de PCa se basan en la identificación de biomarcadores específicos.

Los biomarcadores son moléculas biológicas que indican la presencia o ausencia de un proceso patológico y que pueden ser detectadas en fluidos corporales, como sangre y orina. Las características de un marcador tumoral ideal son: alta estabilidad, especificidad, sensibilidad, practicidad, que presente un método de cuantificación poco invasivo y una asociación directa con el estado, progreso y respuesta a la terapéutica oncológica.

Específicamente con respecto al PCa, los biomarcadores deberían predecir correctamente el pronóstico para poder reducir la morbilidad y limitar el número de tratamientos innecesarios. En este sentido, se manejan tres aspectos relevantes que tienen que ser abordados por los biomarcadores: mayor exactitud en el diagnóstico de PCa, discernir entre formas indolentes y agresivas de PCa y permitir la correcta selección de cohortes de pacientes que respondan a terapias especificas como radioterapia, quimioterapia, entre otras (Larkin, Zeidan et al. 2010). Actualmente el único biomarcador de aplicación clínica para la detección temprana de PCa es el **antígeno** específico de próstata (APE) o kalikreina tisular 3 (hK3), una serín-proteasa regulada positivamente por los receptores de andrógenos (AR).

La correlación entre los niveles de APE y la presencia de PCa es indirecta, debiendo ser confirmada a través de biopsia, los mismos presentan valores diagnósticos y no pronósticos.

Las kalikreinas fueron inicialmente definidas como serín proteasas que digieren ciertas proteínas de alto peso molecular para liberar péptidos bioactivos denominados kininas. Se dividen en dos familias: **kalikreinas tisulares**, localizadas en el cromosoma 19q13.4, con 15 genes de kalikreinas localizados en tándem con 4 a 10kb cada uno y se expresan en próstata, mama, ovario y testículos y **kalikreinas plasmáticas**, codificadas en el cromosoma 4 y de expresión exclusivamente hepática (Figura 6) (Diamandis and Yousef 2002).



Figura 6: Esquema del locus génico de las kallikreinas humanas en el cromosoma 19q13.4. El nombre original de cada gen está presente dentro de las flechas. El nombre oficial se presenta debajo de las flechas en negro. Las flechas indican la dirección de la transcripción. El largo de cada gen esta indicado por encima del nombre de cada gen. La distancia entre cada gen se especifica por debajo de las flechas. Los genes *siglec 9* y *acpt* no son miembros de la familia de kalikreinas. HSCCE, NES1, TLSP, serín proteasa tipo tripsina. Tomado de (Diamandis and Yousef 2002).

Las kalikreinas tisulares han sido implicadas en el procesamiento de factores de crecimiento y hormonas: proinsulina, lipoproteína de baja densidad (LDL), pro-renina, angiotensinógenos, entre otros. APE, hK2 y hK4 se expresan principalmente en la glándula prostática y son reguladas por receptores de andrógenos. Actualmente, hK3 y hK2 están siendo utilizadas como marcadores de PCa; hK6, hK10 y hK11 están emergiendo como nuevos biomarcadores de pronóstico y progresión de cáncer de ovario y próstata (Diamandis and Yousef 2002).

Biosíntesis de APE

El APE es la proteína mayoritaria en el fluido seminal con una concentración de 0,5 a 2 mg/mL, aunque también está presente en la leche y fluido amniótico. Es producida primariamente por el ducto prostático y el epitelio acinar y es secretada en el lumen, donde cliva a la semenogelina I y II del coagulo seminal, pudiendo también clivar a la proteína de unión al factor de crecimiento tipo insulina (IGFBP-3), plasminógeno y TGF-β.

La mayoría del APE (70%-90%) que entra a la sangre periférica está intacta y circula generalmente como un complejo de 80-90kDa con el inhibidor de proteasa α -1-antiquimiotripsina. Las isoformas de APE (inactivada por

clivaje proteolítico) no forman complejos con inhibidores y circulan libremente APE libre. Estas formas están presentes en bajas concentraciones en PCa, por lo que la relación APE libre/APE total denominado **índice APE** es menor en pacientes con PCa. Aunque en PCa no se produce mas APE que en el epitelio prostático normal, una gran fracción de APE producido parece escapar del procesamiento proteolítico (activación o degradación). (Figura7) (Balk, Ko et al. 2003).



Figura 7: El epitelio estratificado de la glándula prostática se divide en dos capas: la capa basal compuesta por células cuboidales bajas, y una capa de células columnares secretorias (células del lumen). La glándula está rodeada por membrana basal que separa estas células del estroma fibromuscular prostático. Una característica temprana del cáncer de próstata es la disrupción de la membrana basal, y esto permite que el APE acceda directamente a la circulación periférica. Esquema tomado de (Balk, Ko et al. 2003).

Rol de APE en la patogénesis

En el ambiente tumoral el APE puede generar la proteólisis de ciertas proteínas que influyen en el desarrollo y progresión del tumor. Una de estas proteínas es IGFBP-3, la mayor proteína de unión en suero del factor de crecimiento tipo insulina (IGF-1). IGFBP-3 es producido por las células epiteliales de la próstata y su clivaje *in vitro* disminuye su unión a IGF-1, provocando un incremento de IGFs libres para su unión con IGF-1R y promover la supervivencia celular, incrementando el riesgo de PCa.

Así mismo, APE puede clivar ciertas proteínas que tienen que ver con la migración celular y metástasis, como la fibronectina, la laminina, así como al activador plasminógeno tipo uroquinasa, el cual puede potenciar la invasión de células tumorales. Por otro lado se ha visto que presenta una potente actividad mitogénica in vitro para osteoblastos, sugiriendo un rol en metástasis ósea y respuesta osteoblástica. En contraste con las actividades promotoras del tumor, APE presenta también funciones o efectos antiangiogénicos mediante el clivaje del plasminógeno para producir péptidos con actividad tipo angiostatina o por inactivación del inductor angiogénico factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), aunque los mecanismos de acción *in vivo* deben ser establecidos (Russell, Bennett et al. 1998).

APE como biomarcador en PCa

Desde la introducción del APE como biomarcador clínico y del examen rectal como herramientas de tamíz en PCa, la incidencia de este tumor ha disminuido dramáticamente y la detección es temprana, y confinada a la glándula. Actualmente el APE es el único biomarcador en sangre utilizado en la clínica para la detección y monitoreo de la progresión del PCa, aunque es poco claro si permite disminuir la mortalidad por PCa. Los estudios de grandes cohortes sugieren valores de APE total en suero mayores a 4ng/mL como límite inferior para la realización de biopsias prostáticas, aunque datos más recientes sugieren un valor de 2,5ng/mL como límite inferior para evitar la exclusión de una gran proporción de pacientes que presentan la enfermedad en estadios tempranos (Diamandis and Yousef 2002).

Se estima que entre el 20% al 50% aproximadamente de los casos de PCa confinados a la glándula ocurren en hombres que presentan niveles de APE total en suero igual o menor a 4ng/mL (Balk, Ko et al. 2003, Thompson, Pauler et al. 2004). Así mismo, el valor pronóstico de este biomarcador es limitado ya que el PCa avanzado está también asociado a valores bajos o normales del antígeno prostático (Watahiki, Wang et al. 2011).

El APE no es específico de la glándula prostática ni de PCa, está presente en menor concentración en mama, tiroides y placenta, asi como en glándulas perianales y apócrinas. Por otro lado incremento de esta proteasa ha sido reportada en una variedad de otros cánceres y patologías, como cáncer de mama, Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), prostatitis y otros desordenes malignos, siendo mayor su expresión en pacientes con PCa en comparación con los niveles de expresión reportados en pacientes con HPB y prostatitis (Montano and Djamgoz 2004).

Se ha visto que la normalización por el volumen prostático (densidad de APE mayores a 0,15 son sugestivas de PCa), o la velocidad de aumento de APE en el tiempo (valores mayores de 0,75 ng/mL por año son predictivos de PCa), no parecen ser útiles a nivel clínico debido a las variaciones de la forma de la próstata y relaciones entre epitelio y estroma asi como las limitaciones en obtener los valores de APE anteriores al diagnóstico de PCa para estudiar la evolución de los pacientes.

La baja sensibilidad y especificidad del APE así como la subjetividad del exámen rectal para detectar un aumento o irregularidad en la morfología de la glándula prostática, hacen necesario la identificación de nuevos marcadores con el fin de predecir la severidad de la enfermedad, reducir la morbilidad y evitar tratamientos innecesarios (Diamandis and Yousef 2002, Larkin, Zeidan et al. 2010).

Debido a la naturaleza heterogénea del PCa es difícil obtener un biomarcador adecuado. Se han realizado varios estudios para identificar biomarcadores alternativos para el diagnóstico clínico de PCa, utilizando nuevas plataformas tecnológicas: 2DE (GSTP1) y MS, 2D DIGE, MALDI-MS, SELDI, SELDI TOF MS, LC MS/MS (AMACR, PSMA), proteómica de exosomas y mitocondrias, microarreglos de proteínas acoplado a microdisección con láser de captura, glicoproteómica y fosfoproteómica, etc., en suero, tejido prostático, líneas celulares prostáticas sensibles e insensibles a andrógenos (Chen, Giorgianni et al. 2010, Larkin, Zeidan et al. 2010).

La evidencia actual muestra una tendencia en la utilización de múltiples marcadores (paneles de biomarcadores denominados *Multiplexing*) para caracterizar los fenotipos heterogéneos del PCa en la población, combinando la información demográfica y clínica cuya finalidad es identificar aquellos pacientes que están en riesgo de presentar PCa y determinar el pronóstico de los mismos.

De estos estudios surgen varios marcadores para los diferentes estadios del PCa y que parecen ser prometedores en el diagnóstico de la neoplasia; peptidasa 2 relacionada a kalikreína humana (KLK2 o hK2), el antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), kalikreínas 2-4, 10-13 y la 15, el antígeno 3 de PCa (PCA3) o DD3, antígeno de PCa temprano (EPCA), α -metilacil-CoA racemasa (AMACR), activador de plasminógeno uroquinasa (uPA) y su receptor (uPAR), factores de crecimiento tipo Insulina y proteínas de unión, genes de fusión: TMPRSS2: ERG y TMPRSS2: ETV1, factor beta de crecimiento tumoral (TGF β 1), potenciador del homologo Zeste 2/Histonalisina-N-metiltransferasa (EZH2), hipermetilación de Glutation-S-Transferasa π (GSTP1), proteina secretoria prostática 94 (PSP94), proteina secretoria 3 rica en cisteína (CRISP-3), marcadores de diferenciacion neuroendocrina: cromogranina A, progastrina, E-cadherina, annexina 3 (ANXA3), antigeno de stem cell de próstata (PSCA), hepsina, interleuquina-6 (ligando y receptor) y sarcosina. Aunque estos biomarcadores son prometedores para determinar el diagnóstico, estadificación, pronóstico y monitoreo del PCa, aún no han sido validados clínicamente (Larkin, Zeidan et al. 2010)

En este complejo escenario, los **microRNAs (miRs)** surgen como buenos candidatos para su uso como biomarcadores en cáncer debido a su gran estabilidad en plasma, suero y tejidos fijados y su especificidad, reproducibilidad y consistencia entre individuos de la misma especie (Bremnes, Sirera et al. 2005, Mattie, Benz et al. 2006, Ali, Almhanna et al. 2010).

Además de estas características, los miRs presentan perfiles diferenciales de expresión en distintos tipos de patologías, incluidas el cáncer (Mitchell, Parkin et al. 2008, Huang, Yang et al. 2010, Mahn, Heukamp et al. 2011).

Generalidades de miRs

Los miRs son pequeñas moléculas de ARN simple hebra, endógenas, de aproximadamente 19-23nt de longitud, no codificantes y conservadas en la evolución, responsables de la regulación de entre 30-50% de la expresión génica en mamíferos, y asociados a varios procesos celulares como la proliferación celular, diferenciación, respuesta a estrés, apoptosis, inmunidad, por lo que su desregulación afecta procesos biológicos celulares generando eventos patológicos complejos como es el caso de las enfermedades infecciosas, cardiovasculares, neurodegenerativas y el inicio y progresión del cáncer (Bartel 2004, Coppola, De Maria et al. 2010).

Desde la descripción del primer miR en 1993 en *C.elengans* (Lee, Feinbaum et al. 1993), se han identificado aproximadamente 1000 miRs en el humano, encontrándose entre 500 a más de 10000 copias de un miR específico por célula (Ragan, Zuker et al. 2011, Pritchard, Cheng et al. 2012). Actualmente se cuenta con más de 18000

entradas de precursores de miRs y más de 21000 miRs maduros en el repositorio de secuencias Mirbase (http://www.mirbase.org/).

Los genes de miRs están dispersos a lo largo de todo el **genoma** pudiendo estar codificados en forma monocistrónica o en clúster con otros miRs. Los miR presentes en clúster representan el 37% de los miRs en humanos, y se piensa que existe como mecanismo para coordinar de forma más eficiente la regulación de procesos celulares (Altuvia, Landgraf et al. 2005).

Con respecto a su ubicación, existen dos tipos de miRs: **intergénicos** e **intragénicos**. Los primeros están presentes en secuencias intergénicas conteniendo sus propios elementos reguladores, promotores y señales de terminación. Los segundos (intrónicos generalmente) se co-transcriben de forma independiente o dependiente del gen huésped y se escinden mediante eventos de splicing alternativo (Lynam-Lennon, Maher et al. 2009, Monteys, Spengler et al. 2010). De hecho, aproximadamente el 50% de los miRs de vertebrados son intrónicos (Saini, Enright et al. 2008).

Por otro lado, una gran proporción de los miRs están localizados en sitios frágiles (regiones cromosómicas inestables) o en regiones genómicas asociadas a cáncer que son comúnmente amplificadas o deletadas, lo que sugirió por primera vez su asociación con la carcinogénesis (Calin, Dumitru et al. 2002)

Metabólicamente, son moléculas muy estables, presentando en algunos casos una vida media de varias horas, incluso de días. Esta estabilidad puede ser modulada por la adición post-transcripcional de residuos de adenosina o uracilo en el extremo 3´ del pre-miR o en el miR maduro, motivos de la secuencia o modificaciones en el extremo 3´ como la adenilación por la poly(A) polimerasa, uridilación por la poly(U) polimerasa y la metilación que marca a los miRs para su degradación o los protege de la actividad exonucleolítica, dependiendo del miR y del tejido. Sin embargo, en otros casos el metabolismo debe ser activo (Krol, Loedige et al. 2010).

La regulación de la expresión de miRs autónomos, a nivel de tejido y estadio específico, presenta mecanismos similares a la de los ARNm, presentando regiones promotoras similares a las presentes en los genes que codifican para proteínas, conteniendo islas CpG, secuencias caja TATA y elementos de iniciación que sugieren que los genes de miRs están controlados por factores de transcripción, potenciadores, elementos silenciadores y modificadores de la cromatina al igual que los genes de ARNm (Monteys, Spengler et al. 2010).

En este sentido, los análisis genómicos de las regiones que comprenden los miRs intrónicos mostraron también que aproximadamente el 35% de estos presentan elementos reguladores upstream consistentes con funciones promotoras (Monteys, Spengler et al. 2010). De todos los miRs intrónicos, el 30% presenta elementos regulatorios para Pol II, incluyendo sitios de inicio de la transcripción, islas CpG, secuencias tags y sitios conservados de unión a factores de transcripción. El 5% restante contiene elementos regulatorios de Pol III (secuencias caja A/B), sugiriendo que la expresión transcripcional de miRs intrónicos ocurre de forma independiente a la expresión de los genes huésped (Monteys, Spengler et al. 2010).

Los genes de miRs son transcriptos por la Pol II y Pol III en moléculas precursoras denominadas pri-miRs de más de 100 nucleótidos de longitud y que presentan uno o varios bucles. Los pri-miRs son sustrato para dos enzimas pertenecientes a las familias de RNasas III, Drosha y Dicer operando en complejo con proteínas de unión a ARN doble hebra entre ellas DGCR8 y la proteína de respuesta a la transactivación (TRBP) (Borchert, Lanier et al. 2006, Monteys, Spengler et al. 2010). A nivel nuclear, el complejo Drosha-DGCR8 procesa al miR primario (pri-miR) de forma co-transcripcional, generando una molécula precursora en horquilla denominada pre-miR de aproximadamente 70 -100 nucleótidos de longitud que presenta en 5´ una caperuza 7-metilguanosina y una cola poly (A) en 3´ (vía canónica). Algunos pre-miRs son producidos de intrones cortos denominados mirtrons como resultado del splicing, evitando así el procesamiento por Drosha-DGCR8. En cualquiera de las dos situaciones, las moléculas generadas son exportadas al citoplasma, donde son procesadas por Dicer, generando dúplex de miR/miR* de aproximadamente 20 pares de bases (Krol, Loedige et al. 2010). En mamíferos, la Argonauta 2 (AGO2), que posee actividad endonucleasa tipo RNasa-H, puede colaborar con el procesamiento de Dicer mediante el clivaje del brazo 3´ de algunos pre-miRs, formando así un intermediario adicional procesado denominado precursor de miR clivado por AGO2 (ac-pre-miR) (Figura 8)(Krol, Loedige et al. 2010).

Luego de que el dúplex miR/miR* ingresa en el citoplasma, una de las hebras, la hebra líder, es preferencialmente incorporada al complejo de silenciamiento inducido por miR (miRISC), mientras que la hebra pasajera (miR*), es liberada y degradada en algunos casos, aunque también puede ser incorporada en el complejo y presentar actividad reguladora. Generalmente, la hebra retenida es la que presenta una menor estabilidad en el extremo 5´ del dúplex miR/miR* (Schwarz, Hutvagner et al. 2003).

Como parte de este complejo, los miRs maduros reprimen la expresión génica disminuyendo la eficiencia traduccional y los niveles de mRNA mediante la deadenilación y degradación de cientos de ARNms a través del apareamiento complementario de bases entre el extremo 5' del miR y el extremo 3' UTR de transcriptos específicos (Maroney, Yu et al. 2006, Pang, Kwok et al. 2009, Guo, Ingolia et al. 2010, Krol, Loedige et al. 2010). La región de apareamiento complementario entre el miR y el ARNm se denomina secuencia "semilla" o "seed" y posee entre 2 a 8 nt.

Las proteínas AGO2, que interaccionan directamente con los miRs y la proteína glicina triptófano (GW182), actúan como efectores downstream en la represión y son factores esenciales en el ensamblaje y funcionamiento del complejo misRISC (Krol, Loedige et al. 2010).

Los procesos de represión traduccional involucran la reducción en el inicio de la traducción o el aumento del desprendimiento de los ribosomas y son menos conocidos que la deadenilación y degradación de los ARNm blancos de miRs (Pasquinelli 2012). Los ARNm reprimidos traduccionalmente pueden acumularse en focis citoplasmáticos discretos denominados cuerpos P o en cuerpos glicina triptófano (GW) (Krol, Loedige et al. 2010, Pasquinelli 2012). Los cuerpos P son cuerpos dinámicos, que funcionan como regiones de almacenamiento y decaimiento de los ARNm reprimidos, y por lo tanto están enriquecidas de proteínas relacionadas a la represión

traduccional, deadenilación del ARNm, decapping y degradación, proteínas argonauta, GW182, microARNs y ARNm reprimidos. Los compartimentos endosomales tardíos especializados (MVBs) también han sido identificados como organelos que contribuyen a la función de los miRs. En el lúmen, estos organelos acumulan vesículas las cuales son transportadas a los lisosomas para su degradación o para su liberación al medio extracelular a través de exosomas (Krol, Loedige et al. 2010, Pasquinelli 2012).



Figura 8: Biogénesis de miRs. Tomado de (Rottiers and Naar 2012).

La represión mediada por miRs puede conducir también a la disminución de los ARNm blanco, y esto está asociado al acortamiento de la cola poly (A) respondiendo a un modelo donde el miR provoca la deadenilación del ARNm promoviendo el de-capping y posterior degradación del ARNm. La deadenilación esta mediada por la proteína glicina triptófano (GW182), de 182 kDa. El extremo N-terminal de GW182 interacciona con AGO2 y el C-terminal con las proteínas de unión a cola poly-A (PABP), reclutando las deadenilasas CCR4 y CAF1 (Guo, Ingolia et al. 2010).

Sin embargo la función de los miRs no se limita únicamente a una modulación negativa de sus blancos, y en éste sentido existen varios reportes que indican que los miRs no solo actúan como represores sino que también pueden actuar como activadores de la traducción. En ausencia de suero, o en su defecto en bajas concentraciones del mismo, el complejo miRISC-AGO2 presenta funciones activadoras de la traducción. Este cambio requiere la presencia de la proteína FXR1, proteína 1 relacionada al X-fragil (Vasudevan and Steitz 2007, Krol, Loedige et al. 2010).

Con respecto a la interacción directa y específica entre el miR y el ARNm blanco, la gran mayoría de los miRs forma dúplex parciales ARN: ARN con sus ARNm blancos, con apareamientos no coincidentes y burbujas de nucleótidos desapareados. A su vez, la mayoría de los ARNm estudiados hasta la fecha están regulados a nivel del 3'UTR y la única región del dúplex que presenta una complementariedad exacta es la que involucra a la región semilla del miR y el sitio blanco del ARNm, mientras que los apareamientos incorrectos que se den en esta región pueden eventualmente ser compensados por apareamientos a nivel del extremo 3'del miR, sugiriendo una complejidad mayor en las interacciones. Sin embargo, hay raras excepciones donde se da una complementariedad perfecta entre el miR y el sitio blanco del ARNm, produciéndose el clivaje de este último (Pasquinelli 2012).

De acuerdo a varios análisis bioinformáticos, existen cerca de 100 blancos de mRNA diferentes por cada miR (Cho 2007, Pang, Kwok et al. 2009). Con el propósito de identificar los genes blancos de un miR dado, se han desarrollado numerosos métodos que incluyen aproximaciones empíricas como estudios genéticos a pequeña escala (identificación de blancos a través de análisis de supresión fenotípica) o análisis bioquímicos a gran escala para aislar ARNm blancos o secuencias y estudios computaciones consistentes en algoritmos de predicción basados en la reglas bioquímicas que gobiernan la regulación mediante complementariedad de pares de bases entre el miR y el ARNm. Los métodos computacionales para la predicción de blancos de miRs se basan en algoritmos que incorporan diversos criterios. La mayoría de ellos utilizan conjuntos de conclusiones comunes derivadas de análisis experimentales, que reducen el número de falsos positivos en las predicciones. Esto incluye un requerimiento de un apareamiento perfecto del tipo Watson-Crick entre la región 5' del miR y la secuencia de ARNm, especialmente de la región denominada semilla entre el nucleótido 2 y 7 del miR. Además, la lista de genes blancos se reduce utilizando criterios de conservación. Así mismo, la accesibilidad del sitio blanco en la estructura secundaria del 3'UTR es utilizada comúnmente como pautas de predicción. Aunque estos criterios generales han servido para la predicción exitosa de varios blancos de miRs, la flexibilidad existente entre la unión del miR con el ARNm genera un patrón aun más amplio de mecanismos de interacción, lo que tal vez explique que existeun número acotado de pares miR-blancos validados experimentalmente (Pasquinelli 2012, Pritchard, Cheng et al. 2012).

Dentro de los métodos computacionales disponibles, **miRecords** (http://mirecords.biolead.org) es un recurso desarrollado por Biolead.org, Laboratorio de Investigación de Bioinformática y Biología Computacional (Xiao, Zuo et al. 2009). Este software de predicción, consiste de dos componentes: Blancos Validados experimentalmente y Blancos Predichos que corresponde a la integración de los blancos de miRNA establecidos por 11 programas o herramientas de predicción. Estos sistemas de predicción se conocen como **DIANA-microT**, **MicroInspector**, **miRanda**, **MirTarget2**, **miTarget**, **NBmiRTar**, **PicTar**, **PITA**, **RNA22**, **RNAhybrid**, y **TargetScan** y utilizan algoritmos y criterios propios que se resumen brevemente en la Tabla 1 del Anexo.

La aproximación experimental para la búsqueda de genes blanco de un miR también requiere ensayos funcionales. Los estudios sobre la interacción con los diferentes blancos predichos, incluyendo la modulación del ARNm y la proteína candidata en tejido normal y tumoral, el análisis del efecto global del miR en las vías celulares son fundamentales para encontrar los genes blancos de regulación por un miR en un tejido dado. De hecho, gran parte de los miRs se expresan de forma tejido-específico o estadio específico en el desarrollo y participan en la regulación de varios procesos celulares como se menciono anteriormente (Coppola, De Maria et al. 2010).

Para el análisis de vías moleculares moduladas por miRs existen herramientas de análisis como"**WEB**based **GE**ne **SeT A**naLysis **T**oolkit" (WebGestalt). **WebGestalt** (http://www.webgestalt.org) es una web de libre acceso basada en un kit de herramientas de análisis de sets de genes. Fue diseñada para genómica funcional, proteómica y estudios genéticos de gran escala de los cuales se generan continuamente grandes listas de genes (e.g. sets de genes diferencialmente expresados, sets de genes co-expresados, etc.). WebGestalt incorpora información de diferentes recursos y fuentes públicas y permite un entendimiento mayor de la significancia biológica de los genes estudiados. La versión WebGestalt, actualizada en enero de 2013, dispone de 8 organismos y presenta diferentes tipos de análisis: enriquecimiento de vías y categorías mediante Análisis de Ontología genética, análisis de enriquecimiento en las vías KEGG, en la base de datos Wikipathways, análisis de vías comunes, análisis de blancos para factores transcripcionales (MSigDB), análisis de blancos de miR (MSigDB), análisis de redes de interacción entre proteínas, y análisis de enriquecimiento a nivel de bandas citogenéticas (Wang, Duncan et al. 2013).

Además de los análisis individuales para descubrir genes blanco de miRs, están actualmente accesibles largos catálogos de información sobre expresión génica en tumores, como "The Human Protein Atlas" que proporciona niveles de expresión proteica en muestras normales y tumorales de próstata (entre otros tejidos). El proyecto sueco **Human Protein Atlas** (http://www.proteinatlas.org), fue fundado por la Fundación de Knut y Alice Wallenberg y fue establecido para permitir una exploración sistemática del proteoma humano usando Antibody-Based Proteomics. Para esto se combinó la generación de anticuerpos purificados por afinidad con el perfil proteico en múltiples tejidos en microarreglos de tejidos. Los análisis con microscopía confocal usando líneas celulares humanas están destinados a la localización más detallada de las proteínas. El principal objetivo es producir anticuerpos específicos para proteínas blanco de humanos usando un método de producción de alto rendimiento que involucra el clonado y la expresión de Protein Epitope Signature Tags (PrESTs). Luego de la

purificación los anticuerpos son utilizados para estudiar el perfil de expresión en células y tejidos y para análisis funcionales de las proteínas en un amplio rango de plataformas. Así el portal de libre acceso, cuenta con millones de imágenes de alta resolución que muestran la distribución espacial de proteínas en 44 tejidos humanos normales diferentes, 20 tipos de cáncer diferentes y 46 líneas celulares humanas diferentes. La expresión de proteínas anotadas en este portal tiene como objetivo crear un mapa comprensivo de los perfiles de expresión de proteínas en tejidos humanos normales y células (Uhlen, Bjorling et al. 2005, Uhlen, Oksvold et al. 2010).

Por último, hoy se dispone también de numerosos estudios de microarreglos o secuenciado masivo de tumores, que han sido recopilados en diversas bases de datos. Entre ellas, bases de acceso público como el Gene Expression Omnibus (GEO) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y plataformas de acceso comercial como Oncomine, los cual recopilan, clasifican y curan los estudios de expresión génica en cáncer de grandes cohortes de pacientes oncológicos. Con la tecnología de microarreglos de ADN se ha generado una masiva producción de datos oncogenómicos, y paralelamente se han desarrollado recursos bioinformáticos unificadores. Más de 100 estudios publicados han presentado análisis de muestras de cáncer humano, identificando perfiles de expresión génica para la mayoría de los tipos y subtipos de cáncer y encontrando correlación entre estos perfiles de expresión y varias características del tumor incluyendo: grado tumoral o estadio de diferenciación, potencial metastásico y sobrevida del paciente. Se han identificado nuevos biomarcadores tisulares y serológicos para el uso como blancos terapéuticos potenciales.

La herramienta **ONCOMINE** (http://www.oncomine.org/) es una plataforma interactiva que contiene datos de microarreglos de expresión génica de muestras de tejidos de pacientes con cáncer, provenientes de los estudios más grandes publicados hasta el momento (normalizados a fin de ser comparables), junto con datos histológicos y clínicos (Cáncer vs. Normal, Cáncer vs. Cáncer [Histología del Cáncer; Multi-Cáncer], Análisis de Subtipos de Cáncer [Evolución clínica; Metástasis vs. Primario; Subtipo Molecular: Biomarcadores; Subtipo Molecular: Mutaciones; Subtipo Patológico: Grado; Subtipo Patológico: Estadío; Respuesta del Paciente al Tratamiento; Recurrencia vs. Primario; Otras], Cáncer vs. Línea de Base [ADN únicamente], Vías y Drogas [Sensibilidad a Drogas y Perturbación]). Asimismo, ONCOMINE proporciona una interfase con herramientas para interrogar correlaciones entre la expresión de genes y datos clínicos específicos. Estas herramientas nos permiten la comparación rápida de miles de genes en muestras de cánceres humanos provenientes de estudios independientes (Rhodes, Yu et al. 2004).

miRs en Cáncer

La primera conexión entre miRs y cáncer fue realizada por Calin et al. quienes mostraron la delección o subexpresión de la región del cromosoma 13q14 en más de la mitad de los casos de leucemia linfocítica crónica de células B (CLL), región donde existen dos miRs (miR-15 y miR-16) que se expresan pero que no codifican para productos proteicos (Calin, Dumitru et al. 2002). Inmediatamente estudios independientes describen por primera vez como un miR contribuye a la carcinogénes, siendo el caso de mir-17 y la vía oncogénica de myc (Mayr, Hemann et al. 2007).

Posteriormente, un enorme número de estudios han demostrado que los miRs juegan un rol importante en el inicio y progresión de diferentes patologías oncológicas y tanto la sub-expresión como la sobre-expresión de miRs pueden contribuir a la etiología del cáncer (Volinia, Calin et al. 2006, Porkka, Pfeiffer et al. 2007, Lynam-Lennon, Maher et al. 2009, Metias, Lianidou et al. 2009, Pang, Kwok et al. 2009).

La expresión aberrante de miRs en cáncer, puede deberse a alteraciones en el número de copias, modificaciones epigenéticas (especialmente la metilación del ADN), mutaciones en el precursor del miR en las regiones de unión a DGCR8 y clivaje de Drosha, afectando así el procesamiento del miR y su abundancia, además de fallas en el procesamiento del miR y desregulación de sus promotores. Por otro lado, se ha visto que Dicer, una enzima necesaria para el procesamiento de los miR, esta sobre-expresada en PCa (Chiosea, Jelezcova et al. 2006). Más tarde, se comprendió que existe una alteración en diversos componentes de la vía de síntesis y la vía efectora del silenciamiento por miRs en varios tipos de cáncer (Bahubeshi, Tischkowitz et al. 2011).

Los miRs cuya expresión esta incrementada en tumores se denominan **oncomiRs** o miRs oncogénicos; estos promueven el desarrollo del tumor inhibiendo a genes supresores de tumores, como es el caso del clúster mir-17-92 en linfoma y cáncer de pulmón, miR-21 en cáncer de mama, miR-221 en glioblastoma, miR-183 en cáncer de colon entre otros (Ciafre, Galardi et al. 2005, Hayashita, Osada et al. 2005, He, Thomson et al. 2005, Bandres, Cubedo et al. 2006, Zhu, Si et al. 2007).

La desregulación de oncomiRs está asociada con alteraciones genéticas y epigenéticas, incluyendo deleciones, amplificaciones, mutaciones puntuales o metilación aberrante del ADN, que repercuten en la activación transcripcional (Calin and Croce 2006).

En la oncogénesis, los miRs que presentan una disminución en su expresión son denominados **miRs supresores de tumores**. Estos previenen el desarrollo tumoral en el tejido normal mediante la inhibición de oncogenes, y un ejemplo es el de let-7 en cáncer de pulmón (Takamizawa, Konishi et al. 2004, Kent and Mendell 2006, Zhang, Pan et al. 2007).

Desde los estudios de Lawrie et al., donde reportaban que los niveles en suero de miR-21 estaban asociados con la sobrevida sin relapso de pacientes con linfoma de células B, y sugiriendo su posible rol como biomarcador de diagnóstico de la enfermedad, se han reportado a la fecha gran cantidad de estudios donde se identifican **perfiles únicos de expresión** de miRs en diferentes tipos de cáncer, así como en diferentes estadios de la enfermedad (Volinia, Calin et al. 2006, Porkka, Pfeiffer et al. 2007, Lawrie, Gal et al. 2008, Lynam-Lennon, Maher et al. 2009, Pang, Kwok et al. 2009). En este sentido Lin et al. reportan diferencias significativas en suero de varios miRs: hsamiR-126, hsa-miR-183 y hsa-miR-222 entre pacientes con cáncer de pulmón no a células pequeñas (NSCLC) y controles, sugiriendo la utilización de hsa-miR-126 y hsa-miR-183 como potenciales **biomarcadores** en suero para NSCLC metastásico (Lin, Mao et al. 2012).

Una de las características que potencian el uso de miRs como biomarcadores, es su gran estabilidad en diferentes compartimentos. Esta estabilidad sugiere que los mismos están eficientemente protegidos de la acción de las ARNasas. Una de las hipótesis que se maneja es la asociación o empaquetamiento de los miRs en exosomas secretados por las células (Valadi, Ekstrom et al. 2007). Otra explicación alternativa es la asociación de los miRs a otras moléculas, por ejemplo los complejos de ARN-proteína (ejemplo miRs unidos a Ago2 [complejo silenciador inducido por ARN-RISC u otras; Ago1, Ago3 y Ago4]), o modificaciones del miR que lo hacen resistente a la acción de las ARNasas (Krol, Loedige et al. 2010). Si bien no se sabe con certeza como se afectan los niveles de miRs en sangre en los diferentes tipos de neoplasias (Chen, Ba et al. 2008), no parece que esta relación este afectada o tenga asociación con las células de la sangre. Sin embargo hay varias posturas al respecto: los miRs se originan de células tumorales en la sangre (Mitchell, Parkin et al. 2008), son el resultado de células tumorales muertas y lisadas o células tumorales que liberan los miRs al medio (Chin and Slack 2008) o son resultado de exosomas derivados del tumor (Kharaziha, Ceder et al. 2012).

La diferencia en los perfiles de expresión de miRs permite crear asociaciones entre los diferentes tipos de neoplasias. En los trabajos de Volinia et al. se observa una agrupación de los tumores de próstata, colon, estómago y páncreas por similitud en la expresión de miRs mientras que pulmón y mama presentan perfiles claramente diferentes en un set de 540 muestras (Volinia, Calin et al. 2006). Específicamente en próstata Volinia et al. determinan la sobre-expresión en PCa de los miRs: miR-21, miR-17-5p, miR-191, miR-29b-2, miR-223, miR-199a-1, miR-146, miR-181b-1, miR-20a, miR-32, miR-92-2, miR-214, miR-30c, miR-25 y miR-106a (RB1) y sub-expresión de miR-218-2 (Volinia, Calin et al. 2006). Por otro lado, Bandres et al. analiza la expresión por qPCR de 156 miRs maduros de líneas celulares de cáncer colorectal, muestras pareadas de tejidos tumorales y normales, detectando 13 miRs diferencialmente expresados, entre ellos hsa-miR-183 y hsa-miR-96 y de forma menos significativa, hsa-miR-182, pertenecientes al mismo clúster (Bandres, Cubedo et al. 2006). También se detectan perfiles diferenciales de miRs (miR-195 y let-7a) en la circulación de individuos con cáncer de mama, comparado a los perfiles en individuos control, y se observa una correlación entre los miRs circulantes y las variables patológicas como el estatus nodular y la presencia o ausencia de receptores de estrógenos (Heneghan, Miller et al. 2010). En cáncer de pulmón también se han visto diferentes perfiles de expresión, encontrándose correlación entre los perfiles moleculares y la sobrevida de pacientes (Yanaihara, Caplen et al. 2006).

Así, el análisis de perfiles de expresión de miRs, además de la identificación de sus blancos en cáncer podrían permitir el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas, orientadas a inhibir la expresión de miRs oncogénicos, o elevar la expresión de miRs supresores de tumores. En el caso de miRs supresores de tumores, esto se ha llevado a cabo mediante modificaciones epigenéticas (tratamiento con inhibidores de metiltransferasas: 5-Adc) o re introduciendo de forma exógena los miRs, provocando así la disminución de alguna característica tumoral de la célula; crecimiento, invasión, etc. Así mismo, el análisis de la localización genómica de los miR podría servir en la determinación de las funciones y los mecanismos regulatorios a los que están sometidos, determinando finalmente las causas de su alteración en el tumor, en este aspecto se ha reportado la correlación positiva entre la

expresión de miRs con genes altamente sobre-expresados en tumores de próstata (Ambs, Prueitt et al. 2008, Prueitt, Yi et al. 2008).

En **PCa** particularmente, se han reportados varios trabajos proponiendo a los miRs como biomarcadores de estadificación, definiéndolos como moléculas de fácil extracción mediante mecanismos poco invasivos, y que se expresan de forma diferencial entre diferentes estadios de la neoplasia, pudiendo discriminar muestras normales de Hiperplasia Benigna Prostática y adenocarcinoma de próstata (Mahn, Heukamp et al. 2011). Del mismo modo, los resultados de Mitchell et al. muestran la posibilidad de discriminar pacientes con PCa de los pacientes control de forma específica y sensible, mediante la detección de miR-142 en sangre (Mitchell, Parkin et al. 2008).

miRs en PCa

Hasta la fecha, cerca de 50 miRs han sido asociados con PCa, sin embargo, los estudios de perfiles de expresión presentan resultados poco concordantes en referencia a la identidad de los miRs desregulados, debido probablemente a diferencias metodológicas y a la baja cobertura de alguno de los análisis (Volinia, Calin et al. 2006, Porkka, Pfeiffer et al. 2007, Ambs, Prueitt et al. 2008, Schaefer, Jung et al. 2010, Szczyrba, Loprich et al. 2010, Hassan, Ahmad et al. 2012).

Sin embargo, un grupo de más de 20 miRs, fue identificado en por lo menos dos estudios independientes (sobreexpresados: hsa-miR-32, -182, -31, 26a, 200c, 196a y el clúster hsa-miR-106b-25, -21, -93, -125b, -183, -96, -200c, -370, -375, y sub-expresados: -24, -100, -26a-b, -29a-c, -30a-e, -125a-b, -143, -145, -199a-5p, -221, let7b-c, hsa-miR-520h, -494, -490 y el clúster miR-1-133a, 101, entre otros (Porkka, Pfeiffer et al. 2007, Ambs, Prueitt et al. 2008, Varambally, Cao et al. 2008, Pang, Kwok et al. 2009, Tong, Fulgham et al. 2009, Folini, Gandellini et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Leite, Canavez et al. 2011, Leite, Sousa-Canavez et al. 2011, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Walter, Valera et al. 2013).

Los estudios de Walter et al. analizan por primera vez los perfiles de expresión de miRs en muestras pareadas de PCa con diferentes grados de Gleason, tejido normal epitelial y del estroma adyacente, identificando perfiles de expresión diferencial entre muestras tumorales y normales, así como un set de miRs que están expresados diferencialmente en estroma y tejido epitelial de la glándula normal; let-7, hsa-miR-1, 98, 126, 132, 142, 143, 144, 205, 210 (Tsuchiyama, Ito et al. 2013, Walter, Valera et al. 2013).

Se ha reportado también que la vía de andrógenos contribuye a la regulación de ciertos miRs en PCa, tal es el caso de hsa-miR-338, hsa-miR-126, hsa-miR-181b-1, hsa-miR-181c y el clúster hsa-miR-221, entre otros (Ambs, Prueitt et al. 2008). En este sentido, Ribas et al., reporta el incremento de miR-21 dependiente de la activación de los receptores de andrógenos, desencadenando de forma concomitante el crecimiento celular andrógeno independiente y resistencia en PCa (Ribas, Ni et al. 2009).

Por otro lado, Porkka et al. reporta perfiles de expresión diferencial de miRs en líneas celulares de PCa, muestras xenotransplantes de PCa y muestras de tejido prostáticos, encontrando diferencias de expresión en células AR

negativas y AR positivas, sugiriendo una posible regulación andrógeno dependiente de algunos miRs (Porkka, Pfeiffer et al. 2007). En este sentido Nadiminty et al. reporta la inhibición del crecimiento tumoral prostático mediante la regulación de la expresión de AR a través de let-7c (Nadiminty, Tummala et al. 2012), y el involucramiento de diferentes miRs en el pasaje de un estado andrógeno dependiente- independiente (Shi, Ma et al. 2004, Shi, Xue et al. 2007, Shi, Tepper et al. 2008, DeVere White, Vinall et al. 2009).

Sin embargo, son pocos los estudios que han analizado los perfiles de expresión de miRs en PCa metastásico, a pesar de su alta frecuencia (más del 90% de los casos con PCa avanzado presentan metástasis osea) (Peng, Guo et al. 2011, Watahiki, Wang et al. 2011). Esto es debido a la falta de modelos experimentales que mimeticen la enfermedad de forma adecuada en este tipo de estudio, como lo son los modelos xenotransplante. Por otro lado, los tejidos prostáticos de pacientes, además de presentar una composición heterogénea, son poco disponibles (Huang, Kim et al. 2002).

Mediante la generación de modelos xenotransplante de PCa derivados de pacientes, y utilizando la plataforma Illumina se pudo identificar la expresión diferencial de miRs con funciones en la metástasis de PCa, determinando la desregulación de un conjunto de miRs; hsa-miR-28-3p, hsa-miR-339, hsa-miR-144 y 144*, hsa-miR-126*, hsa-miR-16, hsa-miR-34a, hsa-miR-126*, hsa-miR-145, hsa-miR-205 y hsa-miR-31, este último reportado previamente como inductor de la migración y la invasión tisular en cáncer de colon mediante la regulación de TIAM1 (Watahiki, Wang et al. 2011). Por otro lado, la desregulación de ciertos miRs como hsa-miR-21, hsa-miR-146a, hsa-miR-221 y 222, hsa-miR-143 y hsa-miR-145, hsa-miR-125b está asociada a un mal pronóstico, progresión de PCa y desarrollo de metástasis (Pang, Kwok et al. 2009, Folini, Gandellini et al. 2010, Peng, Guo et al. 2011).

Finalmente, se ha planteado que los perfiles de expresión de miRs son más exactos frente a los perfiles de expresión de ARNm a la hora de clasificar tumores pobremente diferenciados, por lo que estos perfiles podrían ser usados en el desarrollo de nuevos herramientas diagnósticas para tumores que carecen de buenos biomarcadores predictivos como lo es en PCa (Rosenfeld, Aharonov et al. 2008, Srivastava, Suy et al. 2011).

miR-183

Los estudios de perfiles de miRs en retina, permitieron al grupo de Xu et al. identificar un clúster de miRs parálogos específico de órganos sensoriales (fotoreceptores, células bipolares retinales y amacrinas) que incluía a miR-183, miR-96 y miR-182 en el cromosoma 6qA3 de ratones y que poseía una sintenia conservada en el cromosoma 7q32.2 de humanos (Figura 9.A.). Según los autores, estos miRs estarían participando en el mantenimiento del fenotipo maduro de la retina y su función.



Figura 9: A. Organización genómica del clúster miR-183/96/182, la misma es similar en ratones, humanos y zebrafish. Los números muestran la distancia en pb o kb entre los genes lindantes y los miRs del clúster. Imagen tomada de (Xu, Witmer et al. 2007). B. Ubicación intergénica del clúster en Humanos, se detallan genes lindantes *nrf1* y *ube2h*. Imagen tomada de http://www.ensembl.org C. Secuencia del precursor de hsa-miR-183. Imagen tomada de http://www.ensembl.org

Mediante análisis globales de expresión génica (microarreglos) y reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (RT-qPCR), los autores encontraron que estos tres miRs presentaban homología de secuencia, sugiriendo un origen a partir de duplicaciones a partir de un ancestro común. También probaron que se transcribían en tándem, como un transcripto primario policistrónico y que estaban sobre-expresados específicamente en células neurosensoriales de la retina de ratones adultos. Mediante análisis de secuenciación genómica, se mapeó el clúster miRNA-183-96-182 (de telómero a centrómero) y se determinó que la región ortóloga en humanos está en el cromosoma 7q32.2. (Xu, Witmer et al. 2007). El clúster en humanos presenta un re-arreglo similar con un tamaño de 4,3 kb y se localiza aproximadamente a 60kb del gen del factor respiratorio nuclear 1 (*nrf1*) y de la enzima conjugada a ubiquitina E2H (*ube2h*) (Figura 9. B.).

La región 5' contiene una isla CpG (3,4 kb upstream de miR-183) (Ozsolak, Poling et al. 2008, Chien, Sun et al. 2011), asociada a un clúster con sitios de unión a factores de transcripción relacionados a los órganos sensoriales; CHX10 (involucrado en el desarrollo de la retina), RORA 1 y 2 (involucrados en la regulación del ritmo circadiano), 2 sitios de unión para OLF1 (específico de neuronas olfativas), múltiples sitios de unión para OTX1 y PAX2 (involucrados en el desarrollo de la retina y el oído interno). Otros factores incluyen: Pax5, Pou3F2, RFX1 y LMO2 (Figura 10). Por otro lado, la región regulatoria upstream del clúster miR-183 presenta una marcada conservación y enriquecimiento de regiones de unión a la proteína codificada por eloncogén de meduloblastoma *otx2* (Xu, Witmer et al. 2007, Bunt, de Haas et al. 2010), y al reconocido factor de transcripción GATA3 (Chen, Xiang et al. 2014).



Figura 10: Esquema de los elementos reguladores potenciales en la región del clúster 5' miR-183/96/182. En el cromosoma humano Chr7q32.2 Los rectángulos en color celeste denotan las islas CpG; los sitios putativos para los factores de transcripción se describen en verde, donde los números entre paréntesis indican la distancia al primer nucleótido del pri-miR-183. Los números marcados en negro indican los tamaños de los fragmentos en pares de bases. Imagen tomada de (Xu, Witmer et al. 2007).

Los miembros de este clúster en humanos, también presentan una similitud considerable de secuencia (Figura 11), particularmente los residuos 2-8 que conforman la secuencia semilla, cuya complementariedad a los sitios blanco en los ARNm determina que transcripto será regulado. En el extremo 5', 7 de los 8 nucleótidos son idénticos entre miR-182/miR-96 y miR-183/miR-96 y 6 de los 8 nucleótidos son idénticos entre miR-182 y miR-183. Esta similitud de secuencia sugiere que los tres miRs de este clúster podrían regular a los mismos genes blancos.

> miR-183 uauggcacugguagaauucacu miR-96 uuuggcacuagcacauuuuugcu miR-182 uuuggcaaugguagaacucacacu

Figura 11: Secuencias de los miRs: hsa-miR-183, hsa-miR-96 y hsa-miR-182 pertenecientes al clúster miR-183. Imagen tomada de (Mihelich, Khramtsova et al. 2011).

En este sentido, el análisis de los genes blancos predictivos entre los tres diferentes miembros del clúster (www.miRecords.com) muestra un número mayor de coincidencias entre genes que presentan sitios blancos para hsa-miR-182 con hsa-miR-96 y siendo menor las coincidencias entre el número de genes blancos entre hsa-miR-183 y hsa-miR182/96, tal como fue descrito por Xu et al. para el clúster de ratón (Xu, Witmer et al. 2007).

Desde el punto de vista funcional, el clúster miR-183/96/182 ha mostrado estar involucrado en diversos aspectos de la fisiología del sistema nervioso. Weston et al. reportan la expresión de miR-96, miR-182 y miR-183 en el oído interno de ratón y Klloosterman et al. su expresión en los ganglios de la espina dorsal (Weston, Pierce et al. 2006, Li, Kloosterman et al. 2010, Weston, Pierce et al. 2011). Su evidencia sugiere que miR-182, miR-183 y miR-96 pertenecen a un clúster de miRs específico de tejido sensorial, estando aumentados también en epitelio olfatorio y epitelio lingual. Así mismo, Li et al. reportan funciones conservadas durante el desarrollo de células de cabello y neuronas en el oído interno y línea lateral, importantes en la regulación del destino de dichas células (Li and Fekete 2010).

En acuerdo con estos hallazgos, muchos de los genes blancos predichos para los miembros de este clúster son importantes para el desarrollo y funcionamiento de órganos sensoriales. Por otro lado, se ha descrito que la regulación de este clúster en retina esta mediado por un rápido decaimiento en respuesta a la adaptación a la oscuridad de la retina del ratón. Esta regulación es fisiológicamente relevante debido a que se aumenta la expresión de un transportador específico de glutamato necesario para eliminar el glutamato de la hendidura sináptica en condiciones de baja luz (Krol, Loedige et al. 2010).

Otras funciones del clúster están asociadas a los procesos de decidualización, transformación morfológica y funcional del compartimento endometrial estromal necesaria para el control de la invasión embrionaria y la formación de la placenta, y por lo tanto, para el establecimiento del embarazo. Durante este proceso, los miRs del clúster miR-183 están disminuidos (Estella, Herrer et al. 2012).

También se han reportado funciones fisiológicas reguladoras de hsa-miR-183, donde en condiciones de estrés agudo, se incrementan sus niveles de expresión, modulando directamente a la proteína SC35 (factor de splicing), induciendo la síntesis de una forma alternativa de splicing de AchE en la amígdala, sugiriendo además su posible vinculación con otros factores de splicing como MBNL1, identificado como blanco predictivo de miR-183 en varios algoritmos de predicción (Meerson, Cacheaux et al. 2010).

Otros de los aspectos funcionales interesantes del clúster es su vinculación con la regulación de la adipogénesis, y en este aspecto se ha identificado a hsa-miR-183 como promotor de la diferenciación de los preadipocitos y de la adipogénesis mediante la inactivación de la vía de señalización canónica Wnt/β-catenina mediante la modulación directa de LRP6 (Chen, Xiang et al. 2014).

Finalmente, se han reportado funciones oncogénicas y supresoras de tumores de los tres miembros del clúster en un número importante de neoplasias, incluidas el PCa como se desarrollará en la próxima sección.

Nuestro trabajo estudia la expresión de hsa-miR-183-5p en PCa, por lo que nos centraremos preferentemente en los estudios que lo vinculan con cáncer y preferentemente de próstata.

Clúster hsa-miR-183 en Cáncer

Bajo circunstancias biológicas normales la expresión del clúster miR-183 está restringida a las neuronas sensoriales ciliadas, por lo que se sugiere que el clúster es parte de un mecanismo evolutivo establecido para el mantenimiento y longevidad de las neuronas sensoriales. En el cáncer, podría especularse que la sobre-expresión del clúster favorece al fenotipo tumoral otorgando a la célula una ventaja en la sobrevida (Weeraratne, Amani et al. 2012).

Detallaremos brevemente los estudios de perfiles de expresión de miRs en PCa, abocándonos finalmente a los trabajos que mencionan blancos directos de hsa-miR-183-5p. A lo largo del análisis es necesario tener presente que este miR se expresa en clúster, y debido a la homología de secuencia entre los tres miRs, podrían modular los mismos blancos y por lo tanto ejercer roles regulatorios de las mismas vías potenciando así el efecto. Por ello se analiza también brevemente la asociación de hsa-miR-96 y hsa-miR-182 en cáncer.

Existe una vasta bibliografía con respecto a la sobre-expresión y sub-expresión de los miembros del clúster miR-183 en cáncer. Sin embargo, su mecanismo regulatorio es desconocido.

Diversos estudios muestran que mir-183 está sujeto a la regulación transcripcional por factores de transcripción desregulados en cáncer. Así se han reportado estudios a favor de una regulación de hsa-miR-183 por p53 (Tarasov, Jung et al. 2007). Posteriormente, estudios genómicos a gran escala permitieron identificar varios sitios de unión a p53 en el promotor de hsa-miR-183, sugiriéndose un mecanismo por el cual p53 induce la expresión de hsa-miR-183 promoviendo la desestabilización y degradación de los oncogenes: β-TrCP1, c-myc, MDR-1, IGF2BP1, ZEB1, TCF-4 y NFKB1 y suprimiendo así la expresión de factores promotores de la metástasis (Boominathan 2010, Liu and Chang 2012). En este sentido, en los estudios de Sarver et al. se reporta la unión del supresor de tumores PDRM5, a regiones promotoras del clúster miR-183-96-182, sugiriendo su posible silenciamiento vía los remodeladores de cromatina HDAC1 y G9a (Sarver, French et al. 2009). Así mismo, en el trabajo de Lodrini, se reporta la unión de MYCN, (proto-oncogen) al promotor de hsa-miR-183 y el reclutamiento de co-represores como HDAC2, generando un estado reprimido de la cromatina. El mecanismo de regulación propuesto parece ser independiente de los eventos regulatorios en los genes lindantes al clúster (NRF1 y UBE2H), ya que los mismos mantienen un estado transcripcionalmente activo con un enriquecimiento de marcadores de cromatina activa: H3K4me3 y H3K36m3 y una presencia reducida de H3K27me3, indicando así que los eventos en el sitio de inicio de transcripción de hsamiR-183 es específico y no es consecuencia de los eventos en regiones genómicas cercanas (Lodrini, Oehme et al. 2013). En otro trabajo, se encuentran 19 sitios putativos de unión para el factor de transcripción FOXP3 en la región promotora de hsa-miR-183 (Liu and Chang 2012). Recientemente, se ha descrito que la glicógeno sintasa kinasa 3 beta (GSK3 β), vinculada a la via β -catenina/TCF/LEF-1 inhibe la expresión de miR-183, miR-96 y miR-182 a través de esta vía y que esta kinasa esta subexpresada en el cáncer gástrico humano (Tang, Zheng et al. 2013).

Trabajos de análisis de perfiles de expresión de miRs encuentran una desregulación del cluster mir-183, y destacan su potencial uso como **biomarcador** (Zhu, Liu et al. 2011). Así, se ha descrito a hsa-miR-96 como potencial
biomarcador junto con miR-183 en orina en carcinoma urotelial, observando una correlación con el estadio y el grado patológico (Yamada, Enokida et al. 2011), miR-183 en carcinoma hepatocelular (Liu, Yao et al. 2012). También, se ha reportado la sobre-expresión de hsa-miR-182 en cáncer de vejiga y su rol potencial como biomarcador en orina así como su reciente asociación con la progresión del cáncer de próstata (Hanke, Hoefig et al. 2010, Hirata, Ueno et al. 2013). Se ha visto también una sobre-expresión de hsa-miR-96 en carcinoma hepatocelular, en cáncer de mama, endometrio, pulmón, colon, ovario, testículo y linfoma y una correlación positiva con el score de Gleason y relapso bioquímico en PCa (Ladeiro, Couchy et al. 2008, Wang, Mao et al. 2008, Guttilla and White 2009, Sarver, French et al. 2009, Myatt, Wang et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010). En meduloblastoma el clúster promueve metástasis e invasión (Weeraratne, Amani et al. 2012).

Esto sugiere que los miembros del clúster miR-183 pueden actuar como **oncomirs o supresores de tumor**. Específicamente, en la **próstata**, existen múltiples análisis donde se asocia la desregulación de hsa-miR-183 con PCa. De los estudios más exhaustivos realizados para la identificación de perfiles de expresión de miRs en próstata se encuentran los realizados por Schaefer, donde se realizan análisis de microarreglos y RT-qPCR en más de 24 muestras pareadas, tumor vs normal de tejido de pacientes con PCa, para analizar asociaciones entre la expresión de miRs y datos clinicopatológicos, y evaluar el potencial de los miRs como marcadores diagnósticos o pronósticos en el PCa. Schaefer identifica por primera vez al clúster hsa-miR-183 como sobre-expresado en PCa, mientras que contradictoriamente, estudios de Yin del 2010 reportan la sub-expresión de hsa-miR-183 en muestras fijadas en parafina de pacientes con PCa relativo a muestras con HPB (Schaefer, Jung et al. 2010, Yin, Li et al. 2010, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Tsuchiyama, Ito et al. 2013, Zhang, Sun et al. 2013).

Hasta el momento se han reportado varios estudios donde se **asocia hsa-miR-183 con el desarrollo de neoplasias**, presentando funciones **oncogénicas** en cáncer de mama en hombres, endometrio, pulmón, ovario, tiroides, testículo y linfoma, cáncer colorectal, próstata, carcinoma hepatocelular y en líneas celulares de sarcoma sinovial (Bandres, Cubedo et al. 2006, Motoyama, Inoue et al. 2009, Sarver, French et al. 2009, Lehmann 2010, Myatt, Wang et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Abraham, Jackson et al. 2011)..

Sin embargo, también se han descrito funciones **supresoras de tumores de hsa-miR-183** en cáncer de pulmón y mama, donde se ha descrito la inhibición de la migración e invasión celular vía la represión de la proteína Ezrina, cáncer de ovario, endometriosis, células madre de mama, osteosarcoma y carcinoma de células basales (Dahiya, Sherman-Baust et al. 2008, Wang, Mao et al. 2008, Shimono, Zabala et al. 2009, Lowery, Miller et al. 2010, Heffelfinger, Ouyang et al. 2012, Zhu, Feng et al. 2012, Shi, Gu et al. 2014).

Blancos validados del clúster hsa-miR-183

Hasta el momento se han comunicado varios genes blancos directos (Tabla 1) de hsa-miR-183 en cáncer de endometrio, mama y colon, como los genes supresores de tumor FOXO1 y EGR1, que regulan genes involucrados en la apoptosis, el ciclo celular y en la diferenciación celular respectivamente (Guttilla and White 2009, Li, Luna et al. 2010, Myatt, Wang et al. 2010). Los estudios de Myatt muestran un incremento de los tres miembros del

clúster de miR-183 en cáncer de endometrio en comparación a las muestras normales, y una pérdida del supresor de tumores FOXO1 correlacionada con dicho aumento, mientras que en Guttilla et al. se reporta la interacción directa de hsa-miR-96 y hsa-miR-182 y FOXO1 en cáncer de mama (Guttilla and White 2009, Myatt, Wang et al. 2010). Así mismo se ha demostrado la regulación de PDCD4 en carcinoma hepático vía miR-183 (Li, Fu et al. 2010). Por otro lado, se han publicado genes blancos con roles oncogénicos en cáncer de pulmón, como es el caso de Ezrina, reconocida como linker entre el citoesqueleto de actina y la membrana plasmática e involucrada en el mantenimiento de la morfología celular, adhesión y movimiento celular (Wang, Mao et al. 2008). En estos estudios se muestra la disminución de hsa-miR-183 de 2 a 3 veces en células con cáncer de pulmón metastásico con respecto a las células normales, por lo que sugiere un rol supresor de tumores, actuando por la vía la inhibición de Ezrina. Trabajos posteriores confirman la regulación directa de Ezrina por mir-183 en cáncer de mama y líneas celulares de osteosarcoma (Lowery, Miller et al. 2010, Zhu, Feng et al. 2012). Más recientemente se identificó a isocitrato deshidrogenasa (IDH2) como blanco directo de hsa-miR-183 en células de glioma (Tanaka, Sasayama et al. 2013). También se han reportado sitios blancos en las regiones codificantes de los genes modulados, tal es el caso del oncogén β -TrCP1, donde se reporta la interacción de hsa-miR-183 con la región codificante de β TrCP1 desestabilizándola y degradándola vía el complejo RISC (Elcheva, Goswami et al. 2009). La regulación de BMI-1 por hsa-miR-183, podría contribuir potencialmente en la inducción de la muerte celular, reducción de la formación de colonias e inhibición del crecimiento tumoral en líneas celulares de cáncer de páncreas (Wellner, Schubert et al. 2009).

Otros trabajos, realizaron análisis de ontología de los genes blancos de hsa-miR-183 y revelaron el enriquecimiento de genes involucrados en la polimerización de la actina y proyecciones celulares (Wang, Mao et al. 2008, Heffelfinger, Ouyang et al. 2012); genes cuya expresión aumentada produce un incremento en la movilidad celular e invasividad. En este sentido, algunos estudios involucran a hsa-miR-183 con procesos celulares como el desarrollo y la función de órganos ciliados neurosensoriales, presentando blancos vinculados a procesos de adhesión, migración, crecimiento y diferenciación celular, como el caso de la integrina β 1 (ITGB1) y kinesina 2 α (Xu, Witmer et al. 2007, Li, Luna et al. 2010).

Un trabajo realizado en cáncer de ovario, encuentra que miR-183 regula negativamente a la proteína TIAM1 (Li, Liang et al. 2012). TIAM1 presenta tanto funciones de supresor como de oncogén, según varios estudios. En cáncer de colon, su disminución retrasa el crecimiento celular pero potencia la invasión celular (Xu, Rajagopal et al. 2010). Esto podría ser atribuido en parte por el microambiente celular específico y el contexto oncogénico, sugiriendo un rol biológico más complejo de regulación. Por otro lado, Wang et al. reporta la sub-expresión de hsa-miR-183 en retinoblastoma mediante la unión al ya reportado blanco en tejido adiposo, la proteína LRP6 (Wang, Wang et al. 2014).

rabla 1.	Función y	genes blancos	validados c	de hsa-miR-18	3 en diferentes	tipos de tu	imores y procesos	s celulares.
----------	-----------	---------------	-------------	---------------	-----------------	-------------	-------------------	--------------

miR/miRs	Tumor/Procesos celulares	Función del miR	Gen/es regulado/s	Vías/procesos afectados	Cita
Hsa-miR-183	Colorectal	Oncomir	CHES1, FOXF2, FOXK2, FOXO1A, FOXO3A, FOXQ1	Apoptosis	(<u>Bandres, Cubedo et al. 2006</u>)
Hsa-miR-183	Pulmón/ Mama/ Osteosarcoma	Supresor de tumor	Ezrina	Metastasis/ Migración/ Metastasis	(<u>Wang, Mao et al. 2008, Lowery, Miller et</u> al. 2010, <u>Zhu, Feng et al. 2012</u>)
Hsa-miR-183	Colorectal	Supresor de tumor	βΤrCP1	Apoptosis	(<u>Elcheva, Goswami et al. 2009</u>)
Hsa-miR-183	Pancreas	Supresor de tumor	BMI-1	EMT	(<u>Wellner, Schubert et al. 2009</u>)
Hsa-miR-183	Higado	Oncomir	PDCD4	Apoptosis	(<u>Li, Fu et al. 2010)</u>
miRs-183-96-182	Mama/ Endometrio/	Oncomirs	FOXO1	Proliferacion/ Apoptosis/	(<u>Guttilla and White 2009</u> , <u>Myatt, Wang et</u> <u>al. 2010</u>)
Hsa-miR-183	Sarcoma sinovial	Oncomir	EGR1	Migración	(<u>Sar∨er, Li et al. 2010</u>)
Hsa-miR-183	Celulas HeLa	Supresor de tumor	ITGB1, KIF2A	Migración/ Invasion	(<u>Li, Luna et al. 2010</u>)
Hsa-miR-183	Ovario	Supresor de tumor	TIAM1	Migración/ Invasión/ Viabilidad	(<u>Li, Liang et al. 2012</u>)
miRs-183-96-182	Próstata	Oncomirs	hZIP1,hZIP3,hZIP7,hZIP9, hZnT1,hZnT7	Regulación Homeostasis Zn	(<u>Mihelich, Khramtsova et al. 2011</u>)
Hsa-miR-183	Glioma	Supresor de tumor	IDH2	Proliferacion	(<u>Tanaka, Sasayama et al. 2013</u>)
Has-miR-183	Próstata	Oncomir	Dkk-3, SMAD4	Crecimiento celular/Migración/Crecimiento tumoral	(<u>Ueno, Hirata et al. 2013</u>)
Has-miR-183	Retinoblastoma/ Adipogenesis	Supresor de tumor	LRP6	Crecimiento celular/Migración/Invasión	(<u>Chen, Xiang et al. 2014, Wang, Wang et al. 2014</u>).

En cáncer de próstata se han identificado algunos blancos de hsa-miR-183, por ejemplo se ha visto que el bajo consumo de zinc (Zn) en la dieta contribuye con la etiología del cáncer de próstata, incrementando el riesgo de afección. Ensayos con modelos de ratones TRAMP de PCa indicaron que una dieta suplementada con Zn reduce el tamaño del tumor y los indicadores en suero de PCa, sugiriendo efectos quimioprotectores del Zn. Por otro lado, en los trabajos de Mihelich et al. se reporta que la sobre-expresión del clúster miR-183 en PCa suprime cinco transportadores de Zn, disminuyendo así la incorporación de Zn por la célula, esto podría indicar una desregulación temprana del clúster, provocando de forma gradual la pérdida del Zn y permitiendo la progresión de la patología (Mihelich, Khramtsova et al. 2011). Del mismo modo los autores reportan una acción coordinada de los miembros del clúster: hsa-miR-183, hsa-miR-182 y hsa-miR-96 en la regulación de la homeostasis del Zn. Una vez más la acción en conjunto de miRs relacionados actúan de forma sinérgica en procesos celulares y de homeostasis.

Recientemente el grupo de Ueno reporto que la interacción directa de hsa-miR-183 con Dkk-3 y SMAD4, aumenta la tumorigenicidad en células tumorales prostáticas a través de la vía de señalización WNT/ β -catenina, y encuentran que la expresión de este miR esta correlacionado positivamente con los valores de APE, pT y negativamente con la sobrevida del paciente (Ueno, Hirata et al. 2013). Asimismo, muestran un efecto proproliferativo de mir-183 *in vitro* e *in vivo*.

En resúmen, la bibliografía no permite establecer de forma concluyente un rol oncogénico o supresor de tumores de hsa-miR-183 en muestras de PCa, existiendo estudios que apoyan ambas funciones.

ANTECEDENTES

En estudios preliminares realizados por Duhagon, se seleccionó un grupo de miRs específicos de próstata, y se comprobó su desregulación en muestras pareadas (de tejido normal y tumoral), identificándose dos miRs significativamente regulados en tejido tumoral: hsa-miR-886-3p y hsa-miR-183 de entre un grupo de 25 miRs preseleccionados en base a su potencial involucramiento en el mantenimiento de las células madres de cáncer de próstata. Hsa-miR-886-3p se encuentra regulado negativamente en tejido tumoral, y hsa-miR-183 regulado de forma positiva, actuando así como supresor de tumores y oncomir respectivamente (Duhagon, Hurt et al. 2010).

En este contexto, proponemos avanzar en el conocimiento funcional de hsa-miR-183, determinando su función e identificando posibles blancos de acción en PCa. Pensamos que alguno de los blancos reportados en otro tipo de neoplasias y vinculados a procesos celulares normales, podrían ser blancos de acción de hsa-miR-183 en PCa. Sin embargo, no descartamos la posibilidad de encontrar genes blanco únicos y específicos de tejido prostático.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Se propone estudiar el rol de hsa-miR-183-5p en el Adenocarcinoma prostático, partiendo de la hipótesis:

"Hsa-miR-183-5p actúa como un oncogen en PCa, y por lo tanto se encuentra sobre-expresado en tejido tumoral y contribuye en algún aspecto al fenotipo neoplásico"

Durante este trabajo se trabajará sobre tres aspectos del miR, el nivel de expresión, las propiedades que regula y los genes blancos de acción. Para ello nos formulamos tres preguntas:

- 1. ¿La expresión de hsa-miR-183-5p está significativamente aumentada en PCa?
- 2. ¿Qué propiedades del fenotipo tumor de próstata son reguladas por hsa-miR-183-5p?
- 3. ¿Cuáles son los genes blancos de la regulación de hsa-miR-183-5p?

OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS

General

Determinar la función de hsa-miR-183-5p en el origen y/o progresión del cáncer de próstata (PCa).

Específicos

Determinar niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en tejido prostático tumoral y normal y en líneas tumorales y normales de PCa.

Determinar la implicancia funcional de hsa-miR-183-5p en el fenotipo tumoral.

Determinar los mecanismos moleculares en los que interviene hsa-mir-183-5p.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Medios de cultivo

1. 1. Medio de cultivo comercial: Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) de Invitrogen (Gibco)

El medio RPMI-1640 (10,3g/L), fue suplementado con 2,0g/L de Bicarbonato de Sodio, 0,3g/L de L-Glutamina, 10% de Suero Fetal Bovino (F.B.S.) descomplementado*, 1% Penicilina y Estreptomicina (100U/mL y 100ug/mL respectivamente).

1. 2. Medio de cultivo comercial: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), de Invitrogen (Gibco)

El medio DMEM (13,5g/L), fue suplementado con 3,7g/L de Bicarbonato de Sodio, 10% de Suero Fetal Bovino (F.B.S.) descomplementado*, 100μL/L de AnfotericinaB (10mg/mL), 10mL de Penicilina/Streptomicina (10.000 U/mL).

*Descomplementación del Suero Fetal Bovino para la inactivación de las proteínas del complemento del suero: se incuba el suero fetal bovino descongelado a 37°C a 56°C durante 45 minutos. Se realizan alícuotas de 50mL y se almacena a -20°C.

2. Líneas celulares

Las características más relevantes de las líneas celulares cultivadas (LNCaP clone FGC, DU145 y HEK293) y un grupo de líneas celulares derivadas de próstata humana que fueron utilizadas para la cuantificación de hsa-miR-183-5p a partir de cDNA previamente preparado (RWPE-1, RWPE-2, WPE-stem, WPE-int, PC-3, MDA PCa 2b y 22Rv1) se describen en la Tabla 2 del Anexo.

3. Muestras de pacientes

Se analizaron siete muestras de tejido prostático fijado en parafina procedentes de prostatectomías radicales. Para cada muestra se selecciono tejido normal y tumoral (muestras pareadas) (Tabla 2).

Tabla 2: Muestras de pacientes.Las muestras 327, 2088 y 3733 fueron obtenidas en el Departamento de Patología de la Universidad de Ulsan, Colegio de Medicina, AsanMedical Center, Seoul, República de Korea. Las muestras 2336, 2431, 3547 y 3765 fueron obtenidas del Departamento de Anatomopatología del Hospital Policial, Montevideo, Uruguay. Se detallan las características de cada muestra (Tumoral, Control), valores del antígeno prostático especifico (APE) (ng/mL), para algunas de las muestras los valores de APE no fueron determinados (ND: no determinado) y los valores de score de Gleason.

lidemî lîtica Gildîn	Característica	APE (ng/mL)	Score de Gleason
327	CONTROL	ND	10 (5+5)
	TUMOR	-	
2088	CONTROL	ND	10 (5+5)
	TUMOR	-	
3733	CONTROL	ND	10 (5+5)
	TUMOR	-	
2336	CONTROL	4,18	6 (3+3)
	TUMOR	-	
2431	CONTROL	5,23	7 (3+4)
	TUMOR	-	
3547	CONTROL	5,56	6 (3+3)
	TUMOR	-	
3765	CONTROL	7,51	8 (3+5)
	TUMOR	-	

4. Vectores

Se utilizaron dos tipos de vectores reporteros de origen comercial, diseñados para el clonado de sitios blancos de hsa-mir-183-5p en la region 3' UTR del gen reportero.

4.1. Vector psiCHECK[™]-2 (Promega)

El vector **psiCHECK™-2 se** utiliza generalmente en experimentos de ARN de interferencia. Presenta un alto número de copias. Este vector permite el monitoreo de los cambios de expresión de un gen blanco fusionado a un gen reportero. El gen de la luciferasa *Renilla* es utilizado como gen reportero primario, y el gen de interés puede ser clonado en el sitio de múltiple clonado (SMC), localizado río debajo del codón de terminación traduccional de *Renilla*. El inicio del proceso de Interferencia resulta en el clivaje y subsiguiente degradación del ARNm de fusión. La medida de la disminución de la actividad luciferasa de *Renilla* es un indicador del efecto de interferencia.



Figura 12. A. Esquema del Vector psiCHECK[™]-2. Tomado del Technical Bulletin de Promega (<u>www.promega.com</u>). Se detallan: potenciador temprano SV40/promotor (7-425); intron quimerico (489-621); promotor de la ARNpolimerasa T7 (666-684); gen luciferasa *Renilla* (*hRluc*) (694-1629); sitio de múltiple clonado (1636-1680); poli (A) sintetica (1688-1736); promotor HSV-TK (1744-2496); gen luciferasa firefly (*hluc+*) (2532-4184); señal poli (A) tardia SV40 (4219-4440); región codificante para β-lactamasa (Amp^R) (4587-5447).**B.** Mecanismo de acción del Vector psiCHECK[™]-2; el gen de interés es clonado en el sitio de múltiple clonado localizado en 3' del gen luciferasa *Renilla* y su codón de terminación traduccional. Luego del clonado, el vector es transfectado en la línea celular de elección y el gen de fusión *Renilla* y el gen de interés es transcripto. Se pueden cotransfectar de forma simultánea o secuencial vectores que expresan shARN o siARN. El shARN o siARN pueden unirse ARNm blanco e iniciar un proceso de silenciamiento. El ARNm fusión: *Renilla* luciferasa/gen de interés será clivado y degradado, disminuyendo la señal *Renilla* luciferasa. Tomada del Technical Bulletin de Promega (www.promega.com).

4.2. Vector pmirGLO (Promega)

El vector **pmirGLO** esta designado para cuantificar la actividad del microARN mediante la inserción de sitios blancos del microARN en estudio en el extremo 3´UTR del gen luciferasa *firefly* (*luc2*). Luciferasa firefly es el gen reportero primario, la expresión reducida de luciferasa firefly indica que el microARN endógeno o exógeno se ha unido a la secuencia blanco del microARN clonada en el vector. Este vector esta basado en la tecnología de los vectores dual-luciferasa de Promega, luciferasa *firefly* (*luc2*) es usado como reportero para monitorear la regulación de ARNm y luciferasa *Renilla* (*hRluc-neo*) actúa como control reportero para la normalización y selección.



Figura 13. A. Esquema del Vector pmirGLO. Tomado de Promega (<u>www.promega.com</u>/vectors/). Se detallan: señal poli (A) tardía SV40 (106-327); potenciador temprano SV40/promotor (426-844); región codificadora de la proteína de fusión *hRluc-neo* (889-2664); poli (A) sintética (2728-2776); región codificante para β-lactamasa (Amp^R) (3037-3897); origen de replicación derivado de plásmido Co/E1 (4052-4088); promotor fosfoglicerato

kinasa de humano (5094-5609); gen reportero *luc2* (5645-7297); sitio de múltiple clonado (7306-7350). Se destaca en el panel inferior la secuencia del sitio de múltiple clonado (MCS) del vector ubicada en la region 3`UTR de gen reportero *luc2*. **B.** Mecanismo de acción del Vector pmirGLO; el gen de interés es clonado en el sitio de múltiple clonado localizado en 3' del gen *luc2*. Luego del clonado, el vector es transfectado en la línea celular de elección y el gen de fusión *luc2* y el gen de interés es transcripto. En presencia del microARN en estudio, el microARN se une a la secuencia blanco. Esta unión desestabiliza al ARNm y bloquea la traducción. No hay de señal de *luc2*. Modificado de Promega (www.promega.com/vectors/).

5. Oligonucleótidos

Se obtuvieron los siguientes oligonucleótidos para cuatro aplicaciones diferentes:

5.1. Para ensayos de Transfección

Se adquirieron los oligonucleótidos que se listan en la **Tabla 3** para la sobre-expresión e inhibición de hsa-miR-183-5p. Los mismos pertenecen al sistema ofrecido por la companía Qiagen para el análisis funcional de miRs conocido como miScript, cuyo mecanismo se describe en la **Figura 14**.

Tabla 3: Se describen brevemente las características (síntesis, modificaciones, simple/doble hebra, pureza) de cada una de las moléculas utilizadas durante la transfección y cotransfección; miScript miRNA Mimic (mimic miR-183-5p), miScript miRNA Inhibitor (inhibitor miR-183-5p) y AllStars Negative Control siRNA (siRNA) sintetizadas por la empresa Qiagen.

Nombre	Descripción	Pureza (%)
Syn-hsa-miR-183-5p	La secuencia deriva de la secuencia madura de hsa-miR-183-5p actualizada de la	>90
miScript miRNA Mimic	base de datos miRBase (http://microrna.sanger.ac.uk/). Secuencia de miRNA	
	maduro (hebra líder): 5'UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU3'. Químicamente	
	sintetizado. ARN doble cadena que mimetiza al hsa-miR-183-5p. No presenta	
	modificaciones.	
Anti-hsa-miR-183-5p	Secuencia simple hebra. Deriva de la secuencia madura de hsa-miR-183-5p	>90
miScript miRNA	actualizada de la base de datos miRBase (http://microrna.sanger.ac.uk/).	
<u>Inhibitor</u>	Modificaciones: Standard (2'O Me)	
AllStars Negative	Molécula doble hebra, sin modificaciones. No presenta homología con genes	>90
Control siRNA miScript	humanos. Control negativo experimental.	
<u>siRNA</u>		



Figura 14. Esquema donde se representa el mecanismo de acción de miScript miRNA Mimic (el mimic se une al sitio blanco en 3'UTR del gen modulado y provoca el silenciamiento de la expresión y bloqueo de la traducción), miScript miRNA Inhibidor (el inhibidor se une a los miRNA y/o mimic e inhibe su función, produciendo un aumento en la expresión de la proteína blanco) y AllStars Negative Control (donde el siRNA no modula la expresión del gen blanco por lo que la expresión de la proteína es igual a las muestras sin transfectar). Modificado de Qiagen (http://www.sabiosciences.com/manuals).

5.2. Para cuantificación por PCR

Se solicitó la síntesis comercial de oligonucleótidos complementarios a regiones específicas de la secuencia codificante de varios genes blanco candidatos, determinados a partir de estudios *in silico* y estudios de microarreglos. Los oligonucleótidos fueron diseñaron con el sistema de Universal ProbeLibrary de Roche (www.roche-applied-science.com) a partir del Probe Finder versión 2.49 for Human, tomando en cuenta la variante de splicing más representativa en cada tejido (GeneBank) y teniendo en cuenta el intron spanning assay (límite intron-exon).

Tabla 4: Oligonucleótidos utilizados para la amplificacion y cuantificación de los genes: *foxo1, itgb1, synpo1, tpm1, bnc2, pdcd4, fndc3b* e *irs1*, utilizando a *gadph* y *actb* como genes normalizadores. Se especifican: el largo, la posición, la Tm, % GC, la secuencia y el tamaño del amplicón, y el largo del intron excluido en cada caso. Todos los oligonucleótidos fueron sintetizados por la empresa Macrogen Inc. de Korea.

GEN BLANCO	PRIMER	LARGO	POSICION	Tm	GC	SECUENCIA	AMPLICON	INTRON INTERNO
		(nt)	(nt)	(°C)	(%)		(nt)	(nt)
ENST00000229239.5 ENSG00000111640.8	FORWARD	22	552-573	60	45	ccccggtttctataaattgagc	127	240
GAPDH-001glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	REVERSE	19	660-678	60	58	caccttccccatggtgtct	1	
AMPLICON	Ccccggtttctataaatt	gagcccgc	ageeteecgetteg	ctctctgct	cctcctgttcg	acagtcagccgcatcttcttttgcgtcgccagcq	gagecacategetea	gacaccatggggaaggtg
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_001101.3 Homo sapiens actin,	FORWARD	18	425-442	60	56	ccaaccgcgagaagatga	97	438
beta (ACTB), mRNA	REVERSE	20	502-521	59	60	ccagaggcgtacagggatag		
AMPLICON	ccaaccgcgagaagat	gacccagat	catgtttgagacc	ttcaacaco	ccagccatgt	acgttgctatccaggctgtgctatccctgtacgcc	tctgg	
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_017637.5 Homo sapiens	FORWARD	20	115-134	59	50	ctgcacttgacaaccagcat	93	132158
basonuclin 2 (BNC2), Mrna	REVERSE	23	185-207	60	48	cactaagcctgtcctctgatttg	1	
AMPLICON	Ctgcacttgacaaccag	catgccga	atggcacacctts	ggcccaco	ccacctccac	atagccttaattacaaatcagaggacaggctta	ztg	
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_014456.4 Homo sapiens programmed cell death 4 (neoplastic	FORWARD	24	1207-1230	60	42	tggaaagcgtaaagatagtgtgtg	91	3415
transformation inhibitor) (PDCD4), transcript variant 1, mRNA	REVERSE	24	1274-1297	59	38	ttettteageageatateaatete	1	
AMPLICON	tggaaagcgtaaagata	agtgtgtggg	ggctctggaggtg	ggcagcaa	tctgtcaatca	ccttgttaaagagattgatatgctgctgaaagaa	atatt	
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_002015.3 Homo sapiens	FORWARD	20	983-1002	60	55	aagggtgacagcaacagctc	86	104720
forkhead box O1 (FOXO1), mRNA	REVERSE	21	1048-1068	59	43	ttctgcacacgaatgaacttg		
AMPLICON	aagggtgacagcaaca	gctcggcgg	gctggaagaatte	caattogto	ataatctgtcc	ctacacagcaagttcattcgtgtgcagaa		
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_002211.3 Homo sapiens integrin, (ITGB1), transcript variant	FORWARD	18	977-994	59	50	cgatgccatcatgcaagt	71	2130
1A, mRNA	REVERSE	19	1029-1047	59	58	acaccagcagccgtgtaac	1	
AMPLICON	cgatgccatcatgcaag	ttgcagtttg	tggatcactgattg	ggctggag	gaatgttacac	ggctgctggtgt		
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_001018008.1 Homo sapiens tropomyosin 1 (alpha) (TPM1),	FORWARD	20	252-271	59	60	agaggaagctgagggagacc	86	-
transcript variant 6, mRNA	REVERSE	19	319-337	60	58	ggcacgatccaactcttcc	1	
AMPLICON	agaggaagctgaggga	gaccgctga	agccgacgtagd	ttctctgaa	cagacgcatco	agctggttgaggaagagttggatcgtgcc		
ENSAYO	SYBR Green qPCR						_	
NM_001128933.1 Homo sapiens synaptopodin 2 (SYNPO2),	FORWARD	20	1230-1249	59	55	acagcagacctcacaagcac	74	2405
transcript variant 2, mRNA	RE∨ERSE	23	1281-1303	59	39	cacttgtttttctgacaggcttt]	
AMPLICON	acagcagacctcacaag	caccgago	gcggcatgcacgg	ctcaggag	gagtgaaago	ctgtcagaaaaacaagtg		
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_005544.2 Homo sapiens insulin receptor substrate 1 (IRS1),	FORWARD	20	3737 - 3756	60	45	tatgccagcatcagtttcca	93	58735
mRNA	RE∨ERSE	23	3807 - 3829	59	39	tttgctgaggtcatttaggtctt	1	
AMPLICON	Tatgccagcatcagtttc	cagaagca	gccagaggaccg	tcagtagct	caactggaca	tcacagcagaatgaagacctaaatgacctcago	aaa	·
ENSAYO	SYBR Green qPCR							
NM_001135095.1 Homo sapiens fibronectin type III domain	FORWARD	20	2036 - 2055	59	55	gagcatgctgcatcagtacc	61	1776
containing 3B (FNDC3B), transcript variant 2, mRNA	REVERSE	20	2077-2096	59	55	gtgcgaacagggagactttc		
AMPLICON	Gagcatgctgcatcagt	accggcgg	acacagccagtgt	tctgaaagt	ctccctgttcg	cac		
ENSAYO	SYBR Green qPCR							

5.3. Para clonado de regiones blanco de hsa-miR-183-5p en el sitio MCS del vector pmirGLO

Los oligonucleótidos con las secuencias blanco predictiva de hsa-miR-183-5p para dos genes candidatos a partir de los estudios de microarreglos (*fndc3b* e *irs1*), fueron diseñados por la empresa Exxtend de Brasil. Se incluyeron oligonucleótidos con las secuencias blanco mutadas (mut) (secuencia reverse a la secuencia blanco (wt)).

Tabla 5: Oligonucleótidos sintetizados para clonación de los sitios blancos de hsa-miR-183 -5p en pmirGLO (Empresa Exxtend, Brasil). El texto en verde y rojo indica la secuencia del sitio de restricción para Xhol y Xbal respectivamente, utilizados para clonar en el sitio de múltiple clonado del vector pmirGLO. Se subraya el sitio interno para Notl, en negrita se resalta la secuencia blanco de hsa-miR-183-5p y en itálica el sitio blanco. Se detalla también el primer utilizado para la confirmación del clonado de la región 3'UTR de los blancos *fndc3b* y de *irs1* en el vector pmirGLO (Empresa Macrogen Inc., Korea).

Nombre	Secuencia 5'3'
FNDC3B WT SENSE	TCGAGTA <u>GCGGCCGC</u> TAGTACATTGTATTAAAAC <i>TGCCATAT</i> T
FNDC3B WT ANTISENSE	CTAGAATATGGCAGTTTTAATACAATGTACTAGCGGCCGCTAC
FNDC3B MUT SENSE	TCGAGTA <u>GCGGCCGC</u> TAGTACATTGTATTAAAACACGGTATTT
FNDC3B MUT ANTISENSE	CTAGAAATACCGTGTTTTAATACAATGTACTAGCGGCCGCTAC
IRS1 WT SENSE	TCGAGTA <u>GCGGCCGC</u> TAGTAATATAAGAATCATA <i>GTGCCATA</i> T
IRS1 WT ANTISENSE	CTAGA <i>TATGGCAC</i> TATGATTCTTATATTACTA <u>GCGGCCGC</u> TAC
IRS1 MUT SENSE	TCGAGTA <u>GCGGCCGC</u> TAGTAATATAAGAATCATA <i>CACGGTAT</i> T
IRS1 MUT ANTISENSE	CTAGAATACCGTGTATGATTCTTATATTACTAGCGGCCGCTAC
Oligo de secuenciado (pmirGLO)	AAGTTGGACGCCCGCAAGAT

5.4. Para secuenciación

El primer de secuenciación fue 5' CATCAAGAGCTTCGTGGAGCG 3' diseñado por la empresa Macrogen Inc. con complementariedad con el gen de *renilla*.

MÉTODOS

1. Cuantificación de ácidos nucleicos

Se midió la densidad óptica del ADN y ARN extraídos, a 260nm en nanodrop (Asp-3700) y se calculó la concentración asumiendo que 1 Unidad de Absorbancia corresponden a 50µg/mL de ADN doble hebra y 40µg/mL de ARN simple hebra.

2. Extracción de ARN

2.1.de tejido parafinado: mediante el Kit RNeasy FFPE

A partir de un corte de 10µm de espesor de muestras tumorales y normales parafinadas, se realizó la extracción de ARN mediante el *Kit RNeasy FFPE* de Qiagen, con las siguientes modificaciones: se realizaron dos lavados con Xylene y dos con etanol 100X y se utilizaron los volúmenes mayores recomendados por el Kit en cada paso de

extracción. El ARN extraído se resuspendió en 15μ L de H₂O RNAsa free, se cuantificó en nanodrop (Asp-3700) y se congeló a -20°C para su posterior análisis.

2.2. de cultivos celulares: mediante TRIzol

Se usó el reactivo TRIzol Reagent (Ambion, Life Technologies) para aislar el ARN total siguiendo las instrucciones del comerciante, método mejorado a partir del desarrollado por Chomczynski y Sacchi de 1987. El reactivo TRIzol combina fenol e isotiocianato de guanidina en una sola fase para facilitar la inmediata inhibición de la actividad ARNasa a la vez que provoca la lisis celular.

Luego de homogenizar la muestra con TRIzol (0,75mL de TRIzol cada 5-10.10⁶ células), se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó cloroformo (0,2mL cada 1mL de TRIzol), homogenizó vigorosamente y centrifugó a 12000g por 15 minutos a 4°C. Una vez obtenidas las tres fases: fase orgánica, conteniendo las proteínas; interfase, presente el ADN y la fase acuosa donde está presente el ARN, se separó ésta última y se le adicionó isopropanol 100% (0,5mL de isopropanol 100% cada 1mL de TRIzol utilizado) para la precipitación del ARN. Se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y se lavó el pellet con etanol 75% (1mL de etanol 75% cada 1mL de TRIzol utilizado). Finalmente se centrifugó a 7500g por 5 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante nuevamente y resuspendió el pellet en H₂O libre de ARNasas.

Determinación de los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en tejido prostático tumoral y normal y en líneas tumorales y normales de PCa- Selección de muestras tumoral y normal de prostatectomías radicales de pacientes con PCa: muestras de archivo.

A efectos de extender el estudio a un número de muestras representativo que permita obtener niveles aceptables de significación, se determinaron los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en 7 muestras pareadas de tejido normal y tumoral fijadas en parafina provenientes de prostatectomías radicales, procedentes del Servicio de Anatomopatología del Hospital Policial y del Departamento de Patología de la Universidad de Ulsan, Colegio de Medicina, AsanMedical Center, Seoul, República de Korea. El criterio histopatológico para la selección de la muestra consistió en la presencia de regiones normales y tumorales claramente discernibles por criterios diagnósticos habituales, que no presenten zonas de composición tisular heterogénea (hiperplasia, parénquima, vascularización). Las muestras fueron analizadas por dos patólogos en forma independiente del Servicio del Hospital Policial. Se utilizaron los mismos criterios para la obtención de ARN de muestras pareadas obtenidas de Korea.

Una vez seleccionados los tacos y las zonas a estudiar, se realizaron cortes de 10 µm de espesor de los bloques de parafina en las regiones normal y neoplásica de cada muestra de prostatectomía, evitando la exposición a

ARNasas. A partir de estos cortes se realizó la extracción de ARN, el estudio molecular y la posterior tinción y reevaluación histopatológica de un corte contiguo.

3. Retrotranscripción de pequeños ARNs

miScript Reverse Transcription Kit de Qiagen

Se realizó la síntesis del ADN complementario (ADNc) utilizando *miScript Reverse Transcription Kit* de Qiagen. A 1µg del ARN obtenido se adicionaron 4µL de miScript RT Buffer 5X (Mg²⁺, dNTPs, oligonucleótidos-dt, y random primers), y 1µL de Transcriptasa Reversa miScript mix (poly(A) polimerasa y la transcriptasa reversa) en un volumen de 20µL. Se incubó a 37°C durante 60 minutos y luego se inactivó el enzima a 95°C durante 5 minutos. Se almacenó el ADNc a -20°C hasta su uso.

El principio del Kit miScript es la poliadenilación de miARNs y ARN no codificantes por una poly(A) polimerasa y subsecuente formación de ADNc por la transcriptasa reversa utilizando oligo-dT y random primers (Figura 15). El primer de Oligo-dT presenta una secuencia en 5' denominada universal tag. La universal tag permite la amplificación posterior por PCR.



Figura 15: Esquema del proceso de síntesis de ADNc mediante el Kit miScript Reverse Transcription de Qiagen. La cola poly(A) polimerasa adiciona un trecho de A en 3' de miARNs y ARN no codificantes. La transcripción reversa se lleva a cabo con OligodT que presentan un tag universal, molde para la siguiente reacción de qPCR. Tomado del protocolo de Qiagen, miScript [™] miRNA PCR Array Handbook (http://www.sabiosciences.com/manuals).

4. Cuantificación por qPCR de pequeños ARNs

Se realizó una dilución 1/10 del ADNc obtenido en el paso retrotranscripción en H_2O ARNasa free y se determinaron los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p mediante la técnica qPCR utilizando el sistema de *miScript Primer Assay* de Qiagen específico de miARN y el Kit de PCR de miScript SYBR Green de Qiagen.

La reacción de amplificación se realizó utilizando los dos siguientes oligonucleótidos: *Universal Primer* de *miScript*, provisto por el Kit de PCR *miScript* SYBR Green, complementario a la secuencia universal tag del oligo-dT y el *miScript Primer Assay* que es específico para el pequeño ARN en estudio.A 5µL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR

Master Mix (concentración final de MgCl₂ 2.5mM), 1 μ L de 10x miScript Universal Primer, 1 μ L de 10x miScript Primer Assay y 1 μ L de una dilución 1/10 del ADNc sintetizado en un volumen de 10 μ L de reacción.

El protocolo de la qPCR consistió en un paso de activación de la HotStarTaq polimerasa a 95°C durante 15 minutos y 40 ciclos de 15s a 94°C; 30s a 55°C y 30s a 70°C.

Se utilizaron dos genes de ARN pequeños como genes normalizadores de la reacción: scarna17 y rnU6 cuyos cebadores para amplificación fueron tambien adquiridos de Qiagen. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador RotorGene 6000 (Corbett) del Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE). Los datos fueron obtenidos y procesados primeramente con el programa asociado (RotorGene 6000 software) seleccionando un umbral para la determinación del ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*) con variaciones acordes a cada corrida. Se realizaron curvas de disociación por temperatura de los productos de amplificación de las muestras para verificar la presencia de un único amplicón, indicativo de la especificidad de la PCR, es decir, de la validez de la cuantificación. El rango analizado para la curva de disociación fue entre 60°C y 95°C, siendo la Tm esperada para miRNA entre 74°C y 77°C con este kit. Los datos fueron exportados al programa *Excel* (Microsoft) para ser graficados y analizados estadísticamente. Para la determinación de los valores relativos de ARN, los datos fueron análizados por el método de 2^{-ΔΔct} (Livak and Schmittgen 2001).

Comparación de los perfiles de expresión de hsa-miR-183-5p en líneas celulares de PCa dependientes e independientes de andrógenos y líneas celulares normales de próstata y líneas primarias de pacientes terminales con PCa.

Se compararon los perfiles de expresión de hsa-miR-183 en líneas celulares de PCa; sensibles (LNCaP), dependientes (MDA PCa 2b) e independientes de andrógenos (22Rv1, DU145, PC-3) y líneas celulares normales de próstata: RWPE1, RWPE-2, WPE-stem y WPE-int utilizando el Kit de PCR de miScript SYBR Green de Qiagen. Las características de las líneas se detallan en la Tabla 2 de Anexo.

Se realizó una dilución 1/10 del ADNc, obtenido previamente por la Dra. Duhagon, y se determinaron los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p mediante la técnica qPCR utilizando el miScript Primer Assay específico de miARN y el Kit de PCR de miScript SYBR Green de Qiagen.

La reacción de amplificación se realizó utilizando los dos siguientes oligonucleótidos: Primer Universal miScript, provisto por el Kit de PCR miScript SYBR Green, complementario a la secuencia universal tag del oligo-dT y el miScript Primer Assay, específico para el miR maduro en estudio, en este caso hsa-miR-183-5p.

Brevemente, a 5µL de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix 2X (concentración final de MgCl₂ 2.5mM), se adicionó 1µL de miScript Universal Primer 10X, 1µL de miScript Primer Assay 10X y 1µL de una dilución 1/10 del ADNc de las líneas celulares en un volumen final de reacción de 10µL. La reacción consistió en un paso de activación de la HotStarTaq polimerasa a 95°C durante 15 minutos y 40 ciclos de 15s a 94°C; 30s a 55°C y 30s a 70° en el equipo Rotor Gene 6000 del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Se analizó la

curva de melting de los amplicones producidos en la reacción para verificar su especificidad e identidad, entre 60°C y 95°C, siendo la Tm esperada para miR con este kit entre 74°C y 77°C.

Asimismo, se analizó el perfil de expresión de hsa-miR-183 de tres líneas primarias de pacientes terminales con PCa (PCSC1, PCSC2 y PCSC3) obtenidas previamente por la Dra. Duhagon, siguiendo el mismo protocolo de qPCR. En todos los casos se utilizaron los genes rnU6 y scarna17 como genes normalizadores.

5. Cultivos celulares

5.1. Propagación

La propagación de las líneas celulares de PCa, **LNCaP** y **DU145** fue realizada en medio RPMI 1640 completo. Previo a la adición de 10% de Suero Fetal Bovino (F.B.S.) descomplementado* y de los antibióticos Penicilina y Estreptomicina al medio RPMI 1640 se ajustó el pH a 6,9 ±0,3 con HCl 1N o NaOH 1N y se filtró con filtros millipore de 0,8 µm y 0,22 µm. El volumen preparado de medio RPMI 1640 completo, se almacenó a 4°C hasta su uso.

*Descomplementación del Suero Fetal Bovino para la inactivación de las proteínas del complemento del suero: se incubó el suero fetal bovino descongelado a 56°C durante 45 minutos. Se realizaron alícuotas de 50mL y se almacenó a -20°C.

La propagación de la línea **HEK 293T** se realizó en medio DMEM completo. Al medio DMEM (13,5g/L), suplementado con 3,7g/L de Bicarbonato de Sodio, 100µL/L de AnfotericinaB (10mg/mL), 10mL de Penicilina/Streptomicina (10.000 U/mL) fue filtrado con filtros millipore de 0,22µm, se adicionó Suero Bovino Fetal en una concentración final de 10%. La manipulación fue realizada en cámara de flujo laminar vertical (ESCO Laminar Flow Cabinet).

5.2. Subcultivos de la línea celular

El mantenimiento del cultivo se realizó semanalmente. Se observó y evaluó al microscopio el crecimiento y apariencia de las células en cultivo, realizando el cambio del medio en función de la densidad celular (2-3 días aproximadamente dependiendo del tipo de línea celular). El aumento en la densidad celular produce un cambio en la coloración del medio que contiene un indicador de pH colorimétrico, de rojo a amarillo, producido por el cambio de pH de 6,9 a 6,5.

Brevemente en cultivos confluentes (80% de confluencia), se removió el medio de cultivo. Rápidamente se lavó la monocapa de células con PBS 1X, para remover trazas de suero que contienen inhibidores de la tripsina y se adicionó una solución de Tripsina 0.25% (w/v) y EDTA 0.53 mM (para eliminar los cationes divalentes presentes en el medio y que median la interacción célula-sustrato) en un volumen final de 0,5mL – 1mL para frascos de 75cm³. Se incubó a 37°C durante 5 -15 min.

Se observó en microscopio invertido, luego del desprendimiento de las células por efecto de la tripsina, las células en suspensión se resuspendieron en medio RPMI 1640 completo para inactivar la tripsina y sobre todo el EDTA, ya que de lo contrario no se adherirán nuevamente las células al sembrarlas y se centrifugó a 700rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet celular de forma vigorosa en medio RPMI 1640 completo para deshacer acúmulos celulares, realizando finalmente el recuento celular en hemocitómetro. Para ello se utilizó el colorante vital azul de tripano (Trypan Blue), cuyo stock está a una concentración del 0,4% en tampón fisiológico PBS (1X). Se realizó una dilución 1:1 de azul tripan y suspensión celular homogénea. Se adicionó 10uL de la dilución en hemocitometro y se cuantificó en microscopio (XDS-1B).

Finalmente se inocularon frascos de 25cm² con una alícuota del volumen resuspendido, completando hasta 10mL con medio RPMI 1640 completo y se incubó en estufa (Heal Force Smart Cell) a 37°C, a una atmósfera de presión, 95% de humedad, 5% de CO₂.

5.3. Congelado de células

Una vez que la monocapa de células del cultivo alcanza un 80% de confluencia, se realiza el almacenamiento, mediante congelado de las células a -80°C o nitrógeno líquido. Brevemente, se removió el medio de cultivo, se tripsinizaron las células y se obtuvo una suspensión homogénea de células, como se indica en el apartado de (*5.2*). En crioviales de tapa rosca de 2mL, se adicionaron 1.5 mL de medio RPMI 1640 completo suplementado con dimetil-sulfóxido (DMSO) como agente criprotector (5-10% de concentración final), y una cocentración final de células en fase exponencial de crecimiento de 1-2.10⁶ células por criovial. Seguidamente, se colocaron los crioviales en un recipiente con alcohol isopropílico, que permite la disminución gradual y controlada de la temperatura (1°C/min) cuando se coloca a -80°C. Se mantuvieron a -80°C, o en su defecto se trasladaron a cámara de nitrógeno líquido a -179°C para una conservación mas prolongada.

5.4. Descongelado de células

Los crioviales que contenían células congeladas se incubaron a 37°C. Una vez descongeladas se trasvasaron a tubos estériles de 15mL que contenían medio RPMI 1640 completo previamente templado a 37°C. Se centrifugó a 700 rpm durante 5 minutos.

Se retiró el sobrenadante y resuspendio en medio RPMI 1640 completo. Se inocularon frascos de 25cm² con una alícuota del volumen resuspendido, completando hasta 10mL con medio RPMI 1640 completo y se incubaron a 37°C, a una atmósfera de presión, 95% de humedad y 5% de CO₂.

5.5. Recuento en cámara de Neubauer o hemocitómetro

Al observar al microscopio (XDS-1B) la cámara de Neubauer o hemocitómetro, se puede apreciar que esta presenta una cuadrícula conformada por 9 cuadrados grandes, cada uno subdividido en otros 16 cuadrados pequeños. El volumen sobre cada uno de estos 9 cuadrados grandes, es aproximadamente de 0.1 μL. Para realizar

el recuento celular, se utilizan los dos cuadrados grandes a cada lado de la cámara, de manera que se realizan cuatro determinaciones del número de células en el cuadrado grande, cuya media será el número de células en 0.1 µL de la suspensión de células en Azul de Tripano. Para reducir el error del recuento se deben contar tantos cuadrados como sean necesarios para acumular un mínimo de 100 células. Finalmente, teniendo en cuenta las diluciones realizadas, se calcula el número de células por mL presentes en la suspensión original.

6. Preparación de ADN plasmidico

6.1. Aislamiento de ADN plasmídico de papel

Se recortaron los papeles de filtro conteniendo el ADN plasmídico: vector psi-CHECK (Promega) con la secuencia 3'UTR de *ITGB1itgb1* (3'UTR y 3'UTR reverse) y *foxo1* (sitio 1: 204-492pb de la 3'UTR del FOXO 1, sitio complementario a hsa-miR-183 y oligonucleótidos que carecían del sitio endógeno de unión al microARN predicho). Estos vectores fueron donaciones del grupo de González del Departamento de Oftalmología de la Universidad de Duke, en Carolina del Norte y el grupo de Guttilla y White del Departamento de Biología Celular y Biología Molecular, Microbiológica y Estructural de la Universidad de Connecticut, como se mencionó en el apartado Materiales.

Los recortes fueron resuspendidos en TE pH8 (TrisHCl 10mM pH 7,4/EDTA 1mM pH8) y congelados a -20°C hasta su uso.

6.2. Preparación de células competentes y transformación de ADN plasmídico

Para la preparación de células químicamente competentes se usó el protocolo descrito por Ausubel. Brevemente, se inoculó 50mL de medio LB con una colonia única y se crecieron las células 12 horas a 37°C. Posteriormente, se inoculó 4mL del cultivo en 400mL de medio LB, dejándose crecer a 37°C hasta una densidad óptica a 600nm de 0.375 para después alicuotar el cultivo en 8 tubos de 50mL y dejarse enfriar las células en hielo durante 10 min. Luego de centrifugar el cultivo (rotor JA14, centrifuga Beckman) (1600g, 7 min.), se resuspendieron las bacterias en 10mL de solución de CaCl₂ y se dejaron en hielo 30 min. Finalmente, se volvió a centrifugar y a resuspender las bacterias en 2mL de solución de CaCl₂ frío con 15% glicerol. Las bacterias competentes fueron alicuotadas de a 100µL y guardadas a –80°C hasta su uso.

Para la transformación de bacterias competentes, 100µL de células a preservadas a -80°C y se dejaron descongelar en hielo 30 min. Se agregó el ADN plasmídico (1µL de plásmido resuspendido en TE), en una proporción menor a 25µL de ADN por 100µL de células (se procura usar menos de 0,1µg/100células). Se dejó 20min. en hielo y se dio un golpe de calor de 90 seg. a 42°C. A continuación se colocó en hielo 1-2 min. y se adicionó 4 volúmenes de LB a temperatura ambiente. Se dejó a 37°C durante una hora con agitación fuerte y se plaqueó en agar LB Ampicilina.

6.3. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias transformadas

Se utilizó el kit de Qiagen para purificación de plásmidos de alto número de copias (**QIAGEN® Plasmid Purification kit**), según el protocolo para midipreparaciones establecido por el comerciante.

Estos protocolos están basados en una modificación del procedimiento de lisis alcalina. El ADN plasmídico se une a una resina de intercambio anionico bajo condiciones apropiadas de pH y bajas concentraciones de sal. El ARN, proteínas y moléculas de bajo peso molecular son eliminadas en los sucesivos lavados alcalinos. El ADN plasmídico es eluido en un buffer con altas concentraciones de sal y luego concentrado y desalado mediante la precipitación con isopropanol. Las resinas de Qiagen operan mediante flujo de gravedad, reduciendo el tiempo de manipulación.

6.4. Purificación del ADN plasmídico con fenol: cloroformo

Al ADN plasmídico extraído en el paso anterior se incubó con 1µL RNAasa A (20mg/mL) durante 10min. Se adicionó 1x de fenol: cloroformo (1:1), centrifugó a 12000rpm 2 min. (140 µL fenol/cloroformo). A la fase superior se adicionó 1 vol cloroformo 1x, se centrifugó a 12000 rpm por 2min. y a la fase superior se adicionó AcNa 3M a una conc final 0,3M del volumen final. Se incubó con 0,7 vol de isopropanol durante 5min. a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500µL de etanol 70%. Se incubó durante 5 min. a temperatura ambiente y centrifugó a 12000 rpm por 5min. El pellet fue resuspendido en 30-50µL de TE pH8. Se midió la densidad óptica del ADN plasmídico purificado a 260nm y determinó la concentración asumiendo que 1 Unidad de Absorbancia corresponden a 50µg/mL de ADN doble hebra.

7. Inserción de ADN en plásmidos

7.1. Linearización del vector pmirGLO

Se digirieron 5µg del vector pmirGLO (362ng/µL) con 2µL de la enzima XhoI (10U/µL) de (Fermentas, Thermo Scientific) utilizando el Buffer R 1X (10mM Tris-HCl pH8.5 a 37°C, 10mM MgCl2, 100mM KCl y 0,1mg/mL BSA) en un volumen final de 30µL, durante 2horas y 30' a 37°C. La enzima se inactivó a 65 °C durante 20 minutos y se purificó el producto de la digestión utilizando el kit Ilustra –GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare). El volumen purificado se digirió nuevamente con la enzima XbaI (10U/µL) de (Fermentas, Thermo Scientific). Brevemente, a 40µL del producto de la digestión con XhoI se adicionaron: 5µL de Buffer Tango 1X (33mM Tris-acetato pH 7,9 a 37°C, 10mM Mg-acetato, 66mM K-acetato y 0,1mg/mL BSA) y 2µL de la enzima XbaI (10U/µL) en un volumen final de 50µL, durante 1 hora a 37°C. La reacción se inactivó a 65 °C durante 20 minutos y se purificó nuevamente con el kit Ilustra –GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare) y almacenó a - 20°C hasta su uso. Se cuantificó el vector pmirGLO digerido, en nanodrop (Thermo Scientific Biomate 3).

7.2. Hibridación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos sintetizados con el sitio de restricción para Xhol, Xbal, sitio interno para Notl, y secuencia blanco para hsa-miR-183-5p (Tabla 5) se resuspendieron en H₂O libre de nucleasas para lograr una concentración de 1µg/µL.

Los plásmidos generados presentan el sitio de digestión Xhol, el sitio interno Notl, la secuencia blanco para hsamiR-183-5p de FNDC3B y de IRS1 salvaje (WT) y el sitio de digestión Xbal. Los plásmidos que presentan la secuencia blanco mutada (MUT) presentan el cambio de la secuencia blanco por la secuencia reverso (Figura 16).

1. FNDC3B WT	xhai CTCGAGTAGCGGCCGCTAGTACATTGTATTAAAACTGCCATATTCTAGA GAGCTCATCGCCGGCGATCATGTAACATAATTTTGACGGTATAAGATCT
2. FNDC3B MUT	CTCGAGTAGCGGCCGCTAGTACATTGTATTAAAACACGGTATTTCTAGA GAGCTCATCGCCGGCGATCATGTAACATAATTTTGTGCCATAAAGATCT
3. IRS1 WT	CTCGAGTAGCGGCCGCTAGTAATATAAGAATCATAGTGCCATATCTAGA GAGCTCATCGCCGGCGATCATTATATTCTTAGTATCACGGTATAGATCT
4. IRS1 MUT	CTCGAGTAGCGGCCGCTAGTAATATAAGAATCATACACGGTATTCTAGA GAGCTCATCGCCGGCGATCATTATATTCTTAGTATGTGCCATAAGATCT

Figura 16: Esquema de los fragmentos de ADN doble cadena generados para clonar los sitios blanco predictivos de los genes candidatos FNDC3B e IRS1 en el vector reportero pmirGLO y estudiar el efecto directo de mir-183-5p sobre ellos.

Seguidamente, 2µL de los oligonucleótidos sentido (F) y antisentido (R) se incubaron con 46µL del Buffer de anilado de oligonucleótidos (Oligo Annealing Buffer), recomendado en el kit primeramente a 90°C durante 3 min. y luego a 37°C durante 15 min., en termobloque Digital Dry Bath Incubator (Boekel Scientific), almacenándose a - 20°C hasta su uso.

7.3. Ligación de oligonucleótidos anilados en el vector pmirGLO lineal

Previa ligación de los oligonucleótidos anilados en el vector pmirGLO lineal, se realizó una dilución 1:10 de los mismos en H₂O libre de nucleasas, obteniendo una concetración final de 4ng/µL por oligonucleótido en el volumen de reacción de ligación. Se ligaron 4ng de los oligonucleótidos anilados con 50ng del vector pmirGLO utilizando el protocolo estándar de ligación. Brevemente: 4ng de oligonucleótidos anilados se ligaron con 50ng del vector pmirGLO utilizando la enzima T4 (1U/µg de ADN), procedente del bacteriófago T4 y el buffer de ligación T4 DNA (New England Biolabs) en un volumen final de 20µL. La enzima T4 cataliza la formación de enlaces fosfodiéster entre los extremos 5′ y 3′ del ADN, pudiendo unir tanto extremos cohesivos como romos. La reacción se incubó durante 1 hora a 22°C, inactivándose la reacción a 65°C durante 20 min.

7.4. Transformación de células XL-1 blue mediante electroporación y confirmación del sitio blanco clonado

Se transformaron 100µL de bacterias de la cepa XL-1 blue mediante electroporación con 5ng de cada ligación: vector con oligonucleótido sentido y vector con oligonucleótido antisentido de los genes IRS1 y FNDC3B. Las condiciones de la electroporación fueron: 1500 Volts durante 5ms., en electroporador Multiporator (Boekel Scientific). Las bacterias electroporadas fueron incubadas en LB sin ampicilina durante 40 minutos a 37°C. Finalmente se plaquearon 25, 50 y 75µL de bacterias electroporadas en placas LB agar con Ampicilina, toda la noche, a 37°C. Se repicaron 4 de las colonias crecidas y se utilizó el kit GE para la extraccion del vector pmirGLO ligado.

Para confirmar la presencia del inserto con la secuencia blanco de hsa-miR-183-5p en el vector pmirGLO, se realizó la digestión del sitio interno para Notl. Para ello, 1µg del vector pmirGLO ligado fue digerido con 1µL de la enzima Notl (10U/µL) de Fermentas, Thermo Scientific en presencia de 0,2µL de BSA (100X) y 2 µL de Buffer Neb4 (10X), en volumen final de 20µL durante 1 hora a 37°C, e inactivando durante 10 min. a 65°C. La digestión fue analizada en geles de agarosa 1% en buffer TAE1X, utilizando bromuro de etidio como intercalante para su visualización.

8. Secuenciación de ADN plasmidico

Se enviaron 100ng de los plásmidos reporteros que contenían a ITGB1, FOXO1, IRS1 y FNDC3B a secuenciar a Macrogen Inc. Las secuencias enviadas por Macrogen fueron analizadas (alineamiento) utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.0.9.0.

9. Ensayo con genes reporteros

*9.1.*Co-transfección transitoria del vector reportero psiChECK2- 3' UTR de ITGB1 y mimic miR-183-5p, inhibidor miR-183-5p y control siRNA en LNCaP

Se transfectaron 2.10⁴ células/pocillo de la línea LNCaP por triplicado en placa de 96 pocillos con las diferentes concentraciones de mimic miR-1183-5p y siRNA y inhibidor miR-183-5p, según el protocolo de Qiagen (Guidelines for miRNA mimic and miRNA inhibitor experiments), utilizando Fugene6 de Roche, en una relación 3:1 (fugene (uL): DNA (ug)) (*www.roche-applied-science.com/fugene/instructions*). El reactivo de transfección FuGENE6 de Roche es un reactivo multi-componente (mezcla de lípidos y otros componentes), optimizado, que forma un complejo con el ADN y lo transporta al interior de las células animales con una eficiencia alta de transfección que no se ve alterada por la presencia o ausencia de suero en el medio y no es citotóxico. A las 12hs, 24hs y 48 hs de la transfección, se lisaron las células con Buffer de Lisis Pasiva 1X (Promega) y el sobrenadante se adicionó en una placa blanca (96-well NUNC F-bottom MicroWell plate) para ensayos de bioluminiscencia. Finalmente se midieron las actividades luciferasa de *Firefly y Renilla* de forma consecutiva utilizando el kit Dual-Glo[®] Luciferase Assay System de Promega, según el protocolo especificado por el proveedor. Las medidas de bioluminiscencia se realizaron en el equipo Skanlt Software 2.4.3 RE for Varioskan Flash del Instituto de Investigaciones Clemente

Estable (IIBCE). El tiempo entre cada medida fue de 1000ms, un rango dinamico automático, óptica normal y tipo de medida normal.

Los valores fueron reportados como actividad luciferasa Renilla relativo a la actividad luciferasa de Firefly y los errores como ± el desvío estándar de triplicados biológicos. Los efectos no específicos o citotóxicos de FuGENE fueron evaluados realizando la transfección con el miScript siRNA y con el reactivo de transfección.

*9.2.*Co-transfección transitoria del vector pmirGLO-3' UTR; mimic miR-183-5p y control siRNA en la linea HEK 293T

Se realizó la co- transfección de la línea celular HEK 293T con el plásmido pmirGLO conteniendo la secuencia blanco de hsa-miR-183-5p del 3'UTR de FNDC3B y de IRS1 salvajes (WT) y mutadas (MUT) con las moléculas mimic miR-183-5p y control siRNA.

Tabla 6: Se detallan los sitios blancos para hsa-miR-183 de FNDC3B y de IRS1, tomados del programa de predicciónTargetScanHuman 6.2, y se detalla el número de nucleótidos de la region seed de complementariedad.

_				
	Posición de sitio blanco en 3'UTR	Sitio predictivo de interacción según TargetScanHuman 6.2 (arriba, gen blanco; abajo, hsa-miR-183-5p)	Región 'seed' de complementariedad	
-	Sitio conservado 3105-3111 del 3'UTR de FNDC3B Hsa-miR-183-5p	5'ACAUUGUAUUAAAAC <mark>UGCCAUA</mark> U II II II II 3' UCACUUAAGAUGGUC <mark>ACGGUAU</mark>	7 mer-1A	
-	Sitio conservado 671-678 del 3'UTR de IRS1 Hsa-miR-183-5p	5'AAUAUAAGAAUCAUA <mark>GUGCCAUA</mark> II IIIII 3' UCACUUAAGAUGGU <mark>CACGGUA</mark> U	8 mer	

Se incubaron células de la línea HEK 293 en medio DMEM complementado con 1% de glutamina. Luego de dos pasajes se tripsinizó el cultivo y se plaquearon 5.10⁴ células por pocillo en placa de 24 pocillos siendo el volumen final de 500µL de DMEM por pocillo. Luego de 24 hs de incubación se retiró el medio DMEM y se adicionó 400µL de medio Optimem a cada uno de los pocillos. A continuación se realizaron los siguientes mixes de 50 µL cada uno por separado: 1) mix1: se incubó 1µg de plásmido pmirGLO-FNDC3B wt en medio Optimem con 10mM de mimic miR-183-5p, 3) mix2: se incubo 1µg de plásmido pmirGLO-FNDC3B wt en medio Optimem con 10mM de control siRNA, 4) mix1: se incubó 1µg de plásmido pmirGLO-FNDC3B mut en medio Optimem (Invitrogen, Lifetechnologies), 5) mix2: se incubo 1µg de plásmido pmirGLO-FNDC3B mut en medio Optimem con 10mM de control siRNA, 4) mix1: se incubó 1µg de plásmido pmirGLO-FNDC3B mut en medio Optimem con 10mM de mimic miR-183-5p, 6) mix3: se incubo 1µg de plásmido pmirGLO-FNDC3B mut en medio Optimem con 10mM de control siRNA De forma independiente se realizaron 6 mixes, 2 mixes conteniendo 2,5µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Lifetechnologies) en medio Optimem hasta un volumen final de 50µL y 4 mixes conteniendo 3µL de Lipofectamina 2000 (Invitrogen, Lifetechnologies) en medio Optimem hasta un volumen final de 50µL y 4 mixes conteniendo 3µL de

Cada uno de los preparados fue incubado por 5 minutos a temperatura ambiente y luego se combinaron los mixes con plásmido pmirGLO-FNDC3B wt o mut con el mix que contenía 2,5µL de lipofectamina y los plásmidos que contenian el plasmido mas la molecula mimic o siRNA con los mixes con 3µL de Lipofectamina. La mezcla fue

incubada por 20 minutos a temperatura ambiente y adicionada a los pocillos de la placa (100µL por pocillo). Las transfecciones se realizaron por triplicado.

Se realizaron las mismas preparaciones de mixes de reacción pero utilizando el pmirGLO-FNDC3B mut. Luego de 4-6hs de incubación a 37°C, se descartó el medio Optimem con la mezcla de transfección y se adicionó 500µL de nuevo medio DMEM por pocillo. A las 24 hs, se retiro el medio, se lavó con PBS 1X, se adicionó 100µL del buffer 5x de lisis pasiva (Promega), se mezcló en agitador a temperatura ambiente durante 15 minutos y luego se congeló a -20°C para su posterior análisis com el Kit Dual Luciferase Reporter Assay System de Promega, en el equipo SpectraMax L luminometer (Molecular Devices). Programa del equipo: 2 segundos de retraso y 5 segundos de lectura.

Este protocolo se repitió para elpmirGLO-IRS1 wt y pmirGLO-IRS1 mut. Se realizó una prueba de transfección más, siguiendo el mismo protocolo detallado antes, pero aumentando la concentración de mimic miR-183-5p y siRNA a 20nM, durante la co-transfección con pmirGLO-FNDC3B wt y mut. Los valores fueron reportados como actividad luciferasa *Firefly* relativo a la actividad luciferasa de Renilla y los errores como ± el desvío estándar de triplicados biológicos.

9.3. Transfección transitoria en LNCaP y DU145 con inhibidor miR-183-5p y mimic miR-183-5p

La transfección se llevó a cabo por triplicado y siguiendo el protocolo de Qiagen (**Guidelines for miRNA mimic and miRNA inhibitor experiments**), utilizando FuGENE6 de Roche como reactivo de transfección (<u>www.roche-applied-</u> <u>science.com/fugene/instructions</u>). El paqueo de células y la transfección se realizaron de forma simultánea según el protocolo de Qiagen. Para ello, previo a la preparación del complejo de transfección: FuGENE-ADN, se incubaron las células a ser transfectadas.

Brevemente, los cultivos celulares de Du145 y de LNCaP que presentaban una confluencia de 70-80% y de dos a tres pasajes previos, fueron tripzinizados según el protocolo antes mencionado (5.2.). Se resuspendieron las células en medio RPMI-1640 para obtener un homogenado celular de forma de plaquear 6.10⁴ células/pocillo en placa de 24 pocillos. Las placas fueron incubadas a 37°C, a una atmósfera de presión, 95% de humedad, 5% de CO₂. Rápidamente se realizó la preparación del complejo FuGENE-ADN en medio RPMI -1640 sin Penicilina y Estreptomicina y sin Suero Fetal Bovino. Para ello se adicionó, con el siguiente orden: **RPMI-1640** (el volumen de RPMI-1640 adicionado dependerá de la placa en el que se realice la transfección, (www.roche-applied-science.com/fugene/instructions)), **FuGENE** y **200ng de ADN plasmídico y 50nM de mimic miR-183-5p**, o **200ng de ADN plasmídico y 50nM de inhibidor miR-183-5p**, siendo la relación de FuGENE respecto a las moléculas co-transfectadas: 3µL: 1µg respectivamente. El complejo se incubó durante 20-40 minutos a temperatura ambiente y luego se adicionaron 20µL/pocillo por goteo en la placa incubada con las células. La adición de medio nuevo RPMI-1640 completo no es necesaria durante la transfección con FuGENE.

La determinación de la concentración del ADN a transfectar es crítica para que el proceso de transfección sea exitoso. Por ello en los casos donde hiciese falta se igualaron las concentraciones de ADN a transfectar adicionando 200ng de ADN plasmídico (PGL4-75) resuspendido en Buffer TE (Tris-EDTA) o H₂O libre de nucleasas que no interfiere en la transfección. El incremento de las concentraciones de ADN para utilizar en la transfección fue necesario también para trabajar con volúmenes de reactivos de fácil manipulación. Luego de 24 hs de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio, se lavó dos veces con PBS 1X y extrajo el ARN total con TRIzol.

10. Verificación de ingreso y estabilidad del inhibidor y mimic de hsa-miR-183-5p

Se evaluó el ingreso y la estabilidad de las moléculas sintéticas transfectadas: mimic miR-183-5p, y del inhibidor miR-183-5p mediante la cuantificación por RT-qPCR de utilizando oligonucleótidos específicos para hsa-miR-183-5p y normalizando con scarna17 y rnU6 (kit miScript con SYBR Green para microRNAs de Qiagen). Para ello, se prepararon suspensiones homogéneas de células en fase exponencial conteniendo 1.10³ células/mL en medio RPMI 1640 completo. Se sembraron por triplicado 100uL por pocillo (200cel por pocillo), en placa de cultivo de 96 pocillos. Seguidamente se transfectaron con 50nM de mimic miR-183-5p, 500nM de inhibidor miR-183-5p y 50nM de control siRNA de Qiagen (www.qiagen.com/GeneGlobe/miRNAproducts), según el protocolo Guidelines for miRNA mimic and miRNA inhibitor experiments de Qiagen, utilizando Fugene6 de Roche, en una relación 3:1 (fugene(uL):DNA(ug)) (www.roche-applied-science.com/fugene/instructions)). A las 48, 72 y 96 hs de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS1X. Posteriormente se adicionó 100µL de TRIzolzol por pocillo y se realizó la extracción del ARN, siguiendo los pasos que se especificaron anteriormente.

Se cuantificó el ARN extraído en nanodrop (Asp-3700) y se realizó la síntesis de ADNc utilizando miScript Reverse Transcription Kit de Qiagen, como se describió previamente, posteriormente se cuantificó el miR-183-5p mediante RT-qPCR con el kit miScript con SYBR Green para microRNAs de Qiagen, utilizando oligonucleótidos específicos para hsa-miR-183-5p y normalizando con scarna17 y rnU6.

11. Retrotranscripción de ARNm

Se realizó la síntesis de ADNc de las muestras de ARN extraídas con Trizol, utilizando el kit de SuperScript TM III de Invitrogen (Life Technologies). Brevemente, 100ng de random oligonucleótidos se combinaron con 1µL de dNTPs (10mM) y 300ng de ARN total en un volumen final de 13µL y fueron incubados a 65°C por 5 minutos. Se incubó en hielo durante 1 minuto y se adicionaron 4µL de Buffer First-Strand 5X, 1µL de DTT 0,1M, 1µL de RNaseOUT TM (40U/µL) y 1µL de la enzima SuperScript TM III (200U/µL). Finalmente se incubó a 25°C durante 5 minutos; 50°C durante 50 minutos y se inactivó la enzima calentando a 70°C durante 15 minutos. Se almacenó el ADNc a -20°C hasta su uso.

12. Cuantificación por qPCR de blancos candidatos para miR-183-5p

Posteriormente se cuantificó el ADNc de los genes blancos seleccionados *in silico*, mediante el kit SYBR Master Mix de Applied Biosystems. Para ello se utilizaron: 5µL del Syber Master Mix, 1µL del Universal Primer 10X, 0,5-1µL de primer específicos para cada gen (10µM) y 1µL de las diluciones 1/10 de los ADNc sintetizados, en un volumen de

reacción final de 10µL. Los oligonucleótidos utilizados en la reacción de RT-qPCR se diseñaron con el sistema de Universal ProbeLibrary de Roche (www.roche-applied-science.com) a partir del Probe Finder versión 2.49 for Human, tomando en cuenta la variante de splicing mas representativa en cada tejido (GeneBank) y teniendo en cuenta el intron spanning assay. Los pares de primers específicos se listan en la Tabla 4.

Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 95°C durante 10 minutos, y 40 ciclos de 95°C durante 15 segundos y 60°C durante 60 segundos. Para la normalización de la expresión de los diferentes ARNm, se utilizó el promedio de dos estándares internos: β-actina (BACT) y Gliceraldehído -3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador RotorGene 6000 (Corbett) del Instituto de Investigaciones Clemente Estable (IIBCE). Los datos fueron obtenidos y procesados primeramente con el programa asociado (RotorGene 6000 software) seleccionando un umbral para la determinación del ciclo umbral o Ct (*threshold cycle*). La ausencia de productos inespecíficos fue confirmada mediante el análisis de las curvas de melting. El rango analizado fue de 60°C a 95°C. Los datos fueron exportados a los programas Graph Pad Prism 5.00.288 y Excel (Microsoft) para ser graficados y analizados estadísticamente. Para la determinación de los valores relativos de ARN, los datos fueron análizados por el método de 2^{-ΔΔct} (Livak and Schmittgen 2001).

Determinación de eficiencias de los oligonucleótidos

Se determinó la eficiencia de amplificación de las reacciones y la linealidad de los valores de amplificación en diluciones seriadas de las muestras, determinando así la calidad de los cebadores utilizados en los ensayos.

13. Estudios de expresion génica global mediante ensayos de microarreglos por Affymetrix

Las condiciones de transfección fueron las mismas que las utilizadas en el apartado 9.3. Luego de 24 hs de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se retiró el medio, se lavó dos veces con PBS 1X y se extrajo el ARN total de las líneas LNCaP y DU145 transfectadas con TRIzol. La integridad del ARN fue verificada con el programa 2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE72904909_2012-08-21_18-20-18.xad. 2100 bioanalyzer de Agilent Technologies, Inc. utilizando el chip para Eukaryote Total RNA Nano. Con un volumen del ARN (recomendado por el kit) obtenido se realizó, en colaboración con el grupo del Dr. David Munroe (NCI-SAIC, Frederick), el análisis de la expresión de genes mediante hibridación con Affymetrix GeneChip HG-U133A 2.0 arrays. Posteriormente, se escanearon y extrajeron los datos de fluorescencia por sonda (entre otros) utilizando los programas de la compañía. A continuación, los datos obtenido en archivos .cel fueron importados a MADB (microarray database, de NIH-USA) y normalizados utilizando métodos estandard disponibles en la herramienta. Los datos fueron normalizados utilizando RMA(R/Bioconductor Cal) y a las listas normalizadas de forma independiente entre cada línea celular, se les asignó un grupo donde se especificó el nombre y características asociadas. Se realizó la comparación de las medias de cada grupo y la diferencia logarítmica entre cada grupo tratado, mimic o inhibidor y el control siRNA. Los genes que presentaran una diferencia \leq o \geq a 0,5, (genes de la línea DU145 y LNCaP sobreexpresados (\geq 1) en los análisis de microarreglos de las muestras transfectadas con inhibidor, sub-expresados (\leq 1) en los análisis de microarreglos de las muestras transfectadas con mimic), fueron exportadas a Excel para

posteriores cálculos. Con la finalidad de eliminar señales cercanas al ruido de fondo, se fijó un cut off de emisión en 3 para todas las muestras. Finalmente, sustrayendo los logaritmos de las intensidades normalizas se obtuvieron listas de genes expresados diferencialmente en los tres experimentos realizados (inhibición, sobre-expresión y control).

14. Ensayos de proliferación celular

La contribución de hsa-miR-183-5p en la neoplasia fue determinada mediante el análisis de uno de los atributos del fenotipo tumoral: proliferación celular mediante el ensayo de 3-(4,5-Dimetilazol-2-yl)-bromato de 2,5difeniltetrazolium (MTT). El ensayo de MTT se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (sal de tetrazolio o MTT), que presenta color amarillo, por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa en un compuesto insoluble de color azul (formazán). El producto de la reacción, formazán queda retenido en las células y puede ser liberado mediante la solubilización de las mismas.

La capacidad de las células para reducir al MTT constituye un indicador de la integridad de las mitocondrias y su actividad funcional es interpretada como una medida de la viabilidad celular, por lo que la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas. La determinación de la capacidad de las células de reducir el MTT a formazán después de su exposición a un compuesto permite obtener información acerca de la toxicidad del compuesto que se evalúa.

El ensayo de MTT se realizó luego de 48, 72 y 96 hs de la transfección de las lineas de PCa: LNCaP y DU145 con moléculas sintéticas que producen la sobreexpresión de hsa-miR-183-5p (mimic miR-183-5p) o bloqueo de dicho miR, (inhibidor miR-183-5p) y un RNA corto control sin homología en el genoma humano (control siRNA) de Qiagen (www.qiagen.com/GeneGlobe/miRNAproducts). La selección de estas líneas tiene por objeto poder observar diferencias producidas por la sensibilidad a andrógenos, al utilizar una línea sensible a andrógenos: LNCaP y otra línea independiente de andrógenos: DU145.

Brevemente; se prepararon suspensiones homogéneas de células en fase exponencial conteniendo 1.10³ células/mL en medio RPMI 1640 completo. Se plaqueraon 100uL por pocillo (200 células por pocillo), en placa de cultivo de 96 pocillos, tratadas para adherencia celular. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂, y seguidamente se transfectaron con 50nM de mimic miR-183-5p, 500nM de inhibidor miR-183-5p y 50nM de control siRNA de Qiagen (www.qiagen.com/GeneGlobe/miRNAproducts), según el protocolo Guidelines for miRNA mimic and miRNA inhibitor experiments de Qiagen, utilizando Fugene6 de Roche, en una relación 3:1 (fugene(uL):DNA(ug)) (www.roche-applied-science.com/fugene/instructions)). Se realizaron de 3-5 réplicas biológicas de cada transfección. En paralelo se realizaron transfecciones para la verificación del ingreso de las moléculas sintéticas transfectadas en la línea LNCaP (Apartado 10). Luego de 48, 72 y 96 hs de incubación a 37°C y 5% de CO₂, se realizó el ensayo de MTT. Para ello se adicionó 20uL de MTT (5mg/mL) en solución PBS 1X a cada pocillo. Luego de 4 hs de incubación a 37°C y 5% de CO₂ se retiró el medio de los pocillos, y se adicionó 200uL de DMSO. Se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad y con agitación orbital moderada, durante 15 min. Se recolectó el

sobrenadante y se leyó la densidad óptica en espectrofotómetro (Thermo Scientific Varioskan Flash Multimode (www.thermo .com)) a 570nm y 690nm de longitud de onda. Posteriormente, se evaluó y graficó la relación de absorbancia a 570nm-690 nm.

Se calculó el % de viabilidad como DO inhibidor/DO siRNA)*100 y el % de la inhibición del crecimiento como DO siRNA-DO inhibidor)/DO siRNA*100 (Chiang, Song et al. 2012, Chiang, Hou et al. 2013).

15. Análisis estadísticos

15.1. Estudio de correlación entre los niveles de APE pre-operatorio, score de Gleason y niveles de hsa-miR-183 detectados en las 7 muestras de prostatectomías radicales: Correlación de Pearson

Se analizaron las historias clínicas de los 7 pacientes, de forma de determinar si el score de Gleason se correlacionaba con los niveles de hsa-miR-183-5p detectados en las muestras pareadas. Para ellos se realizó un estudio de Correlación de Pearson (r), con un intervalo de 95%, y test de dos colas (α =0,05), del paquete estadístico GraphPad Prism 5.00.288.

15.2. Cuantifiación por RT-qPCR:

Se utilizaron los siguientes test estadísticos: para análisis de genes blancos predichos in silico y seleccionados mediante arrays: One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Bonferroni, p < 0.05 del paquete estadístico GraphPad Prism 5.00.288 en las líneas LNCaP y DU145.

15.3. Medidas proliferación

Para determinar si existen diferencias significativas entre las muestras transfectadas con mimics y con inhibitor relativo al control (siRNA), se utilizó el test estadístico Two-way ANOVA del paquete estadístico GraphPad Prism 5.00.288 y el One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Tukey, p≤0,05, para la comparación a 48hs, 72hs y 96 hs.

15.4. Ensayos de gen reportero

Test estadísticos utilizados: "Kruskal-Wallis test" y "Dunn's Multiple Comparison Test" con un p valor de <0,05 (One-way ANOVA del paquete estadístico GraphPad Prism 5.00.288).

16. Estudios in silico

16.1. Identificación de genes blancos candidatos de hsa-miR-183



Figura 17: Diagrama de Flujo de los estudios realizados para la identificación de blancos candidatos predichos in silico.

Se realizó la pedicción *in silico* de los genes candidatos que poseen una secuencia de reconocimiento del hsa-miR-183 en el extremo 3'UTR de ARNm específicos mediante la utilización del software de predicción de libre acceso, denominado miRecords integrador de 11 algoritmos de predicción: DIANA-microT, Micro Inspector, mi Randa, Mir Target 2, mi Target, NB miRTar, PicTar, PITA, RNA 22, RNA hybrid, TargetScan/TargetScanS (Xiao, Zuo et al. 2009).

Dentro de la aplicación de miRecords "Blancos predichos" se selecciono a hsa-mir-183 de la lista de microARNs, previa selección de especie "homo sapiens". Una vez desplegada la lista de blancos, filtramos la lista de genes para obtener el grupo de genes presentes en al menos 4 de los 11 algoritmos de predicción establecidos en miRecords. Los umbrales para cada algoritmo: DIANA-microT, Micro Inspector, mi Randa, Mir Target 2, mi Target, NB miRTar, PicTar, PITA, RNA 22, RNA hybrid, TargetScan/TargetScanS, fueron los default del programa. La lista de genes seleccionados fue exportada como Tabla a excel, y guardada como Lista 1 (datos no mostrados) de genes *in silico* (Figura 17).

16.2.1. Meta-análisis de datos de expresion génica a nivel de ARNm

Estudio de la actividad predictiva de hsa-mir-183 en estudios de expresión génica en PCa

Para esto realizamos un estudio de meta-análisis utilizando los estudios más extensos de expresión génica de cáncer hasta ahora publicados en la base de datos: **ONCOMINE** (Rhodes, Yu et al. 2004) (<u>http://www.oncomine.org/</u>) en su versión Research Premium. Para comenzar el estudio, se creó un "concepto" en ONCOMINE, definido como un grupo de genes que representa un aspecto biológico específico), constituido por la lista de los genes blancos predictivos del hsa-miR-183, representado por sus identificadores (ID) o símbolo genético.

Una vez ingresado el concepto en ONCOMINE, se solicitó la búsqueda de asociaciones estadísticamente significativas entre este nuevo concepto y todos los conceptos presentes en la base de datos: Cáncer vs. Normal, Cáncer vs. Cáncer (Histología del Cáncer; Multi-Cáncer), Análisis de Subtipos de Cáncer (Evolución clínica; Metástasis vs. Primario; Subtipo Molecular: Biomarcadors; Subtipo Molecular: Mutaciones; Subtipo Patológico: Grado; Subtipo Patológico: Estadío; Respuesta del Paciente al Tratamiento; Recurrencia vs. Primario; Otras), Cáncer vs. Línea de Base (ADN únicamente), Vías y Drogas (Sensibilidad a Drogas y Perturbación).

Para la elaboración de esta búsqueda se establecieron los siguientes parámetros: búsqueda en bases datos de ARNm, valores estadísticos resultantes de "p" menores de 0.001 y relaciones de disparidad estadísticas resultantes ("odds ratio") mayores de 2.0. El algoritmo realiza una búsqueda de correlación entre los genes del concepto ingresado y los perfiles de expresión de los genes presentes en los diferentes estudios que se encuentran en la base de datos de ONCOMINE.

Se seleccionaron aquellos estudios que muestran una disminución modular estadisticamente significativa de alguno de los genes blanco predicitivos para mir-183 incluidos en el concepto en PCa o en conceptos que representan un estatus más agresivo de la enfermedad.

Esta búsqueda genero la Lista 3 (datos no mostrados) de genes in silico (Figura 17).

16.2.2. Meta-análisis de datos de expresión génica a nivel de proteína

El portal **The Human Protein Atlas** (HPA) (http://www.proteinatlas.org/) es una base de datos disponible públicamente con millones de imágenes de alta resolución que muestran la distribución espacial de proteínas en 44 tejidos humanos normales diferentes, 20 tipos de cáncer diferentes y 46 líneas celulares humanas diferentes.

La expresión de proteínas anotadas en este portal tiene como objetivo crear un mapa comprensivo de los perfiles de expresión proteico en tejidos humanos normales y células. En este sitio evaluamos el perfil de expresión

proteico de los genes de la lista generada en ONCOMINE, comparando la condición próstata normal vs carcinoma de próstata. Esta búsqueda genero la Lista 4 (datos no mostrados) de genes *in silico*(Figura 17).

17. Análisis de las vías asociadas con los genes seleccionados

Finalmente, se realizó una aproximación de la función de hsa-miR-183 mediante estudios de Ontología genética, vías de señalización y metabólicas a través de: **WebGestalt** ("**WEB**-based **GE**ne **SeT A**naLysis **T**oolkit"), (Duncan et al., 2010). Así, analizamos la presencia de los genes blancos seleccionados *in silico* en algunas de las vías metabólicas importantes.

RESULTADOS Y DISCUSION

1. Determinación de los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p en PCa.

Como primera aproximación, determinamos los niveles de expresión del miR-183 en la próstata normal y tumoral. Para esto, trabajamos con muestras de pacientes y también con líneas celulares de PCa.

1.1.<u>Tumores de pacientes</u>: muestras tumorales y normales de prostatectomías radicales de pacientes con PCa.

Con el objetivo de estudiar si hsa-mir-183-5p esta desregulado en el tejido neoplásico, se determinaron los niveles de expresión de este miR en siete muestras pareadas de tejido normal y tumoral fijados en parafina provenientes de prostatectomías radicales.

Cuatro de ellas, procedían del Servicio de Anatomopatología del Hospital Policial (muestras 2336, 2431, 3547 y 3765 de Tabla 7) y tres correspondian a tres pacientes analizados previamente por la Dra. Duhagon, muestras recolectadas del Departamento de Patología de la Universidad de Ulsan, Colegio de Medicina, Asan Medical Center, Seoul, Republica de Korea (muestras 327, 2088 y 3733 de Tabla 7).

Estimamos que este tamaño de muestra es suficiente para alcanzar un poder de 0,9.

Esto se basa en las siguientes premisas: I. El cambio de expresión es una variable de respuesta continua de muestras pareadas de cada individuo (tejido normal vs. tumoral del mismo paciente), II. Datos previos indican que la diferencia en la respuesta de las muestras pareadas está distribuida normalmente, con un desvío estándar estimado de 1,5 (Schaefer, Jung et al. 2010). La verdadera diferencia de la respuesta media de las muestras pareadas es 1,35. En este contexto, 7 muestras pareadas son suficientes para rechazar la hipótesis nula (diferencia de respuesta igual a 0) con una probabilidad de 0.9 (Schaefer, Jung et al. 2010). El error Tipo I asociado a este test de hipótesis nula es 0.05.

El criterio histopatológico para la selección de la muestra consistió en la presencia de regiones normales y tumorales claramente discernibles que no presenten zonas de composición tisular heterogénea (hiperplasia, parénquima, vascularización). Las muestras fueron analizadas por dos patólogos en forma independiente. Luego de seleccionados los tacos con regiones de tejido normal y tumoral fijadas en parafina, se extrajo ARN, se sintetizó cDNA a partir de éste como molde y se determinaron los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p mediante la técnica RT-qPCR, utilizando oligonucleótidos cebadores específicos para hsa-miR-183-5p. Actualmente no hay disponibles genes de referencia validados para RT-qPCR de miRs en PCa. Algunos autores recomiendan la utilización de hsa-miR-130b, o la media geométrica de de hsa-miR-130b y rnU6-2 (ambos deexpresión estable) para la normalizadore en los estudios de expresión de miRs en PCa (Schaefer, Jung et al. 2010). Estudios de Andersen et al. aconsejan el uso de al menos tres genes normalizadores no regulados para el análisis, aunque el uso de 5 a 10 genes normalizadores combinados es altamente recomendado (Andersen, Jensen et al. 2004). Con estos antecedentes, y debido a las limitaciones presupuestales de este trabajo, las normalizaciones se realizaron con el promedio de los normalizadores rnU6 y scarna17, disponibles en el laboratorio y ampliamente reportados en la literatura.

 Tabla 7: Características de las muestras analizadas (Tumoral-Normal, APE (ng/mL), score de Gleason, concentración de ARN (ng/uL) y relación de absorbancia: 260/280).

lidemülfika cilõm	Característica	APE (ng/mL)	Score de Gleason	[ARN] ng/µL	260/280
327	CONTROL	ND	10(5+5)	3,63	1,7
	TUMOR	-		30,27	1,7
2088	CONTROL	ND	10 (5+5)	8,64	1,7
	TUMOR	-		33,69	1,7
3733	CONTROL	ND	10 (5+5)	26,1	1,7
	TUMOR	-		34,95	1,7
2336	CONTROL	4,18	6 (3+3)	261,43	1,75
	TUMOR	-		326,5	1,89
2431	CONTROL	5,23	7 (3+4)	162,34	1,8
	TUMOR	-		64,13	1,77
3547	CONTROL	5,56	6 (3+3)	112,7	1,77
	TUMOR	-		136,17	1,81
3765	CONTROL	7,51	8(3+5)	81,11	1,77
	TUMOR	_		579,67	1,11

Como se observa en la Figura 18. A., de las 7 muestras analizadas, 6 de ellas (P327, P2088, P3733, P2336, P2431 y P3547) muestran un incremento de al menos una vez en los valores de expresión de hsa-miR-183-5p relativo a las muestras control. Esta diferencia en el cambio de expresión esta acentuada en las muestras P327, P3733, P2431 y P2088, donde se reportan cambios de expresión con magnitudes de 29, 11, 5 hasta 4,8 veces respectivamente. La muestra P3765, contrariamente al resto de las muestras, presenta una sub-expresión de hsa-miR-183-5p en el tejido tumoral, con un valor de cambio en la expresión de 2,5 veces menos en las muestras tumorales. Sin embargo, al aplicar un test T pareado al conjunto de las muestras analizadas, se apoya el supuesto de que hsamiR-183-5p está significativamente sobre-expresado en muestras tumorales de próstata relativo a las muestras de glándula prostática control con un p≤0,05, y de esta forma ratifica los datos reportados en bibliografía acerca de la función oncogénica de hsa-miR-183 en varios tipos de neoplasias (Bandres, Cubedo et al. 2006, Motoyama, Inoue et al. 2009, Lehmann, Streichert et al. 2010, Myatt, Wang et al. 2010, Sarver, Li et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010).



Figura 18: A. Análisis del cambio en los niveles de expresión (Fold Change) de hsa-miR-183-5p en 7 muestras pareadas de pacientes con PCa (P327, P2088, P3733, P2336, P2431, P3547 y P3765). Se representan los cambios en los niveles de expresión relativos a las muestras controles. La normalización se realizó con el promedio de rnU6 y scarna17. Se representa el desvío estándar de los replicados técnicos. **B.** Relación entre los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p (concentración de hsa-miR-183-5p en las muestras tumorales relativo a las muestras normales, utilizando el promedio de los normalizadores rnU6 y scarna17), con el score de Gleason en las 7 muestras pareadas de PCa.

Considerando las performances (alcances y limitaciones) de los dos parámetros clínicos: el **APE** y el **score de Gleason**, y debido a las limitaciones en el potencial diagnóstico en función de la inespecificidad y baja sensibilidad del APE, decidimos analizar la existencia de correlación entre los valores de sobreexpresión de **hsa-miR-183-5p** y los valores del **score de Gleason** asignados a cada paciente, ya que como mencionamos anteriormente el score o clasificación de Gleason, es el método histopatológico más utilizado y aceptado clínicamente para determinar el pronóstico de PCa (Bostwick 1994).

Los resultados de correlación de Pearson (r), con un intervalo de 95%, y test de dos colas nos indican valores de r de 0,59 entre el score de Gleason y los valores del miR (α =0,05) para las 7 muestras estudiadas.

Si bien el tamaño de la muestra hace muy improbable extraer conclusiones estadísticamente confiables, los pacientes con sobre-expresión de hsa-miR-183-5p en tejido tumoral presentan una tendencia al incremento del grado histopatológico de Gleason, es decir, aquellas muestras con un score de Gleason mayor (10), presentaron una mayor magnitud en la expresión de hsa-miR-183-5p (29, 11 y 4,8 veces). Es interesante que las muestras que presentan un score de 6 (P2336 y P3547), y por lo tanto un buen pronóstico, son las que presentan coincidentemente los valores de sobre-expresion de hsa-miR-183-5p mas bajos (cambio de expresión de 1 a 3), apoyando entonces un rol oncogénico de este miR en la patología.

Por otro lado, la muestra P3765, con un score de Gleason de 8 no presenta un incremento del miR en estudio, sino que por lo contrario, los valores de expresión indicaban una sub-expresión del mismo en las muestras tumorales (Tabla 7) (Figura 18. B.). La discrepancia en esta muestra con respecto a la modulación esperada, no llama nuestra atención, debido a que la heterogeneidad en PCa está bien documentada. De disponerse de un set de mayor número de muestras, sería posible identificar con confianza subgrupos de outliers, en este caso, de tumores con características genéticas diferentes. Además, se ha reportado la existencia de alteraciones moleculares en tejidos benignos (Chandran, Dhir et al. 2005), así, los estudios de Heni et al., plantean que o bien las vías están desreguladas antes de que se produzca el segundo hit para dar lugar al cáncer o el cáncer modifica el tejido adyacente e induce cambios de expresión a nivel transcripcional en este caso de los subtipos de IR/IRS (Heni, Hennenlotter et al. 2012).

Durante el transcurso de este proyecto, se publicaron varios estudios de expresión de miRs en PCa describiendo la sobre-expresión de hsa-mir-183 en el tejido tumoral (Schaefer, Jung et al. 2010, Martens-Uzunova, Jalava et al. 2012, Ueno, Hirata et al. 2013, Zhang, Sun et al. 2013), lo que apoya la hipótesis de que funciona como un oncomir, tal como fue propuesto por nuestro grupo.

Algunos de estos trabajos reportan también una correlación positiva entre los niveles de hsa-mir-183 y características histopatológicas y evolutivas de la enfermedad (Mihelich, Khramtsova et al. 2011, Ueno, Hirata et al. 2013). Asimismo, la Dra. Katia Ramos Moreira Leite, en la Universidad de Sao Paulo, Facultad de Medicina, ha confirmado la correlación entre mir-183 y los niveles de PSA en un set de más de 100 pacientes (comunicación personal).

1.2. <u>Líneas celulares</u>: PCa dependientes, sensibles e independientes de andrógenos, líneas celulares normales de próstata y líneas primarias de pacientes terminales con PCa.

La determinación de los niveles de hsa-miR-183-5p en líneas celulares permite evaluar si la sobre-expresión observada en el tejido maligno, también se visualiza en los modelos de líneas celulares de PCa. Así mismo, permite seleccionar las líneas más adecuadas para utilizar en los experimentos de validación de los hallazgos empíricos en el set clínico. Por esta razón, se compararon los perfiles de expresión de hsa-miR-183-5p en líneas celulares de PCa; dependientes, sensibles e independientes de andrógenos (LNCaP, RWPE-2, MDA PCa 2b, 22Rv1, DU145, PC-3) y líneas celulares normales de próstata: RWPE-1, WPE-stem y WPE-int utilizando la misma metodología. También, se analizó el perfil de expresión de hsa-miR-183-5p de tres líneas primarias de pacientes terminales con PCa (PCSC1, PCSC2 y PCSC3), tumorigénicas e independientes de andrógenos obtenidas previamente por Duhagon et al. (Duhagon, Hurt et al. 2010). En todos los casos se utilizó el promedio de los genes rnU6 y scarna17 como control de la cantidad de ARN de cada ensayo (Figura 19).



Figura 19. Cambio en la expresión (Fold change) de hsa-miR-183-5p en líneas celulares de próstata normal y tumoral y tres líneas primarias de pacientes terminales con PCa. La normalización se realizó con el valor promediado de scarna17 y rnU6. Los cambios de expresión se calcularon relativos a los valores reportados en las líneas de próstata, RWPE1, no tumorigénica. Las barras de error representan el desvío estándar de los replicados técnicos. En la tabla se detallan características de la línea celular; RA: respuesta a andrógenos, AS: andrógeno sensible, AD: andrógeno dependiente, AI: andrógeno independiente. También se indica la capacidad de la línea de generar tumor mediante inoculación por vía subcutánea u ortópica en ratones nude (Tumor).

Las líneas celulares analizadas se colocaron sobre la abscisa del gráfico de la Figura 19 en orden creciente (hacia la derecha) con respecto principalmente al potencial tumorigénico, y en función de esta capacidad, con respecto a la presencia o ausencia de respuesta a andrógenos; esto imita lo que sucede en PCa, donde la progresión está caracterizada por un cambio del estado andrógeno-dependiente (AD) al estado andrógeno-independiente (AI), atravesando por un estado andrógeno sensible (AS) donde las células no requieren andrógenos para proliferar pero en su presencia lo hacen más rápidamente (de WPE stem a PC-3).

La evolución de un estado AD a uno AI, se debe en algunos casos a la pérdida o mutaciones de los receptores de andrógenos. Esto es así para el caso de la línea andrógeno sensible LNCaP, en la cual se han identificado hots spots en el codón 887 del dominio de unión a andrógenos del gen, provocando que el receptor se una a otros esteroides y disminuyendo la afinidad por los andrógenos (Russell, Bennett et al. 1998).

Los resultados obtenidos muestran una tendencia en el aumento de la expresión de hsa-miR-183-5p en líneas de PCa en comparación con la línea normal de próstata (RWPE1).

Los valores más altos (fold change de entre 20 a más de 100 veces) fueron reportados para las líneas: LNCaP, MDA-PCa 2b, 22 Rv1, Du145 y las tres líneas primarias de pacientes terminales. Contrariamente a lo esperado, PC-3, que es una de las líneas más agresivas en PCa (AI), mostró una sobre-expresión de hsa-miR-183-5p con respecto a la línea normal RWPE1 (15 veces), estos valores se asemejan a los valores reportados por Ueno et al., donde se
observa una sobre-expresión de hsa-miR-183-5p de aproximadamente 13 veces en PC-3 relativo a la línea normal de próstata, RWPE1 (Ueno, Hirata et al. 2013).

Sin embargo, a pesar de que los valores de sobre-expresión de hsa-miR-183 en las líneas DU145 y LNCaP son muy similares entre sí en dicho trabajo (3,51 y 3,33 respectivamente), nosotros reportamos mayores cambios de expresión en ambas (de entre 20 [LNCaP] a 25 [DU145] veces más).

Esta discrepancia, tal vez se deba a las diferencias cariotípicas entre las líneas celulares de diferentes laboratorios, que pueden deberse al número de pasajes en cultivo o los métodos de cultivo. Este es un problema común que da lugar a la escaza reproducibilidad de resultados (Hughes, Marshall et al. 2007, Pelliccia, Ubertini et al. 2012).

Este resultado sugiere un perfil de expresión similar de hsa-miR-183-5p en líneas celulares tumorales y muestras clínicas, lo que valida el uso de líneas celulares como modelo en el estudio de la función oncogénica de este miR.

2. Estudio de genes blancos regulados por hsa-miR-183

2.1. Identificación predictiva de genes blancos candidatos de hsa-miR-183: Predicciones computacionales

Con el objetivo de seleccionar un grupo reducido de genes blancos candidatos a ser regulados por hsa-miR-183, se realizaron una serie de estudios teóricos, utilizando diversas herramientas que incluyeron algoritmos de predicción de genes con sitios blancos de microARNs y bases de datos de expresión génica de PCa.

Inicialmente, se utilizó el software de **predicción** de libre acceso, denominado miRecords para definir una lista primaria de genes que presenten una secuencia de reconocimiento del hsa-miR-183 en el extremo 3'UTR de ARNm específicos (Xiao, Zuo et al. 2009). Este programa muestra por defecto las interacciones entre miRs: blancos.

Sin la aplicación de filtros se identificaron **31914** secuencias de genes que presentaban sitios de reconocimiento de hsa-miR-183 predichos por al menos 1 algoritmo de predicción de entre los 11 que integran la herramienta. Con el fin de reducir el número de blancos identificados, determinamos los blancos predichos en al menos 4 de los 11 algoritmos de predicción establecidos en miRecords. Esto dió lugar a un grupo de **441** genes con sitios blancos para hsa-miR-183, que resultan finalmente en **360** genes cuando se eliminan las variantes de splicing (Lista 1 de Figura 17, datos no mostrados).

Dado el alto número de genes predichos y las conocidas limitaciones de los algoritmos de predicción, nos propusimos disminuir la lista de genes candidatos a estudiar en base a su perfil de expresión en muestras clínicas de pacientes, es decir, determinar si la sub-expresión de estos genes blancos se correlacionaba con PCa.

Para esto realizamos un estudio de <u>meta-análisis</u> utilizando los estudios más extensos de expresión génica de cáncer hasta ahora publicados en la base de datos: ONCOMINE (<u>http://www.oncomine.org/</u>) (Rhodes, Yu et al. 2004).

Para comenzar el estudio, se creó un "concepto" dentro de la plataforma (definido como un grupo de genes que representa un aspecto biológico específico), constituido por la lista de los 360 genes blancos predictivos del hsamiR-183, representado por sus identificadores (ID) o símbolo genético. A continuación se subió a Oncomine la lista de los genes y se interrogó si estaban modularmente desregulados en los estudios de cáncer disponibles en la base de datos.

Nuestra hipótesis establece que hsa-miR-183-5p presenta una función oncogenica en PCa, por lo que esperamos que los ARNm regulados por dicho miR estén modulados negativamente en el tejido tumoral respecto al normal, o en estadios avanzados respecto a estadios tempranos de la enfermedad, y por lo tanto, que funcionen como genes supresores de tumor de estar involucrados en la etiología tumoral (Tabla 8).

Tabla 8: Meta-Análisis de la expresión de genes blanco predictivos de hsa-miR-183 en estudios genómicos de cáncer utilizando Oncomine. La columna de la izquierda indica el origen tisular de los estudios analizados. El resto de las columnas listan los conceptos definidos en los estudios (histología, evolución clínica, sitio primario o metastásico, genotipo, estadio, etc). Los números indican el número de estudios que muestran una correlación positiva entre subtipos diferentes de cáncer y la sobreexpresión (rojo) o sub-expresión (azul) de los genes blanco de hsa-miR-183 predictivos con un p \leq 0.001.

	_																									
	C	ancer	cer Cancer vs. Cancer				Cancer Subtype Analysis											Cancer								
Concept Type by Cancer	N	vs. orm al	- and a second	Histology		Multi-cancer	Clinical	Outcome	Metastasis	vs. Primary	Molecular	subtype: Biom arker	Molecular	Subtype: Mutation	Pathology	subtype: Grade	Pathology	subtype: Stage	Patient	l reatment Response	Recurrence	vs. Primary	ī	Other	Base (Df on	, Ine VA ly)
Bladder Cancer		1			1																					
Brain and CNS Cancer	1	2	4	5	2		1	1						4		2			2	1		1				
Breast Cancer		9	5	4	1	2	2	8			3	4		1		3	2	6		1						
Cervical Cancer	1		1	2												1										1
Colorectal Cancer		2	2	2			3	1						1		1	8	1					1			1
Esophageal Cancer																										
Gastric Cancer			1	2		1									1									1		
Head and Neck Cancer	2	2	1		1			1								1		2								
Kidney Cancer		1			1		2									1		1								
Leukemia			2	5		2		2					7	7					1	1						
Liver Cancer	1		1	1																						
Lung Cancer			2	2	1		1		1				1	1		1										
Lymphoma		4	4	2		2	2	4			2		2	2												
Melanoma		1				1	2	3					1													
Myeloma			2	1				1						1												
Other Cancer				2												1								1		
Ovarian Cancer		2	4	4	1			3				1				1	1							3		
Pancreatic Cancer		1			1									1												
Prostate Cancer		3						6		2				1		4		1						1		2
Sarcoma			4	5		1							1	1												2
Significant Unique Concepts	5	28	33	36	9	8	13	30	1	2	5	5	12	20	1	16	11	11	3	3		1	1	6		6

Los resultados de la Tabla 8, muestran unánimemente, que en PCa los genes blanco predictivos de hsa-miR-183 se ven significativamente reprimidos en forma modular (indicado por el color azul en los casilleros de la fila de PCa). A diferencia de esto, en otras neoplasias, como el cáncer de mama, se observan correlaciones entre la sobreexpresión de estos genes y la malignidad (ver números en rojo), sugiriendo que tal vez este miR funcione como un supresor de tumor en otro tipo de neoplasias, tal como lo indica la bibliografía (Dahiya, Sherman-Baust et al. 2008, Shimono, Zabala et al. 2009, Heffelfinger, Ouyang et al. 2012, Lodrini, Oehme et al. 2013).

Sin embargo, de manera global, los genes analizados muestran un patrón general de sub-expresión de los genes blancos, apoyando una función oncogénica de hsa-miR-183, rol ampliamente reportado en diferentes tipos de

neoplasias, colorectal, próstata, sarcoma sinovial, urotelial, pulmón, hepatocelular (Motoyama, Inoue et al. 2009, Sarver, Li et al. 2010, Schaefer, Jung et al. 2010, Yamada, Enokida et al. 2011, Zhu, Liu et al. 2011, Ueno, Hirata et al. 2013, Zhou, Zhang et al. 2014).

Específicamente en PCa, el resultado de este análisis muestra un total de **252** de estos 360 genes que presentan sub-expresión en al menos uno de los 12 "conceptos" de Oncomine. Estos conceptos constituyen grupos específicos de muestras, e incluyen diferentes categorías. La sub-expresión de estos genes se correlaciona significativamente ($p \le 0,0001$, disparidad 2) con varios aspectos clínicos del PCa como la transformación (cáncer vs. normal), los subtipos de cáncer (metástasis vs. primario, subtipo molecular por biomarcadores, mutaciones, clasificación histopatológica [grado, estadío], la evolución clínica de los pacientes en respuesta al tratamiento [recurrencia a 1, 3 y 5 años]), tal como se indica en la Tabla 8.

Del conjunto de 252 genes, 116 están significativamente sub-expresados a nivel de ARNm en al menos 3 estudios independientes, lo que apoya su posible importancia en el PCa. A modo de ejemplo de este tipo de análisis se presenta el resultado del estudio de Taylor (Cancer Cell. 2010/07/13), donde se muestra una lista parcial de 20 genes (dispuesta en orden decreciente según el p valor) significativamente sub-expresados en muestras de Carcinoma de próstata con recurrencia a 5 años (2) relativo a los niveles de expresión en muestras sin recurrencia a 5 años (1) (Figura 20).

Esta lista incluye algunos genes que ya han sido reportados en la bibliografía como blancos directos de hsa-miR-183, tal como **Egr1**, en sarcoma sinovial, rhabdomiosarcoma y cáncer de colon, reportando para hsa-miR-183 funciones que favorecen la migración celular mediante la interacción con Egr1 (Sarver, Li et al. 2010).

Sin embargo, aunque Egr1 es un reconocido supresor de tumores en diferentes tipos de neoplasias, está reportado como oncogén en PCa (Baron, Adamson et al. 2006, Yu, Baron et al. 2007), por lo que la sub-expresión en carcinoma recurrente a 5 años no se explica en función de su rol oncogénico.

Por otro lado, el gen **IRS1**, ubicado en la sexta posición del ranking, es un blanco del clúster mir-183 experimentalmente validado en estudios metabólicos en ratón (Xu and Wong 2008), y se ha visto sub-expresado en tumores de mama grado 3 pobremente diferenciado y metastásico (Schnarr, Strunz et al. 2000, Ma, Gibson et al. 2006, Gibson, Ma et al. 2007) y en cáncer de pulmón no a células pequeñas (Han, Cho et al. 2006). Sin embargo, otros estudios reportan que su sobre-expresión está asociada a una incidencia aumentada en la recurrencia y menor tasa de sobrevida (Rocha, Hilsenbeck et al. 1997, Koda, Sulkowska et al. 2005, Koda, Sulkowska et al. 2005). Además, existen escasos reportes donde se establece una regulación de IRS-1 oncogénico mediante miRs; en este sentido se ha mostrado que miR-126, supresor del crecimiento celular y reconocido supresor de tumores en cáncer de mama, regula negativamente a IRS-1 a nivel traduccional (Zhang, Du et al. 2008). De modo similar, en estudios de cáncer de colon confirman la inhibición de IRS-1 vía hsa-miR-145 in vivo e in vitro (Yin, Yan et al. 2013). Por último, La Rocca et al., reporta la interacción no solo de miR-145 con IRS-1 sino también de hsa-miR-182 y hsa-miR-96 miembros del clúster de miR-183 y su función como oncogen (La Rocca, Shi et al. 2009).

Así mismo, los genes TPM1, RHOB y SYNPO2 han sido propuestos como genes supresores de tumores en cáncer de mama, pulmón y meningiomas respectivamente (Mazieres, Antonia et al. 2004, Zhu, Si et al. 2007, Fevre-Montange, Champier et al. 2009).



Figura 20: Nivel de expresión de genes del concepto genes blanco de mir-183 correlacionados con recurrencia en el estudio de Taylor (Cancer Cell. 2010/07/13). Se indican en azul genes sub-expresados y en rojo genes sobre-expresados en estudios de recurrencia a 5 años. 185 muestras y 22238 genes analizados. El esquema lista los genes blanco predictivos de hsa-miR-183 que muestran una asociación significativa con el concepto 1 ordenados por el valor p decreciente. No recurrencia a 5 años (37 estudios). 2. Recurrencia a 5 años (24 estudios). Únicamente se listan los 20 genes con mayor valor de p. El Rank indica la posición del gen indicado, en el ordenamiento por p valor de todos los genes que muestran asociación al concepto en este estudio. El reporter denota la identidad de la molécula utilizada para la detección de ese gen en la plataforma utilizada (microarreglos).

Frente a este tipo de estudios, donde el número de genes es ciertamente inmanejable a escala laboratorio, decidimos estudiar la condición Normal vs. Tumoral. Además, este aspecto fue el que analizamos en las muestras clínicas (Figura 18). Para ello, seleccionamos los tres estudios en PCa de Arredouani, Varambally y Lapointe asociados al concepto Tumor vs. Normal.

La utilización de este criterio redujo la lista a un grupo de **50 genes** (Lista 3 de la Figura 17, datos no mostrados), de los cuales 11 genes son comunes a los tres estudios, 23 genes están presentes en dos estudios, y 16 genes en total son exclusivos en alguno de los tres estudios (Figura 21).

Estos 50 genes, están también representados en conceptos referidos a otros aspectos del tumor, donde por ejemplo, ITGB1 aparece en al menos tres conceptos y se encuentra en dos de los tres estudios seleccionados (Tumor vs. Normal). Esto apoya una posible relevancia de hsa-miR-183 en varios aspectos del PCa más allá del evento de transformación neoplasica en sí mismo. Por ejemplo, los genes SYNPO2, TPM1, IRS1, CLIP4, RHOB y CFL2 coinciden en los estudios de Tumor vs. Normal y de recurrencia de PCa a 5 años antes mostrados (Figura 20).



Figura 21: Diagrama de Venn de los 50 genes sub-expresados en base al concepto Tumor vs. Normal en PCa en Oncomine. Se identifican los 16 genes que están presentes en un solo estudio. Intersección de tres estudios independientes: **11 genes** (SYNPO2, RAB11FIP2, FRMD6, TPM1, ATP2B4, ENAH, NR3C1, KANK1, SEMA6D, AKAP12, SIN3A). Intersección de dos estudios independientes: **23 genes** (CLIP4, MBNL1, CDC42EP3, CFL2, PLEKHA3, NTN4, KCNMB1, FLRT3, CCND2, NFAT5, SFRS11, STK38L, PPP2R5C, FOXO1, ITGB1, KPNA4, BNC2, SNX1, TRIM2, NFE2L1, ENY2, PHF15, CPM).

Hasta ahora, en los estudios *in silico* realizados para la identificación de blancos, consideramos un solo aspecto de la modulación por miRs, esto es, la **regulación a nivel del ARNm**, que involucra procesos de de-adenilación del ARNm, decapping y posterior degradación.

Sin embargo, existe un segundo nivel de regulación reportado, donde el miR modula el producto proteico. Esta modulación es generada por la reducción en el inicio de traducción y el desprendimiento de los ribosomas, aunque estos últimos mecanismos son menos conocidos (Guo, Ingolia et al. 2010). Estos dos mecanismos de regulación (degradación de ARNm - inhibición de la traducción) no siempre están acoplados, es decir, hay reportes donde se detecta un descenso a nivel proteico, pero se mantienen los niveles a nivel del ARNm (Reiss, Wang et al. 2001).

Aun así, dada la amplitud de la lista inicial (360 genes) decidimos excluir en este estudio a los genes blanco predictivos que no mostraban una sub-expresión significativa del ARNm en PCa, excluyendo un total de 108 genes que eventualmente podrían haber presentado una modulación exclusivamente a nivel traduccional a través de hsa-miR-183.

Para evaluar la modulación a nivel traduccional de los 50 genes seleccionados por sub-expresión de ARNm, utilizamos los datos de inmuno-histoquímica publicados en el portal de libre acceso llamado "The Human Protein Atlas" (HPA) (<u>http://www.proteinatlas.org</u>). En esta base de datos, los niveles de expresión proteica son expresados en términos de expresión alta, media, baja y ausente.

En HPA encontramos que **33** de estos 50 genes, presentan una disminución de la expresión proteica en PCa respecto a la próstata normal. Dentro de este grupo, las proteínas NR3C1 y KANK1, cuya <u>expresión es alta</u> en el 100% de los estudios de inmuno-histoquímica realizados en células glandulares de próstata (CGP), presentan un descenso de la expresión proteica en el tejido tumoral de próstata (TTP).

Dentro de las proteínas que presentan <u>expresión baja</u> en el 100% de los estudios en CGP y en las que disminuye la expresión a valores de no detección en TTP (los valores representan el porcentaje de muestras de tejido tumoral de próstata donde no se detecta la expresión proteica) se encuentran: EPHA4 (27,27%); CACNB4 (63,63%); PLEKHA3 (79,16%); SYNPO2 (100%); SEMA6D (90,9%); SIN3A (33,33%); ZHX2 (13,6%); ITGB8 (54,16%); CLIP4 (72, 72%); KCNMB1 (83,33%); FLRT3 (30%); FOXO1 (50%); FRMD6 (58,33%) y ATP2B4 (37,37%).

Finalmente, entre las proteínas que presentan <u>expresión media</u> en el 100% de los estudios en CGP y que disminuyen su expresión a valores bajos e indetectables (o ausente) en los estudios realizados de inmunohistoquímica en TTP están C20orf177 (20%, 50%); IRS1 (36,36%, 9%); REV1 (33,3%, 8,33%); RSBN1 (83,3%, 8,33%); LAPTM4A (41,66%, 45,83%); STK38L (40%, 60%); PPP2R5C (25%, 50%); ITGB1 (20%, 0%); KPNA4 (9,09%, 18,18%); BNC2 (30%, 60%); SNX1 (10%, 0%); ENY2 (41,66%, 33,33%); PHF15 (8,33%, 66,66%); RAB11FIP2 (44,44%, 0%); ENAH (4,54%, 31,81%); AKAP12 (0%, 91,66%); YPEL5 (20%, 10%).

Por otro lado, dentro del grupo de los 17 genes que no se ven sub-expresados en TTP con respecto a CGP, hay tres tipos:

1. los que no presentan cambios en los valores de expresión en CGP con respecto a TTP: TPM1, RHOB, DTNA, CDC42EP3, CCND2, SFRS11,

2. los que aumentan su expresión en las muestras TTP con respecto a las muestras CGP: MBNL1, CFL2, NTN4, PRKCA, KIAA1324L, KIAA0355, TRIM2 y CPM, y por último,

3. los genes para los que no hay datos de estudios de inmuno-histoquímica: NFE2L1, TLE4 y NFAT5.

En resumen, de los 50 genes seleccionados por estar sub-expresados a nivel de ARN en tejido tumoral de próstata, encontramos que **33** muestran además una disminución de la proteína codificada (Lista 4 de Figura 17, datos no mostrados).

Estos datos permiten seleccionar aquellos genes cuya disminución en el ARNm tiene más probabilidad de tener un efecto sobre el fenotipo celular, puesto que posiblemente se traduzca en una disminución de los niveles de proteína sintetizada.

Finalmente, debido a la capacidad limitada de este proyecto, redujimos la lista de 33 a cuatro genes: **FOXO1**, **ITGB1, BNC2 y SYNPO**, en base a los datos disponibles en la literatura, al análisis de ontología génica que los postulan como fuertes candidatos a poseer funciones de supresores de tumores (Tabla 9).

A esta lista incorporamos también al gen **PDCD4** por su importancia como supresor en PCa y su previa validación experimental como gen blanco de hsa-mir-183 en carcinoma hepatocelular (Goke, Barth et al. 2004, Li, Fu et al. 2010) (Lista 2 de Figura 17, datos no mostrados). El gen PDCD4 es un gen supresor de tumores y codifica una proteína que se une al factor de iniciación de la traducción eucariota EIF4A1, impidiendo que se una al ARN, regulando así procesos como la apoptosis, ciclo celular y diferenciación. La importancia de PDCD4 se ha demostrado en una variedad de tumores, tales como en cáncer de pulmón, lengua, mama, piel, entre otros (Lankat-Buttgereit and Goke 2009).

El gen **TPM1**, fue seleccionado en función de los reportes bibliográficos como supresor de tumores, ya que a nivel proteico se mantiene incambiado (Lista 1, 2 y 3 de Figura 17, datos no mostrados).

Tabla 9. Genes identificados *in silico* (Lista 5 de Figura 17), que presentan disminución de la expresión proteica en muestras con PCa respecto a las muestras normales, en estudios de inmuno-histoquímica en HPA o antecedentes bibliográficos con

evidencia de funciones supresoras de tumores, que fueron seleccionados para el estudio de modulación transcripcional por mimic miR-183-5p.

NOMBRE DEL GEN	FUNCION	ANTECEDENTES
Synaptopodin 2 (SYNPO2)	Proteína que modula la forma y motilidad de podocitos y células nerviosas mediante la agrupación de la α -actinina. Alteran la afinidad o avidez de la α -actinina por la actina.	Supresor de tumores en meningiomas (<u>Fevre-</u> <u>Montange, Champier et al. 2009</u>)
Tropomyosin 1 (alpha) (TPM1)	Proteína de unión a actina, involucrada en el sistema contráctil y en el citoesqueleto de células no musculares.	Supresor de tumores en células de cancer de mama MCF-7. La sobreexpresión inhibe el crecimiento independiente del anclaje (<u>Zhu, Si et al. 2007</u>)
Forkhead box O1 (FOXO1)	Factor de transcripción relacionado al crecimiento miogenico y diferenciación	Supresor de tumores en cáncer de próstata, mama, linfomas (<u>Modur, Nagarajan et al. 2002</u>)
Basonuclin 2 (BNC2)	Marcador de stem cells y se piensa que es un factor de transcripcion que mantiene la capacidad proliferativa y previene diferenciacion	Polimorfismos del gen asociados a endometriosis y ovario (<u>Sundqvist, Falconer et al. 2011</u>).
Integrin, beta 1 (ITGB1)	Receptores de membrana involucrados en la migracion celular y reconocimiento en embryogenesis, homeostasis, de tejido, respuesta immune, y difusion metastasica de las células tumorales.	Reportada como supresor de tumores y oncogen (<u>Goel, Li et al. 2008</u>)
Programmed cell death 4 (neoplasic transformation inhibitor) (PDCD4)	Regulador general de la traducción. Inhibe el inicio de traducción y traducción dependiente de cap. Rol en apoptosis. Supresor tumoral. Inhibe la promoción del tumor inducida por transformación neoplásica.	Supresor de tumores, reportado en cáncer hepatocelular e identificado como blanco de hsa-miR- 183 (<u>Li, Fu et al. 2010</u>)

En la Figura 22 se resumen los datos de expresión proteica del HPA para esta lista de seis genes.



Figura 22: Datos de expresión proteica extraídos de estudios inmuno-histoquimicos publicados en HPA. Se muestran los valores en porcentaje de los estudios en muestras celulares de glándula prostática (cgp) y en las muestras de tejido tumoral prostático (ttp). Se indica en cada caso el nivel de expresión de la proteína (alta, media, baja y ausente), de los genes seleccionados *in silico*.

Los genes blancos de mir-183: IDH2, Dkk-3, SMAD4 y LRP6, con funciones en el crecimiento celular, migración, invasión y transición epitelial mesenquimatosa en glioma, próstata y retinoblastoma fueron publicados después de que se realizaran estos estudios (Tanaka, Sasayama et al. 2013, Ueno, Hirata et al. 2013, Wang, Wang et al. 2014). Por esta razón no se incluyen dentro de esta tabla.

Para este grupo de genes (Tabla 9), se determinaron los niveles de expresión invertidos de ARNm en la línea celular LNCaP y Du145 al sobre-expresar y bloquear miR-183-5p. Los resultados se muestran en Figura 25.

2.2. Identificación empírica de genes blancos de hsa-miR-183-5p: Ensayos de microarraglos

Este proyecto aborda la búsqueda de genes blancos de mir-183 a través de una aproximación teórica y una experimental complementaria. La segunda permite validar empíricamente los genes seleccionados en base a predicciones y a la bibliografía; pero por otro lado, posibilita el descubrimiento de nuevos genes blancos.

Para esto, analizamos los cambios en la expresión génica global luego de la transfección transitoria con las moléculas mimic miR-183-5p e inhibidor miR-183-5p en las líneas LNCaP y DU145. Luego de 24 hs de transfección, las células se lisaron y se extrajo el ARN. La integridad del ARN fue verificada en las dos líneas, detectando valores de integridad de ARN (RNA Integrity Number, o RIN) de 9,5 - 9,7 en todos los casos.

Debido a que la molécula mimic miR-183-5p, tiene la misma composición que el miR endógeno (Tabla 3), fue posible verificar su ingreso mediante RT-qPCR (Figura 23).



Figura 23. Cuantificación por RT-qPCR de miR-183-5p en LNCaP **(A)** o DU145 **(B)** transfectadas con mimic miR-183-5p e inhibidor miR-183-5p y expresada en fold change comparativo a los valores reportados con siRNA. Se utilizó el promedio de los genes normalizadores rnU6 y scarna17.

El ensayo indica que la transfección conduce a un incremento de miR-183 de aproximadamente 8 veces en la línea LNCaP (Figura 23. A.) y 2,5 - 3 veces en la línea DU145 (Figura 23. B.). Contrariamente, este ensayo no muestra un decremento de igual magnitud en los experimentos de inhibición e incluso en la línea Du145 no se detecta cambio.

Esto podría deberse a que el inhibidor no produzca la degradación del miR, de hecho, los inhibidores o antimiRs, son oligonucleótidos antisentido químicamente modificados (ASO) que silencian a los miRs y según su naturaleza, provocan la inhibición de la actividad o la degradación del miR (Esau, Davis et al. 2006). El silenciamiento se produce mediante mecanismos que involucran la hibridación complementaria y el bloqueo estérico. Sin embargo el destino del miR luego de que se une al inhibidor se desconoce y se sugiere que el mismo depende de la química de la molécula inhibidora y por lo tanto del grado de unión del dúplex (Krutzfeldt, Rajewsky et al. 2005, Esau, Davis et al. 2006, Krutzfeldt, Kuwajima et al. 2007, Elmen, Lindow et al. 2008, Fabani and Gait 2008, Torres, Fabani et al. 2011). Por ejemplo, las modificaciones (2'-F/MOE) no producen una reducción sustancial de los niveles de miR,

pero inhiben la actividad del miR in vivo. Además, los estudios de Northern blot y RT-qPCR que son comúnmente reportados para informar la inhibición del miR, presentan interferencias generadas por las modificaciones del inhibidor y su concentración (Torres, Fabani et al. 2011, Torres, Threlfall et al. 2011). Este "enmascaramiento" del miR, sugiere que aún para aquellos antimiRs mas efectivos, la medida de los niveles de miRs mediante Northern blot o mediante RT-qPCR no es informativo y por lo tanto la evaluación de la eficiencia del antimiR mediante la cuantificación del miR <u>no es un acercamiento recomendado</u>. Por lo tanto es probable que el inhibidor de Qiagen no conduzca a la degradación del miR.

Así mismo, el hecho de que en el mismo ensayo haya ingresado el mimic, hace pensar en una suerte similar en el ingreso del inhibidor. En este sentido, es interesante mencionar que Ueno et al. sí encuentran una reducción de miR-183 de entre 1 y 2 veces en las líneas PC-3 y DU145 respectivamente es sus experimentos de transfección transitoria de inhibidores de miR-183. Sin embargo, la cuantificación la realiza a 48 h de la transfección, y con un inhibidor químicamente diferente al de Qiagen (Ambion Anti-miR y control negativo de Ambion) y un método de transfección también diferente (siPORT Neo FX a concentraciones no comunicadas en trabajo) (Ueno, Hirata et al. 2013).

El ARN extraído de las dos líneas celulares transfectadas en el experimento de la Figura 23, fue purificado y enviado al Laboratory of Molecular Technology (LMT) en NCI-Frederick con el propósito de estudiar los cambios globales en la expresión génica, provocados por hsa-miR-183-5p mediante microarreglos de ARN.

Para esto se marcó el ARN y se hibridizaron chips de Affymetrix (GeneChip HG-U133A 2.0) siguiendo las instrucciones comerciales, para posteriormente escanear los resultados y extraer los datos de fluorescencia por sonda utilizando el programa Affymetrix GeneChip Operating Software (GCOS). A continuación, los datos obtenido en archivos .cel fueron importados al sistema de manejo y análisis de datos de NCI-NIH (MADB, https://madb.nci.nih.gov/) y normalizados utilizando métodos RMA (R/Bioconductor Cal). Con la finalidad de eliminar señales cercanas al ruido de fondo, se fijó un umbral mínimo de emisión en 3 para todas las muestras. Las listas normalizadas de forma independiente entre cada línea celular, fueron exportadas a Excel para posteriores cálculos. Finalmente, sustrayendo los logaritmos de las intensidades normalizadas de cada sonda, se obtuvieron listas de genes expresados diferencialmente en los tres experimentos realizados (inhibición, sobre-expresión y control).

Debido al alto costo de estos estudios, no se realizaron réplicas técnicas, sin embargo, la robustez de las normalizaciones internas de los microarreglos de Affymetrix permite sacar conclusiones preliminares. Además, la utilización de dos líneas celulares diferentes y el estudio de sobre-expresión e inhibición constituyen réplicas biológicas que le confieren confiabilidad a los resultados obtenidos.

Estudio de genes blancos experimentales por micrarreglos

Con el propósito de estudiar la modulación de genes blanco de hsa-miR-183 en los datos de los microarreglos, se seleccionaron específicamente los genes que cumplían con los siguientes criterios: 1. estar sobre-expresados o sub-expresados en las muestras transfectadas con inhibidor o mimic miR-183-5p respectivamente, y 2. presentar sitios blancos de unión para hsa-miR-183-5p en al menos 4 de los algoritmos de miRecords (lista de 360 genes *in silico*). Las listas de genes fueron generadas a partir de normalizaciones independientes de los experimentos de microarreglos de cada una de las dos líneas celulares analizadas. De este modo se obtuvieron cuatro listas de genes (Tabla 10).

TABLA 10: genes seleccionados modulados por hsa-miR-183-5p y que presentan sitios blancos para hsa-miR-183-5p. En verde se representan los genes que se repiten en al menos dos veces segun los criterios de selección utilizados.

1107.0.4		FOR FIELDS FALLS FOR FURCHE FOUND CARDA INC.
LISTAT	Genes de DU145 sobre-expresados en las	EGR1, EIF4AZ, EMIL4, EZR, ENDC3B, FOXP1, GNB1, IRS1, ITGB1,
	muestras transfectadas con inhibidor (21	KLHL28, LMO3, MBNL1, NFKBIZ, PICALM, PKP4, REV1, SAFB,
	genes)	SOBP, TMPO, USP47, ZMYM2
LISTA 2	Genes de DU145 sub-expresados en las	MBNL1, CFL2, TRAM1, RCN2, GNG4, SEL1L, LMBR1, PICALM
	muestras transfectadas con mimic (8 genes)	
LISTA 3	Genes de LNCaP sobre-expresados en las	SIN3A
	muestras transfectadas con inhibitor (1 gen)	
LISTA 4	Genes de LNCaP sub-expresados en las	GLUL, CNTNAP2, KLHL28, OSBPL8, ITGB1, MIA3, SERBP1, GNB1,
	muestras transfectadas con mimic (17 genes)	WDFY1, EZR, KIAA1324L, MBNL1, SEL1L, RSBN1, FNDC3B,
		ZMYM2, ING3

La unión de estas cuatro listas generó un grupo de **37** genes, de los cuales 9 genes se repiten al menos dos veces: **EZR, FNDC3B, ITGB1, GNB1, ZMYM2, KLHL28, PICALM, SEL1L** y **MBNL1** (Genes en verde de la Tabla 10). Los resultados del microarreglo mostraron un menor número de genes modulados en la muestra de LNCaP transfectada con inhibidor, sin embargo disminuyendo el umbral de expresión exigido en este experimento, obtuvimos un número más alto de genes candidatos (resultados no mostrados).

Interesados en estudiar la importancia de estos genes en PCa, analizamos su regulación en los estudios de PCa disponibles en Oncomine (Tabla 11).

Tabla 11: Meta-Análisis de la expresión de genes blanco predictivos de hsa-miR-183-5p en estudios genómicos de cáncer utilizando Oncomine. Los números indican el número de estudios que muestran una correlación positiva entre subtipos diferentes de cáncer (clasificadas por histología, evolución clínica, sitio primario o metastásico, genotipo, estadio, etc) y la sobreexpresión (rojo) o sub-expresión (azul) de los genes blanco de hsa-miR-183-5p predictivos con un p \leq 0.01 y odds ratio mayor a 2.



En la Tabla 11 se observa que los 38 genes seleccionados (lista de 37 genes anteriores mas PDCD4) se asocian con varios estudios de PCa, pero lo hacen tanto por sobre-expresión (ver comparacion normal y tumoral con 4 estudios en rojo en PCa) como por sub-expresión. Este resultado es menos contundente en relación a la hipótesis de que mir-183 actúe como supresor de tumor en PCa en comparación con el obtenido en el mismo analisis utilizando los blancos teoricos de mir-183 (Tabla 8).

Tabla 12: Características de los 38 genes seleccionados. La información de ARNm proviene del análisis de Oncomine, mientras la expresión proteica de cada gen en muestras tumorales de próstata relativo a las muestras normales de la glándula prostática, se obtuvo de la base de expresión proteica de libre acceso The Human Protein Atlas (HPA), indicando si aumenta, disminuye, no hay variación o si la expresión no está determinada para un gen especifico.

La función del gen y la asociación con enfermedades fue sintetizada a partir de la literatura (Pubmed y Gene summary -NCBI), la enciclopedia GeneCards (<u>www.genecards.org</u>)(Rebhan, Chalifa-Caspi et al. 1998) y la base de datos de UniProtKB/Swiss-Prot (columnas 3 y 4), La columna 5 describe los algoritmos que predicen cada gen para las isoformas anotadas (NM refiere al número de acceso a la secuencia). En la columna 6 los numeros indican la cantidad de estudios en cáncer de próstata donde se reporta la subexpresión (azul) y/o sobreexpresión (rojo) de cada gen; los super-índices indican el concepto asociado: ¹Adenocarcinoma de Próstata vs. Normal. Top 10% Sobre expresados. Wallace Prostate. Cancer Res. 2008/02/01, mRNA. ²Carcinoma de Próstata vs. Normal. Top 5% Sobre expresados. Varambally Prostate. Cancer Cell 2005/11/01, mRNA. ³Carcinoma de Próstata vs. Normal. Top 10% Sobre expresados. Welsh Prostate. Cancer Res. 2001/08/15, mRNA. ⁴Carcinoma de Próstata vs. Normal. Top 10% Sobre expresados. Welsh Prostate. Cancer Res. 2001/08/15, mRNA. ⁶Carcinoma de Próstata vs. Normal. Top 10% Sobre expresados. Luo Prostate 2. Mol. Carcinog. 2002/01/01, mRNA. ⁵Carcinoma de Próstata. Recurrencia a 1 año. Top 10% Sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2010/07/13, mRNA. ⁶Cultivo Celular Primario de Carcinoma de Próstata. Recurrencia a 1 año. Top 10% Sub expresados. Nanni Prostate. Mol. Cancer. Res. 2006/02/01, mRNA. ⁷Carcinoma de Próstata. Recurrencia a 3 años. Top 10% Sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2010/07/13, mRNA. ⁸ Carcinoma de Próstata. Recurrencia a 3 años. Top 10% Sobre expresados. Glinsky Prostate. J. Clin. Invest. 2004/03/01, mRNA. ⁹Carcinoma de Próstata. Recurrencia a 5 años. Top 10% Sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2010/07/13, mRNA. ¹⁰Carcinoma de Próstata. Recurrencia a 5 años. Top 10% Sub expresados. Glinsky Prostate. J. Clin. In vest. 2004/03/01, mRNA. ¹¹Cáncer de Próstata. Recurrencia a 5 años. Top 10% Sobre expresados. Glinsky Prostate. J. Clin. In vest. 2004/03/01, mRNA. ¹¹Cáncer de Próstata. Metástasis. Top 10% sub expresados. Varambally Prostate. Cancer Cell 2005/11/01, mRNA. ¹²Cáncer de Próstata. Metástasis. Top 10% sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2005/11/01, mRNA. ¹²Cáncer de Próstata. Metástasis. Top 10% sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2005/11/01, mRNA. ¹³Cáncer de Próstata. Metástasis. Top 10% sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2000/07/13, mRNA. ¹⁴Carcinoma de Próstata. Metástasis. Top 10% sub expresados. Taylor Prostate 3. Cancer Cell 2010/07/13, mRNA. ¹⁴Carcinoma de Próstata. Score de Gleason avanzado. Top 10% sobre expresados. Liu Prostate. Cancer Res. 2006/04/15, mRNA. ¹⁵Carcinoma de Próstata. Estadio N avanzado. Top 5% Sub expresados. Lapointe Prostate. J. Clin. Invest. 2004/03/01, mRNA. ¹⁶Carcinoma de Próstata. Estadio N avanzado. Top 5% Sobre expresados. Lapointe Prostate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2004/01/20, mRNA. ¹⁷Cáncer de Próstata. Top 10% sobre expresados. Su Multi –Cáncer. Cancer Res. 2001/10/15, mRNA.

1. Símbolo	2.Nombre	3.Función	4.Asociación con enfermedades	n 5.Algoritmos de predicción de siti blancos para hsa-miR-183	os 6. Expresión de ARNn (Oncomine)	n 7.Expresión proteica (The Human Protein Atlas) tumor/normal
CFL2	Cofilin	2 Regulación de los filamentos de actina. Component	te Miopatía congénita	NM 138638: miranda, pictar, pit	a. 45.3.11.12	SUBE
	(Musde)	principal de los filamentos citoplasmáticos intranucleares de actina.	e	rnahybrid NM_021914: miranda, pictar, pit	a,	
				mahybrid, targetscan		
CNTINAP2	Contactin Associated Protein-Like 2	Molécula de adhesión celular y receptores en sistem nervioso de vertebrados. Proteína de la familia d neurexinas. Media la interacción entre las neuronas y la gli durante el desarrollo del sistema nervioso, involucrad de la localización de canales de notacio.	ia Desordenes en e le neurodesarrollo, esquizofrenia epilepsia, autismo, retardo ía mental lo	ll NM_014141: miranda, pictar, pit a, mahybrid, targetscan o	36.12.15 36.12.15	SUBE
EGR1	Early prowt	h Miembro de la familia de proteínas nucleares C2H	2-Calcinosis turnoral familia	r NM 001964: miranda, mirtarget	2,117	SUBE
	response 1	tipos dedos de Zn. Actúa en la regulació transcripcional activando genes requeridos para l diferenciación y mitogénesis.	in Supresor de turnores en la la mayoría de neoplasias. En PC oncogen.	a pictar, pita, mahybrid, targetscan a	5673.11,12	
EIF4A2	Eukaryotic Translation Initiation Facto 442	Helicasa de ARN dependiente de ATP. Subunidad de complejo elf4F involucrado en el reconocimiento de or cap, requerida para la unión del ARNm al ribosoma.	el Linforna de células B difusa el largas y cólera	s NM_001967: pictar, pita, rnahybri targetscan	d, 24,17 45,3,11,15	SUBE
EML4	Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4	Modifica el ensamblaje dinámico de microtúbulos	Linforna de células anaplásicas gliorna	s, NM_019063: miranda, pictar, pit mahybrid, targetscan	ta, <mark>81248,16,13,14,16</mark> 2 ^{5,3}	BAJA
EZR	Ezrina	Tirosín kinasa citoplasmática, sirve de intermediari	ia Osteosarcoma condroblástico	v NM 003379: miranda, mirtarget	2.51.3.8.18.14	SUBF
		entre la membrana plasmática y el citoesqueleto d actina. Rol en la adhesión de estructuras en l superficie celular, migración y organización.	le histiocitoma fibroso la pleomórfico maligno. Implicada en varios tipos de tumore (PCa).	o pictar, pita, mahybrid, targetscan a s	36.11,15	
FNDC3B	Fibronectin Type III Domai Containing 3B	Proteína de membrana (Golgi) con domini n fibronectina. Regulador positivo de la adipogenesis.	o Hepatitis B Cáncer: oncogén y supresor d tumor (Fan. Chen et al. 2013)	NM_022763: pictar, pita, mahybri e targetscan	id, 1¹⁶ 2 ^{5,6}	BAJA
FOXP1	Forkhead Bo P1	x Factor transcripcional de la familia forkhead bo (FOX). Regulación de la transcripción de genes tejido- tipo- celular específicos durante el desarrollo y en l etapa adulta.	xx Retardo mental, desorden de y lenguaje, actúa como supreso la de tumores, ya que la región cromosómica donde est ubicado, esta deletada e varios tinos de tumores	el NM_032682: miranda, pictar, pil r mahybrid, targetscan n á n	ia, 14 55.70.11.02	BAIA
GUL	Glutamate-	Sintetasa de glutamina. Cataliza la síntesis de glutamir	a Deficiencia congénita d	e NM 001033044.	41.8.18.16	SUBF
	Ammonia Ligase	involucrada en la proliferación celular, inhibición d apoptosis y señalización celular.	le glutatión sintetasa	NM_001033056, NM_002065: miranda, mirtarget pita, mahybrid	35.12.15 2,	
GNB1	Guanine Nucleotide Binding Protei (G Protein Beta Polypeotide 1	Proteína heterotrimerica de unión de nudeótidos d guanina (proteína G), compuestos por tres subunidade n α , β , γ . β que regula a la α . Modulador de vario), sistemas de transducción de señales.	e Migraña familiar 25 26	NM_002074: miranda, pictar, pi rnahybrid, targetscan	ia, 31.14.17 1 ⁶	SUBE
GNG4	Guanine Nucleotide Binding Protei (G Protein Gamma 4	Proteína G moduladora de varios sistemas d transducción de señales. n),	le <u>E</u> nfermedad de Huntington	NM_004485: miranda, mirtarget pita, mahybrid	2, 2 ^{2, 17} 1 ³	NO DETERMINADA
ING3	Inhibitor C Growth Family Member 3	If Componente del complejo NuA4 HAT (acetiltransferas f, de histona) regulador de la transcripción. Inhibe o credimiento celular e induce apoptosis.	a Cáncer: supresor de tumor que el interacciona con p5: induciendo apoptosis. Carcinoma hepatocelular cáncer de cuello y cabeza.	e NM_019071: mirtarget2, pictar, pit 3 mahybrid 7,	a, 3 ^{73,17} 4 ^{5,73,11}	NO DETERMINADA
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1	Es fosforilada por el receptor de insulina tirosín kinasa Una vez fosforilada se une a proteínas específicas qu contienen dominios SH2 regulando procesos celulare metabólicos y mitogénicos.	a. Diabetes tipo II e susceptibilidad a la Resistencia es de insulina Supresor de turnores en cánce de maria (<u>Schnarr, Strunz et a</u>) 2000)	y NM_005544: miranda, mirtarget a pictar, pita, mahybrid, targetscan r I.	2, 1 ¹⁷ 4 ^{7,3,11,12}	BAIA
ITGB1	Integrin, Beta 1	Son receptores de membrana involucrados en la adhesión celular y reconocimiento en una variedad di procesos incluyendo la embriogénesis, homeostasis reparación de tejidos, respuesta inmune, y metástas de células tumorales. Proteínas heterodiméricas co sub-unidades o y 6/18/8 8 tinos respectivamente)	la Hipoxia cerebral la Hipoxia cerebral le (Rozzo, Chiesa et al. 1997, Li s, <u>Luna et al. 2010)</u> is m	NM_002211: miranda, mirtarget i, pictar, pita, mahybrid, targetscan	2, <mark>23,36</mark> 456,33,32	SUBE Y BAIA
KIAA1324L	KIAA1324-like ElG121- like	Proteína trans-membrana con dominios INFI involucrados en vías de señalización de inflamación apoptosis, autoinmunidad. Regulador de autofagi	R, Cáncer: oncogén (endometrio) n, ja	NM_152748: pictar, pita, mahybri targetscan	id, <mark>1²</mark> 2 ^{5,12}	SUBE
LKLHL28	Kelch-Like Family Membe 28	Inducido por estrogenos. Proteína con dominio kelch generalmente involucrad r en interacciones proteína-proteína. Posible adaptado de ubiquitin ligasas de culina.	o xr Cáncer: Supresores- (KIH16-CIL, KIH1 19-higado vejiga y pulmon. Oncogenes-KIH120-PCa KIH137- cerebro.	NM_017658: miranda, pit mahybrid, targetscan Y	ia, 14 1 ¹¹	NO HAYCAMBIO
LMBR1	Limb Development Membrane Protein 1	Miembro de la familia de proteínas de membran involucradas en la vía de SHH)	a Hereditarias: polidactilia	NM_022458: miranda, mirtarget pita, mahybrid	2, <mark>2^{4,13}</mark> 2 ^{5,11}	SUBE

LMO3	LIM Domain Only 3	Pertenece a la familia rombotina de oncogenes con Edominios LIM ricos en cisteínas, predominantes en	n Neuronitis 1 Leukemia de celulas T	NM_001001395: miranda, mirtarget2, pictar, pita, mahybrid, targetscan	1 ¹⁷ 3 ^{5,12,15}	NO DETERMINADA
	(Rhombotin-Like	cerebro.	Oncogén: neuroblastama	, NM_018640: miranda, mirtarget2,		
	2)		pulmón, colon.	pictar, pita, mahybrid		
MBNLI	Muscleblind- Like Splicing Regulator 1	Activador o represor del splicing de ARNm especificos. ; induce la inclusión de exones en el receptor de insulina (IR) en el musculo. Se une al ARN de IR	Ustrolia miotònica tipo 2 y i malaria Oncogén que activa splicin específico de EMT (Sen, Talukdar et al. 2010 Zaravinos, Kanellou et al. 2014)	y MM_207297: miranda, mirtarget2, pictar, pita, mahybrid, targetscan g MM_021038, NM_207296, NM_207295,), NM_207294, NM_207293, NM_207292: miranda, mirtarget2,	erran'n'r	SUBL
				pictar, pita, mahybrid		
MIA3	Melanoma Inhibitory Activity Family, Member 3	Requerida para la secreción del colágeno VII (COI7A1), carga el COL7A1 en transportadores. ;	, Melanoma y gigantismo	NM_198551: miranda, mirtarget2, pita, mahybrid	7123808437 1 ¹¹	SUBE
NFKBIZ	Nuclear Factor	Pertenece a la familia de ankirinas inducida por	Liposarcoma	NM 031419.	116	NO HAY CAMBIO
	Of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer In B-Cells Inhibitor. Zeta	: lipopolisacáridos. Con roles en la respuesta inflamatoria. r		M_001002474: miranda, mirtarget2, pita, mahybrid	35.7.8	
OSBRIS	Owsterol	Miambro de la familia de proteínas de unión a ovistero	opistozoującie	NM 001003712: miranda nictar nita	65,8,18,13,14,17	SUBF
U30FLS	Binding Protein- Like 8	Mientro de la familia de proteínas de unión a oxisterol (OSBP), grupo de receptores de lípidos intracelulares.	i opistorquiasis	<pre>rma_v01v0512: miranua, pictar, pita, rmahybrid, targetscan NM_020841: miranda, pictar, pita, rmahybrid</pre>	16	SUBE
PDCD4	Programmed	Regulador general de la traducción. Inhibe el inicio de	Supresor de turnores, reportado	- 0	61.2.3.8.18.17	BAJA
	cell death 4 (neoplastic transformation inhibitor)	traducción y traducción dependiente de cap. Inhibe la actividad helicasa de EIF4A. Rol en apoptosis. Supresor tumoral. Inhibe la promoción del tumor inducida por transformación neoplásica.	en cáncer hepatocelular identificado como blanco de hsa miR-183 (Li, 2010) y en cáncer do ovario (Wang, 2013; Wei, 2012)	e 	156.11.12	
PICALM	Phosphatidvlino	Proteína de ensamblaie de datrina, reduta a la datrina y e	Leucernia mieloide. leucernia	a NM 001008660: miranda. mirtarget2.	81,2,3,4,8,10,13,14	SUBE
	sitol Binding Clathrin Assembly Protein	; adaptador (AP2) a las membranas celulares.	linfoblástica aguda y linfornas Alzheimer.	s. pita, rnahybrid	556A.11.12	
PKP4	Plakophilin 4	Las proteínas tipo armadillo. Componentes de los	s Neuropatías	NM_001005476: miranda, mirtarget2,	71.3.4.8.18.14.17	BAJA
		desmosomas, involucradas en la función de cadherinas.	Cáncer:	pictar, pita, mahybrid, targetscan	26,11	
			Funciona en protrusione	s NM 003628: mirtarget2, pictar, pita,		
			metastáticas (marna)	rnahybrid		
RCN2	Reticulocalbin 2	Proteína de unión a calcio localizada en el lumen de	Syndrome de Bardet-Riedl	NM 002902: miranda, mirtarget2.	23.8	NO HAY CAMBIO
	EF-Hand Calcium Binding Domain	retículo endoplasmático.		pictar, pita, mahybrid, targetscan	3:en	
REV1	REV1,	Transferasa involucrada en la reparación del ADN.	Brucelosis	NM_016316,		BAJA
	Polymerase (DNA Directed)			NM_001037872: miranda, mirtarget2, pita, mahybrid	45,7,3,12	
RSBN1	Round		Hipotiroidismo y diabetes tipo 1	NM_018364: pictar, pita, mahybrid,	117	BAJA
	Spermatid Basic Protein 1	:		targetscan	15	
SAFB	Scaffold Attachment Factor B	Proteína de unión al ADN. Involucrada en la unión de la cromatina a la matriz nuclear. Involucrado en la regulación de la transcripción de la proteína de heat shock 27, actúa como co-represor del recentor de estrógenos.	a Turnorigénesis en marna a	NM_002967: pictar, pita, rnahybrid, targetscan	61.34.R.18,17	BAJA
SEL11.	Sel-1 Suppressor Of Lin-12-Like (C. Elegans)	Parte de un complejo de proteínas requeridas para la retrotranslocación de proteínas plegadas de forma incorrecta del lumen del retículo endoplasmático al citosol, las que son degradadas por el proteosoma.	a Carcinoma pancreático a l	NM_005065: miranda, mirtarget2, pita, mahybrid	71.234.18.14.17 45.11.12.15	SUBE
SERBP1	SERPINE1 MRNA Binding Protein 1	s Regulación de la estabilidad de ARNm 1	Aneurismo aórtico abdominal	NM_001018067: miranda, pita, rnahybrid, targetscan NM_015640: miranda, pictar, pita, rnahybrid	д13.45.8,18.19,16,17 Зб.11, 15	BAIA
SIN3A	SIN3 Transcription Regulator Family Member A	Represor transcripcional de genes de respuesta de MYC. Se asocia con desacetilasas de histonas (HDACs) regulando y ciclo celular, estabilidad genómica, etc.	. Sarcoma sinovial Síndrome de RETT Posible supresor de tumor PCa y otros canceres) <u>(Zhang</u> <u>Akinmade et al. 2005)</u>	NM_015477: miranda, pictar, pita, rnahybrid, targetscan y ,	211.12	BAIA
SOBP	Sine Oculis Binding Protein Hornolog (Drosophila)	: Proteína dedos de Zn nuclear, involucrada en el desarrollo 1 de la cóclea.) Retardo mental	NM_018013: pictar, pita, mahybrid, targetscan	2 ^{2,13} 1 ¹¹	BAIA
тмро	thymopoietin	Proteína nudear, con roles en el ensamblaje de la lamina nudear, y organización estructural de la envoltura nudear.	i Desorden fóbico Cáncer: Oncogén (hipotético)– Hematopoietico. meduloblastoma, pulmón	NM_001032283: miranda, mirtarget2, pita, rnahybrid, targetscan -	2 ^{5,15}	BAIA
TRAM1	Translocation	Proteína de múltiple paso en la membrana, parte de	l Fiebre hemorrágica	NM 014294: mirtarget2. pictar. pita.	51.3,18,13,14	NO HAY CAMBIO
	Associated Membrane Protein 1	retículo endoplasmático de mamíferos. Influye en la glicosilación y facilita la translocación de proteínas secretorias a través del retículo endoplasmático, regulando la región expuesta al citosol.	a s	rnahybrid, targetscan	111	
USP47	Ubiquitin Specific Peptidase 47	Proteasa especifica de ubiquitina, estabiliza a POLB. Actúa como regulador del crecimiento celular y la integridad genómica.	i Postulado como supresor de l tumor y oncogén (<u>Peschiaroli</u> <u>Skaar et al. 2010, Parsons</u> <u>Dianova et al. 2011</u>)	e NM_017944: pictar, pita, rnahybrid, j, targetscan ;	15	BAJA
WDFY1	WD Repeat And FYVE Domain Containing 1	Media el redutamiento de proteínas involucradas en el tráfico de membrana y la señalización por PI3P, localizada en endosomas. Autofagia	l Asociado diabetes tipo 2 e infarte a a miocardio.	o NM_020830: miranda, mirtarget2, pita, mahybrid	1 ¹³ 35.11,12	BAJA
ZMYM2	zınc Finger, MYM-Type	, proteina dedos de Zn que actúa como factor transcripcional. Es parte del complejo deacetilasa de histonas	r Lancer de medula ósea Posible supresor de turnor ZMYM2-FGFR1 fusión causa síndrome leucémico de tipo sten cell (SCLL).	NM_UU3453: miranda, mirtarget2, pictar, pita, rnahybrid, targetscan a NM_197968: miranda, mirtarget2, npictar, pita, rnahybrid	55.67.3.15	6AIA

Entre los 37 genes seleccionados del microarreglo, 3 de ellos (8%) son blancos de hsa-miR-183 validados y reportados en la literatura; EGR1, EZR, ITGB1. Este resultado sirve en cierto modo de validación de la aproximación realizada para la búsqueda de genes blanco por microarreglos de expresión génica.

A continuación discutiremos brevemente la significación de este grupo de genes.

EGR1, es un factor de transcripción dedos de Zn de 59kDa, que es inducido por factores de crecimiento, citoquinas y señales de estrés como la radiación, lesiones o estrés mecánico (Adamson, de Belle et al. 2003). Presenta propiedades de supresor de tumores en la mayoría de los tumores. En cáncer de pulmón a células pequeñas, se encontró que los tumores que presentaban bajos niveles de Egr1 estaban asociados a mal pronóstico y resistencia a la terapia. Está ausente o se expresa en bajas concentraciones en células tumorales de mama, pulmon y glia (Ferraro, Bepler et al. 2005). Es reportado como blanco del oncomiR hsa-miR-183 en sarcoma sinovial, rhabdomiosarcoma y cáncer de colon, mostrando funciones que favorecen la migración celular (Sarver, Li et al. 2010). Interesantemente, al contrario de lo que sucede en la mayoría de los tumores, EGR1 está sobre-expresado en PCa y constituye uno de los principales genes conductores de la enfermedad (Thigpen, Cala et al. 1996, Gitenay and Baron 2009). Los niveles del ARNm y proteína de Egr1 incrementan con el grado de malignidad (se correlacionan positivamente con el score de Gleason) de forma inversa con el nivel de diferenciación del carcinoma; esto indica que Egr1 está involucrado en la progresión del PCa. Se ha visto que Egr1 se une a AR en el citoplasma de células tumorales de próstata y favorece su translocacion al núcleo, uniéndose luego al sitio de respuesta a andrógenos (AREs) y estimulando la expresión de APE. Consistentemente con los datos reportados en bibliografía, Egr1 está sobre expresado en PCa en estudios de multi-cáncer de Su de 2001 en comparación a cáncer de vejiga, mama, colorectal, riñón, hígado, pulmón, ovario y páncreas (p ≤0.001) y en estudios de inmunohistoquimica en muestras de PCa (Tabla 12). Sin embargo, a pesar de la gran cantidad de trabajos a favor de una función oncogénica de Egr1 en PCa, los datos de expresión de ARNm en estudios de cáncer y específicamente de PCa en Oncomine muestran para este gen, un mayor número de trabajos en los que Egr1 está sub expresado, presentando incluso un patrón de expresión muy similar a IRS1 (Tabla 12). Si bien no comprendemos las bases de esta aparente contradicción en la expresión de ARNm y proteína, los metanálisis de microarreglos de PCa estarían validando el descenso de ARNm de Egr1 observada en nuestros experimentos con las líneas celulares. Finalmente, debido al establecido papel oncogénico de este gen en PCa, lo excluimos como gen candidato para nuestros siguientes análisis.

EZR esta descrito como blanco de hsa-miR-183 en cáncer de pulmón, líneas celulares de osteosarcoma, células de neuroblastoma y en cáncer de mama (Wang, Mao et al. 2008, Lowery, Miller et al. 2010, Zhu, Feng et al. 2012, Lodrini, Oehme et al. 2013). En todos estos estudios EZR esta aumentada en el tumor, confiriendo capacidad metastásica, lo que hace que hsa-miR-183 funcione como supresor de tumor en este escenario. La ezrina está reportada como un oncogen también en PCa (Pang, Fang et al. 2004, Valdman, Fang et al. 2005). Dado que nuestra hipótesis plantea que hsa-mir-183 es oncogénico, EZR también fue excluido como gen blanco candidato con relevancia clínica en PCa.

Actualmente se sabe que el proceso de adhesión celular juega un importante rol en el inicio y progresión del PCa y generalmente son las vías más moduladas en la tumorigénesis prostática (Gorlov, Byun et al. 2009), y dado la heterogenidad del PCa se da tanto la sobre-expresión como la sub-expresión de integrinas durante el proceso tumoral (Gorlov, Byun et al. 2009). Concordantemente con los reportes de la bibliografía, ITGB1 aparece sub-expresada en estudios de metástasis (p<0.01), y recurrencia a 1 año (p<0.001) de Taylor, en los estudios de Oncomine. Por lo tanto, el gen **ITGB1** se posiciona como un candidato muy interesante para funcionar como blanco fisiológio de mir-183 en PCa.

<u>A continuación discutiremos los resultados de los meta-análisis para los 37 genes seleccionados, se incluye a</u> PDCD4 en los análisis de HPA y Oncomine.

La Tabla 12 resume las principales características utilizadas como criterios para la posterior selección de genes blanco a partir del grupo de los 37 ya elegidos.

Globalmente, en lo que respecta a los cambios en la <u>expresión génica</u> (tejido tumoral en comparación con el tejido normal), los genes que están sobre-expresados, sub-expresados e incambiados en PCa son 14, 15 y 4 respectivamente.

Entre los genes que presentan un <u>incremento</u> de expresión proteica, los genes, EZR, GNB1, MIA3, OSBPL8, PICALM, SEL1L presentan más reportes de sobre-expresión que de sub-expresión a nivel de ARNm.

Contrariamente, para los genes CLF2, EGR1, EIF4A2, KIAA1324L, MBNL1 existen mayormente estudios que muestran un decremento de su ARNm. CNTNAP2, GLUL, LIMBR1 están sobre-expresados y sub-expresados en igual número de estudios. De los genes 15 que presentan <u>disminución</u> de su expresión proteica: EML4, PKP4, RSBN1, SAFB1, SERBP1, SOBP y ZMYM2 están presentes mayoritariamente en estudios de sobre expresión de ARNm, mientras que los genes que muestran un descenso de ARNm son: **FNDC3B, FOXP1, IRS1, REV1, RSBN1, SIN3A, TMPO y WDFY1.** Este último grupo de genes por lo tanto, son los que se ajustan más a la definición de genes supresores de tumor, en acuerdo a nuestra hipótesis.

En el caso de ITGB1, existen estudios que muestras tanto un aumento como una disminución en PCa por inmunohistoquimica. Sin embargo, aparece asociado en una mayor cantidad de estudios de sub-expresión con respecto a los estudios de sobre-expresión de ARNm, lo que favorece su función como supresor en PCa.

En 4 (KLHL28, NFKBIZ, RCN2 y TRAM1) de los 37 genes, no se detecta cambio a nivel de la expresión proteica. Sin embargo están sobre-expresados a nivel de ARNm en diferentes estudios de: PCa vs. Normal, N avanzado, recurrencia a 3 y 5 años, metastasis y score de Gleason de 8 y sub-expresados en estudios de metástasis, y recurrencia a 1, 3 y 5 años. Por último, si bien no están disponibles hasta el momento los estudios de expresión proteica para tres de los genes analizados en el microarray: GNG4, ING3 y LMO3, estos genes muestran una tendencia a estar sub-expresados a nivel de ARNm, en estudios de recurrencia a 1, 3 y 5 años, metástasis y PCa estadio N.

Los meta-análisis sobre bases de datos de expresión génica, no solo permiten establecer la dirección y la magnitud de la desregulación de un gen en cáncer, sino que también permiten especular sobre su función en la evolución de la enfermedad. Así, la comparación entre tejido normal y tumoral permite identificar la genes involucrados en la transformación neoplásica, mientras que otros estudios permiten analizar el efecto de un gen en etapas posteriores al establecimiento de la enfermedad, tal como la adquisición de invasibidad (comparación de tumor primario vs metástasis), la resistencia a la terapia (comparación en tejido normal y tumoral pacientes con o sin replaso), etc. La cuantificación proteica extraída del HPA, se reduce a la comparación en tejido normal y tumoral mientras que los estudios de microarreglos abarcan conceptos más tardíos en el desarrollo del PCa. Por este motivo nos interesó también estudiar su asociación específica la **presentación clínica** de enfermedad. Esto permitiría eventualmente identificar grupos de genes que interviene en una función específica de la biología tumoral.

Además, más allá de la comparación tejido normal y tumoral, los estudios interrogados en Oncomine permiten analizar el efecto de un gen en etapas posteriores al establecimiento de la enfermedad. De hecho, una proteína puede tener efectos diferentes, e incluso opuestos, en distintas etapas del desarrollo tumoral. Por estas razones, resulta interesante analizar las correlaciones obtenidas en estudios de Oncomine diferentes a las comparaciones normal vs tumoral, independientemente de los observado a nivel proteico en el HPA (que solo cuantifica muestras normal vs. tumorales). Dicho de otro modo, que una proteína no cambie su abundancia o esté sobreexpresada en el tejido tumoral en comparación con el tejido normal, no excluye que esta pueda contribuir a refrenar etapas posteriores de la evolución tumoral.

Cuando analizamos los 4 estudios de sobre-expresión PCa vs muestras <u>normales</u> (Tabla 12, ^{1, 2, 3, 4}) identificamos 2 genes presentes en los 4 estudios: **PICALM y SEL1L**; 7 genes presentes en 3 estudios: **EML4, MIA3, PDCD4 PKP4, SAFB, SERBP1 y ZMYM2**; 5 genes presentes en 2 estudios: TRAM1, EZR, CNTNAP2, ING3 y MBNL1; y 10 genes en un solo estudio: RCNE, ITGB1, GNG4, GLUL, GNB1, KIAA1324L, EIF4A2, FOXP1, KLHL28 y LMBR1.

Por otro lado, cuando comparamos los genes que presentan una sub-expresión en muestras de PCa con <u>recurrencia</u> al año del tratamiento (Tabla 12: ^{5, 6}), con respecto a aquellas muestras que no presentan relapso, observamos 13 de los 37 genes que presentan una sub expresión muy significativa con un p valor menor a 0,05 llegando incluso en algunos genes a valores de p≤ 0,001: EIF4A2, EML4, ING3, ITGB1, MBNL1, NFKBIZ, PICALM, REV1, RSBN1, SEL1L, USP47, ZMYM2 y FOXP1.

Los genes sub-expresados en muestras de PCa que presentan recurrencia a los 5 años (Tabla 12:^{9, 10}) son: 13 genes cuyos p valor es significativo y menores a 0,05: CFL2, EGR1, EIF4A2, EML4, FOXP1, GNG4, ING3, IRS1, MBNL1, NFKBIZ, PICALM, REV1, ZMYM2 (donde IRS1, NFKBIZ y EGR1 presentan un p<0,001). El hecho de que 7 de los 13 genes sub-expresados en tumores de pacientes recurrentes a 1 y 5 años (**EIF4A2**, EML4, **MBNL1**, **NFKBIZ** PICALM, **REV1**, ZMYM2) coincidan, podría sugerir su posible involucramiento en las mismas vías que confieren resistencia al

tratamiento. Sin embargo, los genes EML4, PICALM y ZMYM2 aparecen significativamente sobre-expresados en algunos estudios de recurrencia, lo que vuelve más compleja la comprensión de su función en la biología tumoral.

Por último, los genes EZR, GLUL, OSBPL8, PDCD4, PKP4, SAFB y SERBP1 son genes exclusivos de este grupo sobreexpresado, lo que iría en contra de su función como supresores de tumor en etapas avanzadas de la enfermedad.

Siguiendo con los análisis de los resultados de expresión obtenidos utilizando la base de datos de Oncomine, y con el objetivo de analizar aquellos genes que podrían resultar supresores de tumor por inhibición de la <u>invasibidad</u> de la célula tumoral, se analizaron los datos reportados en estudios de Vanaja, Varambally y Taylor (Tabla 12, ^{11, 12, 13}), donde se comparan muestras de PCa metastásico relativo a las muestras de PCa no metastásico.

Identificamos 11 genes coincidentes en los dos estudios de sub-expresión en muestras metastásicas (Varambally y Taylor): **CFL2, EGR1, FOXP1, IRS1, ITGB1,** MBNL1, **PDCD4,** PICALM, **SEL1L, SIN3A y** WDFY1. WDFY1, MBNL1 y PICALM están presentes también en estudios de sobre-expresión, siendo EML4, exclusivo del grupo de genes sobre-expresados en metástasis en relación a las muestras de glándula normal.

En conclusión, la relación entre la expresión de estos 38 genes analizados en el microarray (incluido PDCD4) y la clínica de los pacientes en estudios de Oncomine sugieren que algunos genes como PICALM, SEL1L, PDCD4, EMBL4 y MBNL1 podrían actuar como supresores de tumor en varias etapas o vías de la evolución tumoral, mientras que otros genes poseerían tal vez funciones más específicas en la transformación neoplásica (MIA3, PKP4, SAFB, SERBP1), la resistencia al tratamiento (ELF4, NFKB17, REV1, ZYMYM2) o la invasibidad (CFL2, EGR1, FOXOP1, IRS1, ITGB1, SIN3A, WAFY).

De la investigación biobliográfica, y más allá de los cuatro genes que estaban validados previamente como blancos de hsa-mir-183, se destacan CFL2 y SIN3A. Estos constituyen los dos únicos genes que presentan una disminución en los datos de expresión transcripcional en 4 y en 2 estudios respectivamente, coincidiendo ambos en los estudios de Metastasis de Varambally y Taylor, con un p valor menor a 0.05 y no presentan sobre-expresión en ninguno de los estudios analizados.

Sin embargo, con respecto a la expresión proteica ambos presentan comportamientos diferentes: los análisis inmuno-histoquimicos muestran un incremento y una disminución de la expresión de las proteínas CFL2 y SIN3A respectivamente en muestras tumorales respecto a las muestras de la glándula normal.

El incremento de **CFL2** a nivel proteico en muestras tumorales de PCa, y los estudios que reportan su sobreexpresión en líneas de cáncer de mama invasivo, la correlación positiva entre los niveles de expresión de CFL2 y de ZEB1, (reconocido oncogen en varios tipos de neoplasias) en tejido con cáncer de mama primario con el grado del tumor, y su rol crucial en la regulación de la actina, migración celular y capacidad invasiva, donde el incremento de CFL2 aumenta la movilidad celular (Luo, Wilson et al. 2013), lo posicionan dentro del grupo de oncogenes, y por tanto fue excluido del estudio. El gen **SIN3A** podría representar un blanco candidato de hsa-miR-183, además de la evidencia del microarray y de tener sitios blancos para este miR, está disminuído no solo a nivel de ARNm sino también a nivel de proteína en PCa. A nivel bibliográfico existen varios trabajos que lo postulan directa o indirectamente como un gen supresor de tumor en cáncer ya que colabora con la represión mediada por p53 y Rb (Suzuki, Ouchida et al. 2008) y en particular en PCa (Zhang, Akinmade et al. 2005).

Así mismo, la proteína **SAFB**, si bien presenta una disminución a nivel proteico en estudios de inmunohistoquimica, se ve sobre-expresada nivel de ARNm en seis estudios independientes, situación que podría explicarse por una inhibición de la traducción mediante la estabilización del ARNm. En este sentido, SAFB podría funcionar como un blanco de represión por mir-183. De hecho, este gen funciona como una proteína de unión al scaffold y ha sido propuesto como supresor de tumor en cáncer de mama (Hammerich-Hille, Bardout et al. 2010).

El gen **FOXP1** resulta también interesante para nuestro trabajo puesto que es un gen supresor de tumores en cáncer, incluido el PCa (Banham, Beasley et al. 2001, Taylor, Schultz et al. 2010, Krohn, Seidel et al. 2013) y pertenece a la familia de los factores de transcripción forkhead box, la cual incluye a FOXO1, que constituye un blanco validado del mir-183 en estudio (Myatt, Wang et al. 2010).

Dado que los microarreglos determinan los niveles de ARNm de los genes pero no informan sobre los niveles de proteína, al exigir como criterio de selección la disminución del ARNm, excluimos de este análisis potencialmente aquellos genes regulados exclusivamente a nivel traduccional por mir-183. Sin embargo, este criterio fue establecido para poder reducir la lista de genes candidatos a validar en el laboratorio.

Por otro lado, de los genes identificados en el microarreglo y seleccionados en función de su sobre-expresión y sub-expresión con inhibidor y mimic respectivamente, 8 de ellos (IRS1, ITGB1, CFL2, REV1, RSBN1, KIAA1324L, MBNL1 y SIN3A), coinciden con los estudios *in silico* realizados previamente (Figura 21).

También, se encontró coincidencia con algunos de los genes presentes en estudios de recurrencia a 5 años: **CFL2**, **EGR1**, **IRS1** y **NFKBIZ** detectados en los estudios *in silico* (Figura 20).

Esta concordancia, entre los resultados teóricos y los experimentales apoya la validez de nuestra estrategia experimental.

Selección de los genes IRS1 y FNDC3B para la evaluación de la interacción directa entre IRS1 y FNDC3B y hsamiR-183-5p

Los genes que mostraban un patrón similar en la expresión de ARNm (en un mayor número de estudios de subexpresión) y descenso de la expresión proteica fueron: FNDC3B, FOXP1, IRS1, REV1, RSBN1, SIN3A, TMPO y WDFY1. Los genes REV1, TMPO y RSBN1 no parecen estar asociados con PCa. Por el contrario, el gen WDFY1, funcionaría como supresor de tumor promoviendo la muerte celular, aunque su involucramiento en el proceso de autofagia, el cual promueve la sobrevida de células tumorales y metástasis aun es poco claro (Stanton, Dutta et al. 2013).

De la lista anterior seleccionamos a **FNDC3B** e **IRS1** para los estudios de de interacción directa con hsa-mir-183-5p. La elección de estos dos genes se fundamenta principalmente en que ambos han sido reportados como genes supresores de tumores en cáncer, y particularmente en la próstata y que muestran asociaciones fuertes en los estudios de meta-análisis, no solo con la transformación inicial sino también con las etapas posteriores del desarrollo de la enfermedad. Así mismo, como se verá en el apartado posterior, ambos genes cumplen funciones críticas en las 2 vías más representadas en los análisis de enriquecimiento de vías: **vía de señalización de insulina y adhesión celular**. No escapa a nuestra atención que IRS1 está reportado una sola vez en las listas generadas a partir de los datos del microarreglos (Tabla 10). Sin embargo, decidimos priorizar los criterios mencionados por encima de la replicación en las líneas celulares y los experimentos realizados, puesto que consideramos que los experimentos de microarrays fueron realizados en condiciones relativamente restringidas (dosis, tiempo, etc) y que es posible que pequeños cambios en los parámetros del experimento produzcan la modulación observada en los experimentos en los que no se logró ver un cambio.

De hecho, IRS1 es un gen que aparece sub-expresado mayormente en los estudios donde se evalúan diferentes subtipos de cáncer, específicamente en los estudios de recurrencia a los 3 ($p \le 0,005$) y 5 años ($p \le 0,001$). Además, en estos estudios aparece IRS1 con un cambio en el nivel de expresión (fold change) de 1-11 veces menor a los valores reportados en el sitio primario (Figura 24). Por último, su disminución se ve también en tumor metastático vs primario, lo que conjuntamente podría indicar un rol de IRS1 a nivel de la progresión de PCa y promotor de la metástasis.

Con respecto a FNDC3B, los análisis de expresión de Oncomine, reportan 2 estudios de sub-expresión asociados: estudios de recurrencia al año (Taylor y Nanni) con $p \le 0,05$ en ambos casos. A pesar del reducido número de estudios a favor de su sub-expresión en PCa, no descartamos una posible modulación por miR-183-5p a nivel proteico, tal como fue reportado en los trabajos de Fan et al, donde se ve un incremento de la expresión de FNDC3B a nivel proteico cuando se inhibe a hsa-miR-143 (Fan, Chen et al. 2013). Concordantemente con estos resultados, se ve una disminución en las muestras tumorales en relación a la glándula normal en estudio de inmuno-histoquimica reportados en HPA.



Figura 24: A. Genes que presentan sub expresión en muestras con Metástasis vs Sitio Primario de Cáncer de Próstata. 1. Sitio Primario (7 muestras). 2. Metástasis (6 muestras). Estudios de Varambally Prostate. Cancer Cell 2005/11/01, mRNA. Top 10% sub expresados: 12 genes: CFL2, EGR1, EZR, ING3, IRS1, MBNL1, PDCD4, PICALM, SEL1L, SERBP1, SIN3A Human Genome U133 Plus 2.0 Array. 19 muestras, 19574 genes analizados (p-valor 2.19E-4, odds ratio 4.2). **B**. Genes que presentan sub expresión en cultivos de Líneas Celulares Primarias de Cáncer de Próstata con recurrencia al año. 1. No recurrencia al año (17 muestras). 2. Recurrencia al año (5 muestras). Estudios de Nanni Prostate. Mol. Cancer. Res. 2006/02/01, mRNA. Top 10% sub expresados: 8 genes: CNTNAP2, GNB1, ITGB1, MBNL1, OSBPL8, PICALM, PKP4, SERBP1. Human Genome U133A Array. 30 muestras. 12624 genes analizados (p-valor 0.008, odds ratio 3.3).

IRS1: Según los antecedentes bibliográficos, las proteínas IRS (por **s**ustrato del **r**eceptor de insulina) fueron originalmente identificadas como sustratos del receptor de insulina, por lo que se estudio predominantemente su rol metabólico. Actualmente se conocen las funciones de los 3 miembros de la familia de IRS, y se ha visto que, aunque son homólogas (entre IRS-1 y IRS-2 35% de identidad en el extremo C-terminal), sus funciones son diferentes (Ma, Gibson et al. 2006). IRS1 tiene una función clave en la transmisión de señales desde la insulina y los factores de crecimiento relacionados (IGF), hacia las vías PI3K/Akt y MAP quinasa. Dentro de los antecedentes que vinculan a IRS1 con miR-183, encontramos los trabajos de Xu et al., donde sugieren que el clúster mmu-miR-183-96-182 (de ratón), está involucrado en la <u>vía de señalización de insulina</u>, interaccionando con al menos cuatro miembros de la vía, entre ellos IRS1, además de otras vías como la <u>de las integrinas</u>, la de IGF-1 y la remodelación de la cromatina (Xu and Wong 2008).

Sin embargo la asociación de IRS-1 con cáncer es aún escasa, Ma et al. reportan la activación por IRS-1 e IRS-2 de las vías PI3K y Erk1/2MAPK kinasas, implicadas en invasión de células tumorales y sobrevida, en varios modelos, incluido el cáncer de mama y que la unión de IRS-2 a IGF-1 no solo promueve la mitogénesis, sino que es necesaria para la metástasis en dicho cáncer (Ma, Gibson et al. 2006). Las funciones de IRS-1 y de IRS-2 parecen ser redundantes en el inicio y en el crecimiento del tumor, sin embargo presentan funciones divergentes en la generación de metástasis (Gibson, Ma et al. 2007). Los estudios de Ma et al., demuestran, que la perdida de expresión de **IRS-1** estimula drásticamente la metástasis en **cáncer de mama**, confiriéndole funciones **supresoras**

de tumores en esta neoplasia, y que la actividad de IRS-2 incrementaba en tumores mamarios deficientes de IRS-1. En este trabajo proponen una inactivación selectiva de IRS-1 en tumores metastasicos mamarios mediante un descenso de la fosforilación de tirosinas, que conduce al bloqueo de la interacción de IRS-1 con efectores downstream de la vía. Así mismo, la expresión de IRS-1 en las líneas de carcinoma de próstata LNCaP, produce un descenso de la motilidad celular (Reiss, Wang et al. 2000). Otros reportes indican que IRS-1 está sub-expresado en tumores de mama grado 3 pobremente diferenciado (Schnarr, Strunz et al. 2000) y en cáncer de pulmón (Han, Cho et al. 2006).

Se han publicado varios trabajos acerca de la regulación de IRS1 por miRs y su influencia en el fenotipo tumoral, lo que indica que IRS1 es un gen fuertemente sujeto a la regulación por este tipo de moléculas. Todos estos estudios proponen un **rol oncogénico** de **IRS-1**, por lo que reportan la inhibición de IRS-1 por miRs. En el caso de miR-126, supresor del crecimiento celular y reconocido supresor de tumores en <u>cáncer de mama</u>, se describe que regula negativamente a IRS-1 inhibiendo la transición de G1/G0 a S (Zhang, Du et al. 2008).En este tipo de cáncer se ha también reportado la sobre-expresión de IRS1 debida al silenciamiento por metilación de los promotores de miR-148a and miR-152, miRs que funcionan como supresores de tumor por represión directa de IGF-IR and IRS1 (Xu, Jiang et al. 2013). Por otro lado, hay estudios que proponen la regulación de IRS1 por mir-145; en <u>cáncer de colon</u> esto fue confirmado in vivo e in vitro (Yin, Yan et al. 2013) y se muestra el efecto en la modulación de las vías AKT y ERK1/2 y la expresión de HIF-1 y VEGF.

De modo similar, la Rocca et al, reportan la interacción no solo de miR-145 con IRS-1, sino también de hsa-miR-182 y hsa-miR-96 (miembros del clúster de miR-183) y su función como oncogén (La Rocca, Badin et al. 2009, La Rocca, Shi et al. 2009). Este par miR-blanco ha sido también validado en carcinoma hepatocelular, donde miR-145 es considerado supresor de tumor (Law, Ching et al. 2012), donde se muestra que afectan las cascada de señalización de IGF y regula la proliferación y la apoptosis. Otro trabajo muestra la misma regulación por mir-145 en cáncer de hígado y cáncer gástrico y sugieren un efecto la proliferación celular (Gao, Xing et al. 2013).

Por otro lado, los mecanismos intrínsecos de inactivación de IRS-1 incluyen muchos efectores de kinasas que son activados por señalización oncogénica. Estas kinasas incluyen mTOR, AKT, miembros de la familia PKC, ERK1/2, kinasa S6, IKKβ, AMPK, SIK y JNK.

En virtud de la represión observada a nivel d ARNm y de proteína observadas en PCa, nosotros planteamos un mecanismo hipotético similar al planteado para cáncer de mama metastático y en próstata para LNCaP, en el sentido de la naturaleza supresora de tumor de IRS1, donde hsa-miR-183-5p reprime a IRS-1 en PCa metastasico, pudiendo ser un candidato como marcador pronostico en la progresión de PCa y particularmente un predictor de metástasis en cáncer humano.

El segundo gen seleccionado, **FNDC3B**, está también relacionado con los eventos metastásicos en cáncer, y existen varios reportes al respecto.

La fibronectina FNDC3B (de fibronectin type III domain containing 3B), es miembro de la familia de fibronectinas, proteínas que regulan la motilidad celular, y esta subexpresada en células tumorales con alto potencial metastasico. Zhang et al. reportan que la sobreexpresión de hsa-miR-143 potencia la metástasis en cáncer hepático, modulando y reprimiendo la expresión de FNDC3B (Zhang, Liu et al. 2009). Los trabajos de Fan et al., muestran que hsa-miR-143 está sobre-expresado durante la diferenciación de las células madre de PCa, y promueve la metástasis reprimiendo a FNDC3B (Fan, Chen et al. 2013). Las células madre de cáncer están involucradas en la progresión de tumor y la metástasis y están asociadas a un incremento en la agresividad y metástasis in vivo. Coincidentemente, mir-183 fue inicialmente identificado como un gen que está sobreexpresado en las células madre de PCa antes de la diferenciación por suero (resultados no mostrados) en el modelo de prostatoesferas (Duhagon, Hurt et al. 2010). Por otro lado, y en concordancia con la disminución de la tasa proliferataiva que se observa en las células madre de cáncer, Bin Xu et al. han reportado que la sobreexpresión de hsa-miR-143 en próstata inhibe la proliferación de las células tumorales así como la migración, a través de la supresión de KRAS (Xu, Niu et al. 2011). El número reducido de estudios de microarreglos que reportan la sub-expresión de FNDC3B en PCa (Tabla 12) podría sugerir que el gen no está regulado fundamentalmente a nivel de la estabilidad del ARNm. En acuerdo con esto, los resultados mostrados por Fan muestran únicamente diferencias de expresión a nivel proteico, y no observan diferencias significativas en los valores de expresión de ARNm de FNDC3B luego de la inhibición del hsa-miR-143 (Fan, Chen et al. 2013), lo que indica que FNDC3 está sujeto a una regulación a nivel traduccional por parte de mir-143. Esto podría ser también válido para hsa-mir-183.

En virtud de estos antecedentes, es evidente que las funciones de FNDC3B así como la de IRS-1 son aún poco claras en PCa, pero hay evidencia que indica su posible función como genes supresores de tumores, con papeles tal vez específicos en la metástasis. Nuestra intención entonces, es poder generar nuevos avances al respecto.

Para lograr este objetivo, analizamos la posible regulación a nivel del transcripto endógeno por RT-qPCR y a nivel de la proteína a través de ensayos de gen reportero en las líneas LNCaP y DU145, en estudios de sobre-expresión y sub-expresión de hsa-miR-183-5p.

3. Modulación del ARNm de genes blancos candidatos

3.1.Genes blancos seleccionados in sílico: PDCD4, FOXO1, ITGB1 y TPM1

A continuación, se determinaron los cambios en los niveles de ARNm de los genes blancos candidatos a 24 hs de la sobre-expresión y el bloqueo de hsa-miR-183-5p mediante RT-qPCR. No se ensayaron los genes SYNPO2 ni BNC2, ya que el estudio de la eficiencia de los primers indicó que su ARNm es de muy baja abundancia en las líneas celulares utilizadas. Previamente, se comprobó la calidad de los oligonucleótidos diseñados para el análisis de modulación, mediante la determinación de la especificidad en la amplificación del blanco y de la eficiencia de la amplificación, utilizando la línea LNCaP. Las curvas de disociación mostraron un único producto para todos los amplicones (resultados no mostrados) confirmando la especificidad de la amplificación. Las eficiencias de amplificación obtenidas para los productos fueron similares: para los genes analizados: TPM1 (0,79), PDCD4 (0,63), FOXO1 (0,71), ITGB1 (0,69); para los genes normalizadores BACT (0,69), GADPH (0,61). La eficiencia de los primers diseñados resultó estar en aproximadamente 0,6-0,7, lo que está en el rango aceptable para este ensayo (Schefe, Lehmann et al. 2006). Si bien, las diferencias de eficiencia pueden ser mejoradas utilizando ecuaciones de ajuste (Schefe, Lehmann et al. 2006), dada la similitud de las eficiencias y el hecho de usar más de un normalizador, no se consideró necesario realizar el ajuste. Por otro lado, en el caso de SYNPO2 los valores de Ct reportados eran mayores a 30, por lo que decidimos no tomar en cuenta este gen para la cuantificación. En el caso de BNC2 no amplificó.

Se determinaron también las eficiencias de los genes IRS1 (0,71 y 1,03) y FNDC3B (0,92 y 1,02) en las líneas celulares LNCaP y DU145, y se analizó nuevamente la eficiencia de los dos genes normalizadores: GADPH (0,91 y 1,10) y BACT (1,09 y 1,09).

Los resultados de los experimentos para los genes seleccionados en base a estudios teóricos iniciales (PDCD4, FOXO1, ITGB1 y TPM1) (Figura 25. B. y E.) y los genes seleccionados a partir de los datos de microarreglos (IRS1 e FNDC3B) (Figura 25. C. y F.) se presentan en forma separada, puesto que fueron cuantificados en experimentos de RT-qPCR independientes, utilizando la misma metodología y los mismos genes normalizadores.



Figura 25: Efecto de hsa-miR-183-5p sobre los niveles de ARNm de genes seleccionados. En la columna de la izquierda y de la derecha se muestran los resultados para la línea celular LNCaP y DU145 respectivamente. Cuantificación por RT-qPCR de hsamiR-183-5p en LNCaP (**A**) o DU145 (**D**) transfectada con mimic-miR-183-5p e inhibidor-miR-183-5p expresada en fold change, comparativo a los valores reportados con siRNA. Se empleó a rnU6 como gen normalizador. **B.** RT-qPCR del ARNm de los genes PDCD4, FOXO1, ITGB1 y TPM1 seleccionados *in silico*, luego de la sobre-expresión con mimic miR-183-5p y bloqueo con inhibidor miR-183-5p relativo a los valores de expresión en las muestras control (siRNA) en la línea LNCaP (**B**) y DU145 (**E**). La normalización se realizo con el promedio de los valores de dos normalizadores (GAPDH y BACT). **C.** RT-qPCR del ARNm de los genes IRS1 y FNDC3B seleccionados a partir de los ensayos de microarray, luego de la sobre-expresión con mimic miR-183-5p v bloqueo (**C**) y DU145 (**F**). La normalización se realizo con el promedio de los valores de expresión en las muestras control (siRNA) en la línea LNCaP (**C**) y DU145 (**F**). La normalización se realizo con el promedio de los valores de expresión en las muestras control (siRNA) en la línea LNCaP (**C**) y DU145 (**F**). La normalización se realizo con el promedio de los valores de expresión en las muestras control (siRNA) en la línea LNCaP (**C**) y DU145 (**F**). La normalización se realizo con el promedio de los valores de dos normalizadores (GAPDH y BACT). Los niveles de significación estadística p < 0.05 o p < 0.01, por el test one way ANOVA y el Test de comparación múltiple de Bonferroni se inidican con uno o dos asteriscos respectivamente. Las barras de error representan el desvío estándar de triplicados técnicos en A y D y triplicados biológicos en B, C, E y F.

Se confirmó el ingreso de las moléculas a las células en cultivo mediante RT-qPCR (Figura 25. A. y D.), tal como fuera realizado en los experimentos utilizados para los análisis de microarreglos.

Los resultados muestran un incremento de miR-183-5p de hasta aproximadamente 177 veces en la línea LNCaP (Figura 25. A.) y un incremento de más de 107 veces en la línea DU145 (Figura 25. D.), relativo a los valores de miR-183-5p encontrados en las muestras control (transfectadas con siRNA). Si bien esta magnitud de cambio puede considerarse excesivo (aunque es frecuentemente utilizada en estudios de sobreexpresión de miRs (Lowery, Miller et al. 2010, Ueno, Hirata et al. 2013), dado que estas líneas celulares son tumorales y ya presentan un incremento del miR respecto a las líneas no transformadas, pensamos que la sobre-expresión debía ser fuerte para lograr ver un efecto. La falta de cambio de los niveles de inhibidor fue discutida previamente para el ensayo de microarreglos. Llama también la atención la diferencia de magnitud en el cambio observado en este experimento con respecto al del experimento para el microarreglo mostrado en la Figura 23 (200 veces); la misma podría ser explicada por un cambio en el lote de moléculas sintetizadas por Qiagen, puesto que los demás reactivos, así como los protocolos fueron idénticos.

Como se observa en la Figura 25. B., en la línea LNCaP no se observan diferencias estadísticamente significativas (One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Bonferroni, p < 0.05) en los cambios del ARNm de PDCD4, FOXO1, ITGB1 y TPM1 cuando se sobre-expresa o inhibe el miR con respecto a los valores de siRNA. Aun así, la modulación de los ARNm por el miR pueden ser pequeñas y no ser detectadas en este tipo de experimentos (Torres, Threlfall et al. 2011). Sin embargo, el gen PCDC4 muestra un cambio en la dirección esperada por la hipótesis en los dos experimentos, es decir, un incremento y un decremento del ARNm de PDCD4 cuando se incuba con inhibidor y mimic respectivamente.

En la línea DU145, la modulación de los genes analizados parece estar incrementada, observándose diferencias muy significativas (One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Bonferroni, p < 0.05) en los cambios del ARNm de PDCD4 (p-valor 0,0046), FOXO1 (p-valor 0,0031) e ITGB1 (p-valor 0,0030) (Figura 25. E.). No se observan diferencias significativas en los valores de ARNm de TPM1 al sobre-expresar ni bloquear hsa-miR-183-5p.

Nuevamente PDCD4 es el único gen que se comporta como lo prevee la hipótesis de trabajo en todos los ensayos. FOXO1 e ITGB1 cambian en respuesta al inhibidor en la dirección con que lo predice la hipótesis, lo que apoya la posibilidad de que constituyan blancos de represión a nivel de ARNm de hsa-miR-183-5p.

Por otro lado, si bien en ambas líneas se observa un comportamiento similar con respecto a la modulación de PDCD4, la magnitud y significación estadística de los cambios observados es diferente. Esto puede deberse a diferencias finas en la regulación de la expresión génica entre ambas líneas. Es interesante destacar también, que los cambios a nivel de ARNm observados en LNCaP muestran tendencias similares a los observadas en DU145 (ver por ejemplo ITGB1), lo que apoya la reproducibilidad del efecto.

Es posible que un cambio en las variables del experimento (cantidad y naturaleza de las de moléculas transfectadas, tiempo de incubación, etc) pueda producir un efecto más acentuado. Se ha visto que las transfecciones con precursores, en vez de moléculas maduras, mejoran los efectos inhibitorios, también el

aumento en el tiempo de incubación de las moléculas transfectantes a 48 y 72 hs respectivamente, producirían cambios de mayor magnitud (Ueno, Hirata et al. 2013).

Si bien durante este trabajo se realizaron algunos ensayos preliminares variando las condiciones del experimento, no se obtuvieron efectos significativamente diferentes a los aquí mostrados. Por lo tanto, aun se podría probar más condiciones experimentales y otras líneas celulares de próstata para poder excluir un efecto de hsa-miR-183-5p sobre la estabilidad de los ARNm seleccionados.

La mayoría de los cambios más significativos en la línea DU145 ocurren en respuesta al inhibidor, y para los genes PDCD4, ITGB1 y FOXO1 se dan en el sentido esperado por la hipótesis, es decir, conducen a la de-represión del gen blanco, podría estar indicando que el sistema es más susceptible a la inhibición que a la sobre-expresión. Sin duda los experimentos de sobre-expresión de miR-183 en líneas donde la expresión de este miR endógeno son bajas como en el caso de la línea de próstata normal RWPE1, tienen una mayor significancia biológica que el realizarlos en líneas que ya presentan una sobre-expresión del mismo, debido a que en estos últimos el efecto del miR en estudio sobre el blanco podría estar ya saturado (Ueno, Hirata et al. 2013). Sin embargo, para esa fecha no contábamos con líneas normales de próstata. En este caso los cambios en el incremento de miR serian superiores a los reportados en nuestros experimentos (de 5000 a 6000 veces más como los reportados por Lowery) (Lowery, Miller et al. 2010). Aunque incluso, un aumento en los niveles de pre-miR-183 de 5000-6000, no significan un decremento muy marcado del ARNm, donde la tendencia general es la visualización de cambios poco pronunciados a nivel de la expresión génica (Ueno, Hirata et al. 2013).

Por otro lado, nos llama la atención el hecho de que, para varios genes se observe una tendencia al aumento en el experimento con mimic respecto al control con siRNA, y que sin embargo, la comparación entre los experimentos de mimic e inhibidor (sin considerar el siRNA), continúa indicando que hay un incremento de estos dos genes con la inhibición de mir-183. A esto se suma el hecho de que, al menos para ITGB1, el microarreglo (que realiza una normalización global altamente robusta) había mostrado un descenso de sus transcriptos en DU145 con el mimic que no se comprueba aquí por RT-qPCR. Esto nos llevo a sospechar de la validez de los genes normalizadores que utilizamos en la RT-qPCR: BACT y GADPH. De hecho, cuando observamos como se comportan los genes normalizadores en los microarreglos, observamos una disminución de la expresion de BACT de dos veces en el experimiento de siRNA con respecto al mimic en la línea LNCaP y un incremento de BACT en el experimento de siRNA con respecto tanto al inhibidor como al mimic en el experimento con DU145. Este artefacto conllevaría a que el experimento de normalización con siRNA mostrara un cambio de magnitud diferente al esperado.

Por último, el hecho de que algunos de los cambios observados por RT-qPCR, no se hayan detectado en el microarreglo (por ejemplo PDCD4 no presenta cambios de expresión cuando se comparan los tres experimentos: con siRNA, mimic y con inhibidor), puede deberse a que para este último se exigió un umbral de cambio en la expresión de ARNm de 2 veces, y también a la mayor sensibilidad que tiene la RT-qPCR.

Es importante tener presente también la importancia en la sinergia de miRs que están dentro de un mismo clúster como es el caso de hsa-miR-183, por ello, y como se ha reportado la interacción IRS1 de los otros miembros del clúster, sería interesante evaluar la función integrada del clúster en este sentido. Seria interesante también realizar cuantificación a nivel proteico (Western blot), con el fin de determinar si su expresión esta modulada a nivel de la traducción y no tanto a nivel de la estabilidad del mensajero.

La posible implicancia de este gen en la progresión y desarrollo de metástasis en cáncer de próstata mediante la regulación transcripcional o traduccional por hsa-miR-183-5p podría ser confirmada en ensayos de migración e invasión (Transwell assay y Wound-healing assay): ensayos de Matrigel y de herida.

En este punto, es necesario aclarar, que por razones de estrategia experimental y de financiamento disponible, no se realizó el ensayo de western blot para cada uno de ellos. Por lo tanto, estos estudios no permiten descartar que hsa-miR-183 ejerza un efecto represor a nivel de la traducción de estas proteínas.

3.2.Genes blancos seleccionados experimentalmente mediante microarreglos: IRS1 y FNDC3B

Por otro lado, pudimos observar diferencias estadísticamente significativas en la línea **LNCaP** (One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Bonferroni, p < 0.05) en los cambios del ARNm de IRS1 cuando se bloqueaba al miR en estudio (p-valor 0,0353) (Figura 25. C.). Sin embargo, al igual que en los trabajos de Fan et al., no observamos un descenso ni un incremento significativo del ARNm de FNDC3B en las muestras transfectadas con mimic miR-183-5p y con el inhibidor miR-183-5p, de todas formas no descartamos su posible regulación a nivel traduccional (Fan, Chen et al. 2013) (Figura 25. C.).

Sin embargo, en la línea **DU145**, al igual que observábamos en los análisis de los genes PDCD4, FOXO1 e ITGB1, se observaron diferencias estadísticamente significativas (One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Bonferroni, p < 0.05) en los cambios observados para los dos genes, IRS1 (p-valor 0,0046) y FNDC3B (p-valor 0,0134), siendo más pronunciado el cambio para el gen IRS1 (Figura 25. F.). El hecho de que los cambios sean más notorios en DU145 están de acuerdo con los resultados del microarreglo, donde no se vio un cambio en LNCaP cuando se estableció un umbral de cambio de 2 veces respecto al experimento control (Tabla 10).

Sería interesante realizar algunos cambios en la estrategia experimental, en lo que se refiere al tiempo de incubación, probar aumentarlo, de 24hs a 48hs, etc., cambios a nivel de las dosis de transfeccion para ver si el efecto en la modulación es mayor a nivel de ARNm. Las diferencias cariotípicas y epigenéticas de ambas líneas celulares, probablemente establezcan diferencias en los controles de regulación de la expresión génica, lo que podría explicar las diferentes respuestas observadas en cada una de ellas.

4. Ensayo con genes reporteros para genes blancos candidatos

En base a los resultados obtenidos anteriormente por RT-qPCR, los datos reportados en la literatura de subexpresión en PCa, y los resultados del microarreglo, se seleccionaron **cinco genes** para analizar en más profundidad, mediante el ensayo de genes reporteros que llevan inserto el sitio blanco predictivo de hsa-miR-183 en su región 3' UTR: IRS1, FNDC3, ITGB1, FOXO1 y PDCD4.

Para ello contamos con la colaboración de varios grupos de investigación que identificaron genes blancos para hsa-miR-183. El grupo de González del Departamento de Oftalmología de la Universidad de Duke, en Carolina del Norte nos proporcionó el vector reportero dual luciferasa psiChECK2 de Promega Corp., Madison, WI que presentaba en 3'UTR del gen de *Renilla* el fragmento 3'UTR completo de ITGB1 (3'-ITGB1) y el vector psiChECK2 que contenía el reverso del fragmento 3'UTR (3'-ITGB1 -rev) como control negativo (Li, Luna et al. 2010). El grupo de Guttilla y White, del Departamento de Biología Celular y Biología Molecular, Microbiológica y Estructural de la Universidad de Connecticut, nos cedió el mismo plásmido, pero en este caso presentaba en 3'UTR del gen de Renilla el sitio 1 que corresponde al fragmento que va del nucleótido 204 al 492 de la 3'UTR de FOXO1, el sitio complementario a hsa-miR-183 y con un oligonucleótido que carecía del sitio endógeno de unión al miR predicho como control negativo (Guttilla and White 2009). Por último, más recientemente solicitamos y recibimos el plásmido reportero con la región del 3'UTR de PDCD4 que contiene el sitio blanco predictivo de reeconocimiento de hsa-mir-183 (wt y mutante) a Xiaofei Zheng de la Beijing Institute of Radiation Medicine, en China (Li, Fu et al. 2010). Este último aún no ha sido utilizado.

Los vectores con las secuencias FOXO1 e ITGB1 fueron amplificados y secuenciados en Macrogen Inc. El vector reverso para ITGB1 no contenía la secuencia esperada y la secuencia de los vectores que contenían el fragmento de la 3' UTR de FOXO1, no pudo ser secuenciada con oligonucleotidos específicos, por lo que, interpretamos que no correspodía al esqueleto de psiChECK2 y por tanto, este gen (FOXO1) no fue incluido en el estudio de reporteros, por lo que se eliminó del estudio y se decidió realizar un estudio preliminar con el vector que contenía la secuencia sentido del 3'UTR de ITGB1 (Figura 26).

hsa-miR-183 3'-UCACUUAAGAUGGUCACGGUAU-5' || :::|||||||| ITGB1(BP:1033-1054) 5'-CTTACTTTGAGTTAGTGCCATA-3' Energy: -17.54 kcal/mol В СААСАG CTC TCACC TACG CG AG (CT 140 TT TG AG TTAG TGCCAT) CAG ACCAC TG TA TG TTTAC TTCT (AG ACCAC TG TA TG TTTAC TTCT)

А

Figura 26: A. Secuencia blanco para hsa-miR-183-5p del 3'UTR del gen ITGB1. Imagen tomada de (Li, Luna et al. 2010). **B.** Fragmento de la secuencia del vector reportero dual luciferasa psiChECK2 de Promega que presenta la secuencia blanco para hsa-miR-183-5p. Obtenida de Macrogen Inc.

Seguidamente analizamos la interacción de miR-183-5p con la secuencia 3'UTR de ITGB1. Según los análisis predictivos de secuencias blanco para miRs (TargetScan 6.2, versión junio 2012), las tres isoformas del gen ITGB1 (NM_033668, NM_002211 y NM_133376 de 1324, 1252 y 1252 nt respectivamente) presentan dos sitios blancos para hsa-miR-183 conservados en las posiciones 695-701 y 623-629 del 3'UTR y se ha visto que las vías en donde

participa (ej. adhesión celular), generalmente son las vías más moduladas en la tumorigenesis prostática, estando sub-expresado en PCa (Gorlov, Byun et al. 2009). ITGB1 es así mismo, blanco potencial de los tres miembros del cluster de miR-183 (miR-182; Pita y RNAhybrid, miR-183; miRanda, MirTarget2, PicTar, Pita, RNA hybrid y TargetScan, miR-96; miRanda, Pita, RNAhybrid). Nuestra estrategia de análisis predictivo lo detecta como uno de los genes blancos candidatos interesantes en PCa. Además, los estudios de microarreglos, muestran un cambio de los niveles de este gen de acuerdo a lo esperado por la hipótesis si fuera blanco de regulación de hsa-mir-183 (Tabla 10). De hecho, la interacción directa entre ITGB1 y hsa-mir-183 ya fue descrita previamente en células HeLa (Li, Luna et al. 2010), si bien en ese modelo los autores plantean que el miR funciona como un gen supresor de tumor que inhibe la invasividad y la migración celular, y es expresado preferentemente durante la senescenia.

Para los ensayos con genes reporteros, se transfectaron las moléculas de mimic o inhibidor junto con el plásmido reportero para ITGB1 en la línea LNCaP y se midió la actividad luciferasa en el cultivo a las 24hs de la transfección. Los resultados mostraron una leve disminución de la actividad reportera con el mimic, aunque no se observó cambio con el inhibidor (Figura 27). Según los resultados obtenidos mediante los análisis estadísticos utilizando "Kruskal-Wallis test" y "Dunn's Multiple Comparison Test" con un p valor de <0,05 (One-way ANOVA GraphPad Prism 5.00.288), no se vieron diferencias estadísticamente significativas entre las muestras transfectadas con mimic y con inhibidor relativo al control (siRNA).



Figura 27: Ensayo de luciferasa en células de la línea LNCaP transfectadas con psi-CHECK2 que contiene el 3'UTR de ITGB1. Muestras con psi-CHECK2 y reactivo de transfección (mock), con psi-CHECK2 y siRNA (control negativo), con psi-CHECK2 y mimic y con psi-CHECK2 e inhibidor, a 24 hs de la transfección. Las barras de error representan el desvío estándar de triplicados técnicos.

Para los dos ensayos presentados en este punto, los resultados muestran parcialmente el efecto esperado y no lo contradicen. Se realizaron varios análisis previos modificando algunos aspectos del experimento, como: variaciones a nivel de la concentración de mimic e inhibidor, distintos tiempos de incubación luego de la transfección (resultados no mostrados), sin embargo no obtuvimos los resultados esperados. Cabe destacar que el pequeño efecto en la actividad reportera se observa en el experimento de mimic y no en el de inhibidor, lo que concuerda con la identificación de ITGB1 solamente en el experimento de mimic del microarreglo para esta línea

celular (Tabla 10). Finalmente, estos análisis fueron realizados en la línea LNCaP por lo que resta realizarlos en la línea DU145. Es de esperar, según los análisis previos, que la modulación en DU145 sea más marcada.

Las construcciones que contenían el sitio blanco para hsa-miR-183-5p del 3'UTR de los genes IRS1 y FNDC3B fueron diseñadas y sintetizadas con la colaboración de Cesar Fuziwara en el marco de una pasantía en el Laboratorio de Tiroides de la facultad de Ciencias Biomédicas de la Universidad de San Pablo (USP, Brasil), bajo la dirección de la Dra. Edna Kimura (Yamashita, Geraldo et al. 2013).

Para el ensayo con genes reporteros de IRS1 y FNDC3B se mandaron sintetizar oligonucleótidos complementarios de 23 bases que formaron el fragmento del 3'UTR de estos genes que contiene las secuencias del sitio blanco predicitivo para hsa-mir-183 (salvaje y mutante), o un sitio blanco mutado en nucleótidos escenciales para el reconocimento por este miR. El fragmento producto de la hibridación, fue clonado en los sitios de restricción del vector comercial pmirGLO, como se describió en materiales y métodos. Los productos de ligación se utilizaron para transformar bacterias competentes y se aislaron dos clones (uno por gen blanco) para analizar por restricción enzimática, utilizando un sitio de restricción Notl insertado en la secuencia de los oligonucleótidos sintéticos (Figura 16). El análisis por geles de agarosa muestra un cambio en la migración de los plásmidos digeridos que sugiere la presencia del sitio de restricción (datos no mostrados) y que por tanto indica la presencia del inserto. Los dos clones mostrados fueron enviados para secuenciar a Macrogen Inc..

En el tiempo de espera de los resultados de la secuenciación, se realizaron ensayos preliminares de los genes reporteros con luciferasa. Para esto se co-transfectó transitoriamente la línea HEK293 T con el plasmido pmirGLO-3'UTR- FNDC3B o pmirGLO-3'UTR- IRS1 con el mimic-mir-183, y el siRNA. Se ensayaron los plásmidos con la secuencia intacta (wt) y mutante (mut) en el esquema que se indica en la Figura 28. Los resultaron no muestran ningun cambio significativo de la actividad del gen reportero en los ensayos realizados.



Figura 28: A. Ensayo de luciferasa a las 24 hs de la transfección con pmirGLO conteniendo el sitio 3'UTR del gen FNDC3B salvaje (wt) y mutada (mut). Se muestran los resultados para la transfeccion com 10nM de mimic miR-183-5p y siRNA en

células HEK293T. **B.** Ensayo de luciferasa a las 24 hs de la transfección con pmirGLO conteniendo el sitio 3'UTR del gen IRS1 salvaje (wt) y mutada (mut). Se muestran los resultados para la transfección com 10nM de mimic miR-183-5p y siRNA en células HEK293T. Las barras de error representan el desvío estándar de triplicados técnicos.

Despues de estos ensayos se recibieron las secuencias enviadas a Macrogen Inc. Los vectores secuenciados no presentaron la inserción esperada, por lo que la falta de modulación del gen reportero con la sobre-expresión de hsa-mir-183 observada queda justificada. Como perspectiva se propones secuenciar otros clones para seleccionar aquellos que tengan insertos.

5. Análisis del efecto global de mir-183 sobre la expresión génica

5.1. Genes seleccionados en estudios de microarreglos

Se realizó una aproximación de la función de hsa-miR-183 estudiando ontología génica y vías de señalización asociadas a través de las herramientas de **WebGestalt** ("**WEB**-based**GE**ne**S**eTAnaLysisToolkit") (Duncan et al., 2010). En esta base de datos, se puede investigar el enriquecimiento en base a la ontología de genes utilizando KEGG (KyotoEncyclopedia of Genes and Genomes), vías comunes (Wikipathway), análisis de blancos de factores transcripcionales, miRs asociados a los blancos en estudio, análisis de las vías de interacción proteica, entre otras. En estos estudios se combinan datos de variados recursos bibliográficos y bioinformáticos que contribuyen a comprender el posible significado de cambios en grandes grupos de genes.

5.1.1. Estudio del efecto de mir-183 en la expresión génica global

Realizamos primeramente, un análisis global del enriquecimiento de vías canónicas para el grupo de genes identificados en el microarreglos, que estaban modulados por miR-183 (sobre-expresados o sub-expresados).

De un total de **1301 genes** (resultado de la intersección de los estudios del microarreglos sin tomar en cuenta la presencia o ausencia de sitios predictivos para hsa-miR-183), **953 genes** fueron identificados con IDs únicos por el programa Webgestalt, por lo que el estudio se realizó sobre este set. El análisis se realizó con los parámetros por defecto del programa: nivel de significación ("Top 10" identifica las 10 vías que presentan los valores de p más significativos), el test estadístico (Hipergeométrico, y test de ajuste), pero modificamos a 10 el número mínimo de genes por categoría, para poder establecer aquellas vías con importancia a nivel biológico, ya que algunas categorías funcionales con un alto nivel de significación pueden presentar uno o pocos genes.

Los <u>procesos biológicos</u> más representados son los procesos metabólicos (515 genes), regulación biológica (436 genes), comunicación celular (224 genes), organización celular (207 genes), localización (205 genes), procesos multicelulares (177 genes), respuesta a estímulos (166 genes), procesos del desarrollo (164 genes), apoptosis (80 genes), proliferación celular (66 genes), reproducción (40 genes), crecimiento (33 genes), 201 genes no clasificados.

Dentro de las categorías de <u>funciones moleculares</u>, las más representadas son proteínas de unión (547 genes), de unión a iones (229 genes), de unión a ácidos nucleicos (213 genes), de unión a nucleótidos (184 genes), con actividad hidrolasa (136 genes), transferasa (109 genes), actividad reguladora de la transcripción (91 genes), transducción (77 genes), reguladora de la actividad enzimática (56 genes), transportadora (47 genes), de unión a cromatina, a lípidos, reguladores traduccionales, estructurales, entre otras menos representadas.

Dentro de los <u>componentes celulares</u> más representados se encuentran: el núcleo (378 genes), membrana (327 genes), complejos macromoleculares (249 genes), lumen (183 genes), citosol (116 genes), citoesqueleto (97 genes), retículo endoplasmático (72 genes).

Mediante estudios de enriquecimiento de las **vías KEGG** se identificaron 37 genes que integran vías del cáncer (aprox. 4%), 16 genes involucrados con Cáncer de Próstata (aprox. 1,6%), 19 involucrados a la vía de señalización de la insulina (aprox. 2%), 18 en vía de funcionamiento del spliceosoma (aprox. 1,9%), 18 involucrados en ciclo celular (aprox. 1,9%), 17 en la meiosis del oocito (aprox. 1,7%), 22 en adhesión focal (aprox. 2,3%), 17 en vías de señalización de neurotropinas (aprox. 1,7%), 22 en la regulación del citoesqueleto de actina (aprox. 2,3%) y 14 vinculados a la maduración del oocito mediada por progesterona (aprox. 1,4%) (Tabla 13).

Tabla 13: Vías KEGG enriquecidas en los genes modulados por mir-183 en los experimentos de pérdida y ganancia de función en PCa. C: número de genes de referencia en la categoría, O: número de genes en el set de genes y en la categoría, E: número de genes esperados en la categoría, R: proporción de enriquecimiento (O/E), rawP: p valor del test hipergeométrico, y adjP: p valor ajustado por el test de ajuste múltiple. **WebGestalt** ("**WEB**-based**GE**ne**S**e**TA**na**L**ysis**T**oolkit") (Zhang, Kirov et al. 2005).

KEGG	Nombre de genes	Datos estadísticos
Cáncer	CCNE2PIAS4MAPK8HSP90B1RALBP1ITGA6IGF1RBAXHSP90AA1STAT 3MSH6TGFB1S0S2RHOAAKT1BIRC56PIK3R1FHE2F3EGFRDAPK3FAS GRB2TPRJAK1CRKBIRC5IL8STAT1ITGB1GSK3BARWNT8BCDK2ARNTL AMC2CTBP1	[
Cáncer de Próstata	CCNE2PDPK15OS2HSP90B1AKT1BIRC56PIK3R1E2F3EGFRGRB2IGF1F ARGSK3BHSP90AA1CREB1CDK2	<pre>2 C=89;O=16;E=1.87;R=8.55;rawP=5.41e-11;adjP=8.39e-10</pre>
Vías de señalización de la Insulina	PDPK1MAPK8SOS2RHOQAKT1PRKAB2PIK3R1SOCS2CALM3GRB2IRS 1PPP1R3BCRKPRKCIPPP1CBGSK3BRPS6KB1PHKA2PRKACB	C=137;O=19;E=2.88;R=6.60;rawP=9.68e-11;adjP=1.00e-09
Spliceosoma	PRPF38BPRPF31TRA2ASF3B1HSPA8PLRG1LSM4SNRPE220CDC5LRB M17RBM25PHF5ALSM5TRA2BPRPF4PRPF6HNRNPMCDC5L	C=128;O=18;E=2.69;R=6.69;rawP=2.38e-10;adjP=1.48e-09
Ciclo celular	TGFB1CCNE2CDC25AANAPC5CFL25E2F3YWHAEWEE15MC3CDC27C DC14BGADD45BMAD2L1ANAPC10G5K3BYWHAZCDK2RAD21	C=128;O=18;E=2.69;R=6.69;rawP=2.38e-10;adjP=1.48e-09
Meiosis del oocito	CCNE2FBXW11ANAPC5SMC3CDC27IGF1RMAD2L1ANAPC10ADCY1C ALM3ARPPP1CBYWHAZYWHAECDK2PRKACBFBXO5	C=114;O=17;E=2.40;R=7.09;rawP=2.93e-10;adjP=1.51e-09
Adhesión focal	PDPK1MAPK8SOS2RHOAAKT1PPP1R12AITGA6ARHGAP5PIK3R1ACT N1ITGB5DIAPH1EGFRGRB2CRKIGF1RPAK2ITGB1PPP1CBG5K3BACTB LAMC2	C=201;O=22;E=4.22;R=5.21;rawP=3.59e-10;adjP=1.59e-09
Regulación del citoesqueleto de actina	SOS2ITGALRHOAPPP1R12AIOGAP1ITGA6PIK3R1EZRACTN1ARPC4M YH10ITGB5DIAPH1EGFRCFL2CRKPAK2ITGB1PPP1CBRDXACTBADCY1 2	C=216;O=22;E=4.54;R=4.85;rawP=1.42e-09;adjP=4.96e-09
Vías de señalización de neurotropinas	MAPK8SOS2RHOAAKT1PIK3R1CALM3YWHAEPSEN1FOXO3IRS1GRB 2CRKPRKCDBAXPTPN11GSK3BYWHAZ	C=126;O=17;E=2.65;R=6.42;rawP=1.44e-09;adjP=4.96e-09
Maduración del oocito mediada por progesterona	MAPK8CDC25AANAPC5AKT1CDC27IGF1RBIRC56PIK3R1MAD2L1AN APC10ADCY1HSP90AA1CDK2PRKACB	C=86;O=14;E=1.81;R=7.74;rawP=3.34e-09;adjP=1.04e-08

El estudio de vías enriquecidas luego de la sobre-expresión/bloqueo de un miR, puede arrojar luz en la búsqueda de genes blancos y la comprensión de las vías moleculares y celulares que el mismo modula. El grupo de Zhang realizó un análisis *in silico* exploratorio de los módulos de vías que correlacionan miRs-ARNm, en dos subtipos tumorales: PCa primario y PCa metastásico, encontrando un enriquecimiento de las vías de señalización de TGF- β y de señalización de proteínas acopladas a **proteína G** (PSGR2). Encuentran también una sobre representación de genes de adhesión focal en PCa primario (Wang, Wu et al. 2012). Así, las kinasas de **adhesión focal** son importantes mediadores para la proliferación celular, sobrevida celular y migración celular, y están involucradas en la progresión en PCa (Figel and Gelman 2011). Gorlov et.al encontraron que los genes con expresión diferencial en PCa estaban presentes en clúster que involucraban vías similares o incluso iguales a las reportadas por Zhang: como la de adhesión celular basadas en integrinas, la señalización por integrinas, el **citoesqueleto de actina**, la muerte celular, las vías de **migración** celular y las vías de TGF β , Wnt y p53, aparecen como las principales rutas asociadas con la progresión del PCa (Gorlov, Byun et al. 2009).

De forma concordante, nuestros estudios son similares a los encontrados por Gorlov, Figel, Zhang y Xu, donde las vías de adhesión focal, señalización Wnt, EGFR1, regularización del citoesqueleto de actina, moléculas de adhesión y vías de señalización asociadas a proteínas G y migración transendotelial, son las vías más representadas entre las tres asociaciones.

Más específicamente, en relación a mir-183, el grupo de Xu muestra que el clúster mmu-miR-183-96-182 en ratones, controla 12 vías de señalización, que incluyen la remodelación de la cromatina, las vías de las **integrinas**, IGF-1, y la vía de señalización de **insulina**, interaccionando con cuatro miembros de la vía, entre ellos IRS1 (Xu and Wong 2008). El hecho de que nuestros experimentos identifiquen también estas vías, apoya la posible modulación de mir-183 sobre las vías de la insulina y las integrinas en PCa.

En el <u>estudio global</u>, tres de los procesos identificados que asocian al menos 10 genes de este grupo son, cáncer, cáncer de próstata y la vía de señalización de neurotropinas. Este enriquecimiento era esperable debido a la naturaleza de las líneas analizadas, LNCaP y DU145, ambas líneas tumorales de próstata.

El enriquecimiento de la **vía de neurotropinas**, es consistente con el hecho de que la próstata es la mayor fuente de neurotropinas (NGF) fuera del Sistema Nervioso, donde NGF es capaz de estimular el crecimiento epitelial prostático. Las neurotropinas, son una familia de factores tróficos (NFG, BDNF, NT-3, NT-4), involucrados en la diferenciación y sobrevida de las células neuronales. La vía neurotopinas/tirosinkinasas está regulada por la conexión a una serie variada de cascadas, incluyendo las vías MAPK kinasas y PI-3 kinasas. Las *células musculares* de la próstata producen factores de crecimiento NFG y juegan un rol significativo en el desarrollo y mantenimiento de la homeostasis de la próstata. Las NGF son secretadas por las células del estroma, pero no son un factor de sobrevida adquirida (Isaacs, De Marzo et al. 2002). El hecho de que mir-183 funcione en la próstata como un oncogen sugiere que podría estar reprimiendo un represor la misma, y así estimular la producción autócrina de NGFs.

5.1.2. Estudio del efecto de mir-183 sobre la expresión de genes blanco directos

Finalmente realizamos los mismos estudios de enriquecimiento de vías a partir de los 37 genes que presentaban sitios predictivos de unión a hsa-miR-183 (miRecords) y estaban sobre-expresados (\geq 1) o sub-expresados (\leq 1) en las líneas DU145 y LNCaP cuando se sobre-expresa o inhibe mir-183. Al igual que en el estudio de perfiles de expresión en Oncomine, incorporamos el gen PDCD4 al estudio. En el estudio de ontología génica y enriquecimiento de las vías se utilizaron los parámetros por defecto en el programa Webgestalt (Nivel de significación: Top10, Test estadístico: Hypergeometric, MTC: BH, Mínimo: 2).

En los estudios de ontología génica, los 38 genes se agruparon en los siguientes grupos de <u>procesos biológicos</u>: procesos de regulación biológica (23 genes), procesos metabólicos (18 genes), respuesta a estímulos (11 genes), genes vinculados a procesos del desarrollo (9 genes), a procesos de comunicación celular (9 genes), proceso multicelular (8 genes), procesos de organización de componentes celulares (7 genes), vinculados a la localización (7 genes), proliferación celular (3 genes), apoptosis (3 genes), involucrados en el crecimiento (2 genes), 2 genes en procesos de multi-organismos y 7 genes no clasificados.

Dentro de la categoría de <u>funciones moleculares</u>, los 38 genes se agruparon en: funciones de unión a proteínas (26 genes), unión a iones (10 genes) y a ácidos nucleicos (10 genes), con actividades transductoras (7 genes), con actividad hidrolasa (3 genes), de unión a nucleótidos, regulación de la transcripción, actividad transferasa, de unión a lípidos (2 genes) y 3 genes no clasificados.

Cuando analizamos la categoría de los <u>componentes celulares</u>, encontramos que de los 38 genes analizados, 16 genes están presentes a nivel de la membrana, 16 genes son nucleares, 10 genes participan en complejos macromoleculares, 10 genes están presentes en el lumen, 5 genes se ubican en el retículo endoplásmico, 5 genes presentes a nivel del citosol, 4 genes de membranas internas, 3 genes en el citoesqueleto, 3 genes a nivel de proyecciones celulares, el resto de los genes involucrados en el aparato de Golgi, cromosomas, vesículas, endosomas, mitocondrias, y no clasificados.

El estudio de enriquecimiento de las **vías KEGG** identificó 6 vías canónicas en las cuales estaban presentes al menos dos genes del grupo analizado, las mismas se detallan en la Tabla 14. Se hace evidente que ITGB1 es el gen fundamental para la definición de mayoría de las vías, puesto que constituye una molécula central en el movimiento celular que involucra al total de las vías listadas. Le sigue EZR, que también codifica para una proteína muy relevante en el movimiento de las células epiteliales.

Tabla 14: Vías KEGG enriquecidas en los 38 genes con sitios blanco predictivos para mir-183 reprimidos en los experimentos de pérdida y ganancia de función en PCa. C: número de genes de referencia en la categoría, O: número de genes en el set de genes y en la categoría, E: número de genes esperados en la categoría, R: proporción de enriquecimiento (O/E), rawP: p valor del test hipergeométrico, y adjP: p valor ajustado por el test de ajuste múltiple. **WebGestalt** ("**WEB**-based**GE**ne**S**e**TA**naLysis**T**oolkit") (Zhang, Kirov et al. 2005).

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

Dado que existen diversas clasificaciones de vías de señalización, también utilizamos las de Wikipathway. Como resultado identificamos 7 vías canónicas en las cuales estaban presentes al menos dos genes del grupo analizado, las mismas se detallan en la Tabla 15. Puede verse que solo una de ellas resulta compartidas con KEGG (citoesqueleto de actina por EZR y CLF2), mientras que GNB1 y GNG4 se indican como vías de calcio, de contracción o de proteínas G, en lugar de identificar la señalización por quemoquinas. Wikipathway a su vez identifica IRS1, y lo vincula a la vía de la insulina y la adipogénesis, lo que las posiciona en primer lugar del ranking.

Tabla 15: Vías Wikipathway (bioinfo.vanderbilt.edu/wg_gsat) enriquecidas en los 38 genes con sitios blanco predictivos para mir-183 reprimidos en los experimentos de pérdida y ganancia de función en PCa. C: número de genes de referencia en la categoría, O: número de genes en el set de genes y en la categoría, E: número de genes esperados en la categoría, R: proporción de enriquecimiento (O/E), rawP: p valor del test hipergeometrico, y adjP: p valor ajustado por el test de ajuste múltiple. Nivel de significación: top10, test estadístico: hipergeometrico, MTC: BH, mínimo: 2 genes. **WebGestalt** ("**WEB**-based**GE**ne**S**e**T**AnaLysis**T**oolkit") (Zhang, Kirov et al. 2005).

Vías Wikipathway	Nombre de genes	Datos estadísticos
Vía Insulina	<u>IRS1 EGR1</u>	C=160;O=2;E=0.13;R=14.91;rawP=0.0080;adjP=0.0080
Adipogenesis	IRS1 MBNL1	C=133;O=2;E=0.11;R=17.94;rawP=0.0056;adjP=0.0080
Regulación del Calcio en las células cardiacas	<u>GNB1 GNG4</u>	C=148;O=2;E=0.12;R=16.12;rawP=0.0069;adjP=0.0080
Vías de contracción y relajación del miometrio	<u>GNB1 GNG4</u>	C=156;O=2;E=0.13;R=15.30;rawP=0.0076;adjP=0.0080
Vías de señalización de proteínas G	<u>GNB1 GNG4</u>	C=98;O=2;E=0.08;R=24.35;rawP=0.0031;adjP=0.0080
Señalización de estrógenos	<u>GNB1 SIN3A</u>	C=76;O=2;E=0.06;R=31.40;rawP=0.0019;adjP=0.0080
Regulación del citoesqueleto de Actina	EZRCFL2	C=143;O=2;E=0.12;R=16.69;rawP=0.0064;adjP=0.0080

Los análisis de enriquecimiento (Webgestalt) hasta aquí realizados, señalan que mir-183 modula moléculas de dos vías principalemente: <u>la vía de adhesión focal</u> y <u>la vía de la insulina</u>. En base a la literatura y a los resultados de los meta-análisis de actividad de mir-183, podemos plantearnos dos mecanismos por los que miR-183 podría estar contribuyendo a la tumorigénesis de próstata. El primero sería en el inicio del tumor y estaría tal vez vinculado en la desestabilización de la membrana basal mediante la participación en las vías de adhesión focal. En el segundo mecanismo, miR-183 estaría participando a nivel de la vía de insulina y/o en el eje IGF-IR (receptor también de INS) promoviendo así la progresión y metástasis del PCa.
5.2. Posibles mecanismos de acción de hsa-miR-183:

5.2.1. Actividad de miR-183 en el inicio del tumor

Las adhesiones entre las células y la matriz extracelular juegan roles importantes en los procesos biológicos, incluyendo la motilidad, la proliferación celular, la diferenciación celular, la regulación de las expresión génica y la sobrevida celular. En los puntos de contacto entre la matriz extracelular y las células, hay estructuras especializadas de adhesión focal, donde las fibras de actina se anclan a receptores transmembranas de la familia de **integrinas**. Algunos de los constituyentes de estas adhesiones focales, participan en la unión de receptores de membrana y el citoesqueleto de actina y otros son moléculas de señalización incluyendo kinasas y fosfatasas. La señalización de integrinas culmina con la **reorganización del citoesqueleto de actina**, requisito para los cambios en la forma celular y motilidad y la expresión génica (Moreno-Layseca and Streuli 2014). Estos eventos son similares a los desencadenados a través de la unión de factores de crecimiento a sus receptores, dejando entrever la interrelación entre las vías de señalización mediadas por factores de crecimiento y adhesión.

Se ha demostrado que la **adhesión celular** puede modular los efectos de la señalización de andrógenos, y que existe un cambio en la expresión de integrinas durante la transición del tejido normal al tumor de próstata primario, proponiendo una hipótesis donde los eventos de inicio de PCa son la expresión disminuida de genes de colágeno tipo IV y otros genes que codifican ligandos de integrinas. Esta disminución está asociada a la edad del paciente y provoca la acumulación de integrinas libres y la activación de la muerte celular asociada a integrinas (apoptosis celular mediada por caspasa 8). Para escapar a esta respuesta, la célula suprime la expresión de integrinas, elevando la migración celular y la proliferación celular y desorganizando la histología de la próstata e incrementando la malignidad del tumor. Así, la hipótesis del colágeno de la tumorigénesis prostática sugiere que la disrupción de la adhesión celular (basada en la integrinas) con la matriz extracelular, inicia el desarrollo de cáncer de próstata (Gorlov, Byun et al. 2009).

Las integrinas son heterodímeros que consisten en subunidades α y β . Se han descrito hasta el momento 24 heterodímeros. Las mismas juegan un rol importante en la alteración del crecimiento celular y progresión del tumor, mediante la regulación de la expresión génica, la apoptosis, la adhesión celular, la proliferación, la migración y la angiogénesis.

La vía de señalización de integrinas se ha visto desregulada en varios procesos celulares, incluyendo el PCa, y se la ha asociado con su progresión hacia un estadio avanzado (Gorlov, Byun et al. 2009). Sin embargo, debido a la heterogenidad de esta neoplasia, tanto la sobreexpresión como la sub-expresión de integrinas han sido reportadas (Goel, Alam et al. 2009). Con respecto a la <u>expresión de las integrinas</u> se ha visto que la **mayoría** de las subunidades de integrinas están **disminuidas en PCa**, mientras que β1C está sub-expresada específicamente en adenocarcinoma de próstata y β1A es necesaria para el crecimiento independiente del anclaje y está aumentada en adenocarcinoma de próstata, aunque se desconoce su nivel de expresión en metástasis.

La integrina β 1 se localiza en los contactos focales y media la reorganización del citoesqueleto en las células normales, habiéndose reportado que su desregulación promueve la progresión del cáncer (Goel, Li et al. 2008, Goel, Alam et al. 2009). La integrina β 1 es requerida para la localización, expresión y función del IGF-IR, que participa en la sobrevida y proliferación celular tumoral. Los mecanismos propuestos para este efecto involucran el reclutamiento de adaptadores a la membrana plasmática, incrementando la concentración de adaptadores próximos al receptor. Se ha visto que los citodominios de la integrina β 1 juegan un rol importante en mediar la asociación de β 1 con IRS-1 entre otros. Específicamente se ha visto la **interacción de \beta1 con IRS-1**. Por otro lado, se ha mostrado que la integrina β 1 no incrementa la motilidad celular (Goel, Li et al. 2008, Goel, Alam et al. 2009). Gorlov menciona que la transfección de ITG β 1, la cual esta sub-expresada en PCa, induce la adhesión celular a la laminina y previene el crecimiento del tumor (Goel, Fornaro et al. 2004, Gorlov, Byun et al. 2009).

Sin embargo en PCa, la función y las modulación de las subunidades de integrinas parecen ir en contra y a favor de la progresión de PCa, por lo que se necesitan más investigaciones al respecto (Goel, Li et al. 2008).

En lo referente a la relación de las integrinas con la <u>adhesión celular</u> en PCa, se ha visto que la asociación de las integrinas, en especial la integrina β1A, con IGF-IR regula la adhesión celular a proteínas de membrana en respuesta a la estimulación por IGF, sin afectar directamente la proliferación ni el crecimiento tumoral (Flecha discontinua de Figura 31). En este sentido el complejo β1A-IGF-IR, mediante la inhibición de la adhesión celular a la membrana basal, permite que la masa tumoral se expanda e invada (Goel, Fornaro et al. 2004). Por el contrario, **β1C**, una variante citoplasmática de β1A que no se asocia con IGF-IR, incrementa la adhesión celular a la laminina (Goel, Fornaro et al. 2004). Esta variante, causa la disrupción del complejo β1A-IGF-IR, e inhibe la fosforilación de tirosinas de IGF-IR estimulada por IGF, la proliferación celular y el crecimiento tumoral, mediante la asociación con Gab1, quien mediante la unión a Shp2, presenta un rol negativo en la sobrevida celular (Goel, Fornaro et al. 2004). Gab1 activa PI3K, una molécula que media la adhesión celular inhibiendo la fosforilación de tirosinas de IRS-1. Shp2 y PI3K median los efectos de β1C-Gab1 en la adhesión celular.

Por otro lado, en PCa, al igual que el cáncer de mama, se ve una disrupción de la membrana basal, que afecta a los componentes como la laminina. El tejido glandular normal de próstata presenta β1C y LN-1 (laminina), y observándose una disminución de las dos moléculas durante la progresión tumoral (Fornaro, Lovecchio et al. 2001), que indica que la disrupción de la membrana basal y la desregulación de la expresión de las variantes de integrinas, son eventos coordinados en la transformación neoplásica (Goel, Li et al. 2008).

De esta forma, en función de los resultados obtenidos en los microarreglos y las funciones de las integrinas y de mir-183 en PCa descritos en la literatura, podría especularse la inhibición de la integrina 61C por hsa-miR-183, como mecanismo oncogénica que conduce a la disminución de la adhesión celular, aumentando la proliferación y crecimiento tumoral. Nosotros no observamos una afectación del crecimiento in vitro mediada por mir-183 en las líneas celulares analizadas, sin embargo, la disminución de la adhesión celular podría estar potenciando la motilidad celular con la concomitante metástasis asociada en los tumores prostáticos, que queda por ser estudiada. Esto último, plantea una interesante perspectiva consistente en el estudio del efecto de mir-183 en la metástasis de PCa.

Es importante señalar que la secuencia analizada del gen de ITGB1 en los estudios de qPCR y luciferasa fue la isoforma A (que según bibliografía es una isoforma oncogénica en PCa) y por lo tanto esto podria explicar los resultados discordantes sobre todo en los ensayos de reporteros. Sin embargo no descartamos la relevancia de la via de las integrinas en el proceso tumoral y específicamente de la isoforma C.

5.2.2. Actividad de miR-183 en la progresión del PCa avanzado

La vía de señalización de la insulina está representada en los tres estudios, donde aparecen con una frecuencia alta IRS1, PRKCA y EGR1, mencionados anteriormente. Por otro lado, aparece FOXO1 (factor de transcripción regula la homeostasis en la respuesta al estrés oxidativo), que es un factor blanco de la respuesta a insulina. La insulina, regula el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas, y promueve la división y el crecimiento celular a través de sus efectos mitogénicos, mediante dos vías principales de transducción: la vía de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3K) y la vía de las kinasas activadas por mitógenos (MAP kinasas). GRB2 es parte de esta última cascada, que incluy a SOS, RAS, RAF y MEK, activando proteínas kinasas activada por mitogénos (MAPK) y produciendo una respuesta mitogénica mediante la transcripción de genes. La insulina también puede activar a IR o IGF-IR con menor eficiencia.

La vía de la PI3K es el principal mecanismo por el que la insulina ejerce sus funciones en el metabolismo de la **glucosa y de lípidos**. La activación de IR por la insulina produce la fosforilación y la activación de **IRS**, y esta última activa a PI3K. Finalmente PI3K activa a Akt la que regula varios de los efectos metabólicos de la insulina a través de la fosforilación de sustratos como por ejemplo la fosforilación e inactivación de la enzima GSK3, favoreciendo la activación de la glucógeno sintasa y el aumento en la **síntesis de glucógeno**.

Existen muchas evidencias de la relación entre la señalización de la insulina y el PCa. Por ejemplo, se ha descrito un incremento de los receptores de insulina en tumores primarios de PCa (Cox, Gleave et al. 2009). Por otro lado se han asociado las terapias antiandrogénica con la hiperinsulinemia, proponiéndose el incremento de los niveles de insulina con un fenotipo más agresivo de PCa (Freedland, Mavropoulos et al. 2008, Cox, Gleave et al. 2009).

Los sustratos IRS-1 y 2 presentanhomología de secuencia y activan las mismas vías como PI3K y Erk1/2MAPK kinasas. Estas dos vías han sido implicadas en invasión de células tumorales y sobrevida, observándose un incremento de IRS-2 sobre IRS-1 en muestras tumorales de próstata y mama con respecto a los controles normales (Ma, Gibson et al. 2006, Heni, Hennenlotter et al. 2012). Como mencionamos anteriormente, las funciones de IRS-1 y de IRS-2 parecen ser redundantes en el inicio y en el crecimiento del tumor, sin embargo presentan funciones diferentes en la generación de metástasis (Gibson, Ma et al. 2007). También se ha visto que la ausencia de IRS-1 está asociada a la metástasis en cáncer de mama confiriéndole funciones **supresoras de tumores** en esta neoplasia (Ma, Gibson et al. 2006). Por otro lado, IRS-1 esta reportado como **sub-expresado** en tumores de mama grado 3 pobremente diferenciado (Schnarr, Strunz et al. 2000) y en cáncer de pulmón (Han, Cho et al. 2006).

Contrariamente, otros estudios reportan que su **sobre-expresión** está asociada a una incidencia aumentada en la recurrencia y menor tasa de sobrevida (Rocha, Hilsenbeck et al. 1997, Koda, Sulkowska et al. 2005). También hay reportes de sobre-expresión en cáncer de mama, colon y su asociación con miRs (Zhang, Du et al. 2008, Yin, Yan et al. 2013). La Rocca et al., lo reporta como **oncogén** y valida la interacción de IRS-1 con hsa-miR-182 y hsa-miR-96 miembros del clúster de miR-183 (La Rocca, Badin et al. 2009, La Rocca, Shi et al. 2009).

Por otro lado, el grupo de Reiss ha reportado que IRS-1 se expresa en altas concentraciones en las líneas normales de próstata, mientras que en las líneas provenientes de PCa metastásico presentan bajos (DU145) a nulos (LNCaP) niveles de la proteína IRS-1 (Reiss, Wang et al. 2000, Reiss, Wang et al. 2001).

En este sentido, y en apoyo a lo observado por Reiss, los niveles de proteína de IRS-1 presentan un decremento en muestras tumorales de próstata comparado a los niveles de expresión en muestras de glándula prostática normal en los estudios de inmuno-histoquímica del The Human Protein Atlas. Con respecto al ARNm de IRS-1, Reiss plantea la ausencia (datos no mostrados), en la línea LNCaP (Reiss, Wang et al. 2000, Reiss, Wang et al. 2001).

Coincidentemente con lo reportado por el grupo de Reiss nuestros resultados de expresión génica normalizados y con un valor umbral mínimo de emisión en 3 para todas las muestras, evidenciaron la ausencia de IRS-1 en las muestras de LNCaP (Tabla 10), no así en las muestras de DU145, donde sí se observó la expresión del ARNm, y con valores de emisión considerables. Asímismo, y en favor de una ausencia o disminución de IRS-1 en líneas tumorales de próstata comparativo a muestras normales encontramos que la expresión del ARNm de IRS-1 esta preferencialmente sub-expresada en los estudios de Oncomine, de metástasis y recurrencia.

Sin embargo, y contrariamente a los resultados del grupo de Reiss con respecto a la ausencia del ARNm de IRS-1 en LNCaP, nuestros estudios de modulación génica mediante ensayos de transfeccion de mimic miR-183-5p y de inhibidor miR-183-5p y detección por RT-qPCR, detectaron la presencia de IRS-1 en la línea LNCaP y una modulación significativa al aumentar el inhibidor, lo que podría indicar que miR-183 podría estar participando en la inhibición de este gen.

Por otro lado, Reiss argumenta que la ausencia de expresión de IRS-1 en LNCaP no se debe a una deleccion del gen sino a un silenciamiento por metilación del promotor (estudios con 5- azaciticina) (Reiss, Wang et al. 2000).

Nuestros resultados, si bien son contradictorios ya que se observa la expresión de IRS-1 en LNCaP en los experimentos de modulación (Figura 25), no entran en conflicto con una posible regulación a nivel de la metilación del promotor, sino que la inhibición de IRS-1 por miR-183 podría ser otro mecanismo de silenciamiento de IRS-1, y por lo tanto estar promoviendo la vía metastásica en estas líneas. No descartamos tampoco que estas diferencias de expresión de IRS-1 sean generadas por la adquisición de diferencias cariotípicas (por el número de pasajes, o métodos de cultivo) que puede estar afectando la reproducibilidad inter-laboratorios (Hughes, Marshall et al. 2007, Pelliccia, Ubertini et al. 2012).

A favor de nuestra hipótesis de que IRS1 funcione como gen supresor de tumor en PCa, Reiss reporta que la reintroducción de IRS-1 en las líneas de carcinoma de próstata LNCaP, produce un **descenso de la motilidad celular** y su expresión ectópica incrementa aunque no de forma dramática, las capacidades de adhesión a la fibronectina, colágeno tipo I y laminina (Reiss, Wang et al. 2000, Reiss, Wang et al. 2001).

Por lo que tanto, en virtud de estos resultados, es posible que la vía de insulina vía receptor de insulina o IGF-IR podría estar afectada por la sobre-expresión de hsa-miR-183. Este miR podría entonces inhibir a IRS-1, produciendo el aumento de la motilidad y la disminución de la adhesión celular.

6. Propiedades del fenotipo tumoral reguladas por hsa-miR-183-5p

Para estudiar si hsa-miR-183 es un gen conductor, es decir, que contribuye directamente en la neoplasia, nos propusimos analizar su posible efecto en los diferentes atributos del fenotipo tumoral (funciones celulares) mediante la aproximación de pérdida y ganancia de función de hsa-miR-183 en líneas celulares de PCa. Para esto transfectamos las líneas LNCaP y DU145 con agentes que producen la sobre-expresión o bloqueo de dicho miR. En primer lugar, se evaluó el ingreso y la estabilidad de las moléculas sintéticas transfectadas de forma transitoria, mediante la cuantificación por RT-qPCR de hsa-miR-183-5p, normalizando con el promedio de scarna17 y rnU6. El ingreso solamente fue evaluado en la línea celular LNCaP, ya que (en función de los resultados previos, consideramos que el experimento estaba estandarizado y decidimos reducir los controles para ahorrar reactivos y tiempo).



Figura 29: Efecto de hsa-miR-183-5p sobre la proliferación celular en cultivo. **A.** RT-qPCR de miR-183-5p a 48hs, 72hs y 96hs de la transfección en LNCaP. La normalización se realizó con el promedio de rnU6 y scarna17. **B y C**. Ensayo de MTT en las líneas LNCaP y DU145 respectivamente a las 48, 72, 96hs de la transfección con mimic, siRNA e inhibitor. Las barras de error representan el desvío estándar de triplicados biológicos.

Luego de las transfecciones, los niveles de hsa-miR-183-5p aumentaron en los experimentos con mimic, quintuplicando los niveles endógenos a las 24 hs (Figura 29. A.), observamos tambien una disminución gradual del miR, habiendo a las 96hs solo el doble de concentración. La disminución es de esperar teniendo en cuenta que las transfecciones son transitorias, y por tanto al haber un incremento en el número de células conforme pasen las horas, habrá un menor número de celulas que contengan las moléculas transfectadas, además de una degradación por el recambio celular. Sin embargo, los efectos del inhibidor son más marcados a las 72hs, donde se ve una reducción de miR-183-5p de dos veces con respecto al control. Dadas las propiedades de los inhibidores, es posible que el bloqueo sea de una magnitud mayor. A partir de estos resultados, creemos que estas condiciones de transfección son adecuadas para estudiar propiedades celulares medibles en un corto plazo.

Los porcentajes de viabilidad celular, a las 48, 72 y 96hs fueron analizados con los resultados del MTT generados en los experimentos de inhibición del miR. Los análisis de estos experimentos, presentan una mayor significancia biológica que los realizados con mimic ya que estas son dos líneas que sobre-expresan el miR, y por lo tanto algunos mecanismos como las capacidades metabólicas como las evaluadas en estos ensayos, podrían estar alteradas, y por lo tanto un incremento del miR podría producir cambios menos evidentes que los cambios observados durante la inhibición del mismo (Figura 30).





Los porcentajes de viabilidad (%) se calcularon como la relación entre la densidad óptica (DO) del inhibidor y el control con siRNA, medida a 570-690nm (correspondiente a la absorción del espectro por MTT), es decir: DO

inhibidor/DO siRNA)*100. Los resultados obtenidos, aunque no son estadísticamente significativos, muestran una leve disminución en la viabilidad, 92,6%, 94,37% y 98% a las 48, 72 y 96hs respectivamente, y un porcentaje de inhibición del crecimiento, (estimado como: (DOsiRNA - DOinhibidor)/DOsiRNA * 100 (Chiang, Song et al. 2012))de 7,3, 5,6 y 1,7 respectivamente, en la línea LNCaP. Sin embargo los valores de viabilidad celular en la línea DU145 muestran un descenso únicamente a las 72hs de la transfección de 96,4%, es decir un % de inhibición del crecimiento del 3,6%, en concordancia con una mayor reducción del miR endógeno (Figura 29. A.).

En suma, encontramos que los valores de inhibición a 48hs, 72hs y 96 hs no mostraron diferencias estadísticamente significativas (One-way ANOVA, Test de comparación múltiple de Tukey, p≤0,05), con respecto a los valores de siRNA en DU145 y LNCaP. Así mismo, los análisis de viabilidad analizados con los datos de sobre-expresión de miR-183 muestran un patrón similar que los observados en los ensayos de inhibición.

Esto sugiere que hsa-miR-183-5p no contribuiría significativamente al aumento de la capacidad proliferativa de las células neoplásicas. Sin embargo, no puede descartarse que no intervenga en la proliferación en otras condiciones de cultivo, in vivo, en otras líneas celulares o utilizando otras dosis de mimic o inhibidor.

Este tipo de ensayos se basan de forma general en la reducción del formazán por la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa, por lo que la cantidad de formazán producido es proporcional al número de células vivas. Sin embargo si estas funciones metabólicas están alteradas en las líneas celulares utilizadas, podría ser que no respondiesen de la forma esperada frente a una modulación exógena de miR-183, por lo que no podemos concluir si este miR ejerce o no algún efecto a este nivel. En este aspecto, los ensayos de Ueno de viabilidad celular, muestra un decremento de magnitud similar a la que nosotros observamos pero que resulta estadísticamente significativo en las líneas DU145 (≤0,05) y PC-3 (p≤0,001) a los 4 días de la transfeccion (Ueno, Hirata et al. 2013). Sin embargo, a nuestro criterio este decremento podría estar sobre-estimado debido a que se relativizó con valores de controles mock, esto es, las muestras control no fueron transfectadas con moléculas de similar tamaño a las moléculas inhibidoras como por ejemplo siRNA, y esto podría aumentar entonces la diferencia entre los % de viabilidad celular, en el entendido de que se sabe que la introducción de altas dosis de moléculas simple hebra desencadenan otros mecanismos a nivel celular. En el mismo trabajo sin embargo, los autores muestras el mismo efecto de hsa-mir-183 en crecimiento de tumores in vivo en experimentos de xenotransplaste en ratón, utilizando una línea PC-3 de expresión estable de hsa-mir-183. Aquí emplearon un control adecuado con siRNA. Esto puede sugerir que el leve fenotipo proliferativo observado in vitro se ve desplegado en los experimentos in vivo.

CONCLUSIONES

- Hsa-miR-183-5p está incrementado significativamente en las muestras tumorales prostáticas comparado a las muestras control, por lo que presentaría características oncogénicas. Este perfil de expresión lo posiciona como un posible oncomir.
- Existe una tendencia al aumento de los valores de expresión de hsa-miR-183-5p concomitante al incremento de los valores de score de Gleason asignado a los pacientes analizados. Este perfil de expresión lo posiciona como un posible oncomir.
- Los niveles de expresión de hsa-miR-183-5p tienden a incrementar en función de las agresividades de las líneas tumorales prostáticas. Este perfil de expresión lo posiciona como un posible oncomir.
- 4. La sobre/sub-expresión transitoria de hsa-miR-183-5p en las dos líneas celulares ensayadas, no produjo cambios en la tasa de crecimiento celular. Esto indica que hsa-miR-183-5p en las condiciones ensayadas no afecta el fenotipo proliferativo de PCa. No se descarta un efecto in vivo o en otras líneas y condiciones de cultivo como se describió recientemente en la literatura (Ueno, Hirata et al. 2013).
- Los análisis de interacción directa entre los genes candidatos y el hsa-miR-183-5p, no permitieron comprobar la interacción miR-ARNm. Sin embargo, es necesario realizar nuevas construcciones para probarlo.
- 6. De los genes analizados: PDCD4, FOXO1, ITGB1, IRS1 y FNDC3B presentan modulación estadísticamente significativa en su expresión de ARNm en alguna de las dos líneas analizadas (LNCaP y DU145), lo que los propone como genes blanco directo de represión por hsa-miR-183. Si bien los resultados de Ueno indican que PDCD4 no es blanco directo de hsa-miR-183 (ensayos reporteros no mostrados), no descartamos una modulación indirecta de este gen por dicho miR (Ueno, Hirata et al. 2013).
- 7. El estudio de la actividad de hsa-miR-183-5p en los mayores estudios de expresión génica de PCa, indica que los genes con sitio blanco para este miR, tienden a verse modularmente reprimidos en tumores y en metástasis, lo que sugiere que fuciona como oncomir en el set clínico.
- 8. Existe una concordancia entre los genes blancos identificados *in silico* con los genes modulados por miR-183 en los ensayos de microarreglos, lo que sustenta los resultados experimentales obtenidos mediante la transfección de mimic miR-183-5p y de inhibidor miR-183-5p y proporciona una lista de genes blanco candidatos en PCa para ser estudiados en el futuro.
- 9. Las vías de señalización moduladas por hsa-miR-183 nivel en PCa determinadas por los estudios de microarreglos son: las vía de adhesión focal y la vía de insulina al igual que lo reporta la bibliografía previa.

A raíz de nuestros resultados proponemos dos modelos de funcionamiento de hsa-miR-183-5p tentativos, los cuales no son exclusivos, y para los cuales no descartamos el posible funcionamiento sinérgico entre los miembros del clúster de miR-183.

Con respecto a la vía de adhesión celular, proponemos, la posible inhibición de la vía de las integrinas por miR-183, disminuyendo la adhesión celular, aumentando la proliferación y crecimiento tumoral. Esta disminución podría estar potenciando la motilidad celular con la concomitante metástasis asociada en los tumores prostáticos (Figura 31).



Figura 31: El crecimiento del tumor primario está afectado por la expresión de integrinas. La expresión de la variante citoplasmática integrina B1C, la cual está disminuida PCa, en previene el crecimiento tumoral inhibiendo la vía IGF-IR (Goel, Fornaro et al. 2004). IGF-1 e IGF-IR son moduladores importantes del crecimiento y diferenciación y participan en el mantenimiento del fenotipo transformado (Reiss, Wang et al. 2000, Baserga 2009).

Por otro lado, IRS-1 está sub-expresada en PCa, por lo que presentaría funciones supresoras de tumores, su ausencia produce una disminución de la adhesión celular y aumento de la motilidad, mecanismos importantes durante la metástasis. Sin embargo a nivel proliferativo su función (mitogénica) es opuesta, disminuyendo la proliferación celular en su ausencia (Figura 32).



Figura 32: IRS-1 es uno de los mayores sustratos de IGF-IR y activador de PI3K. El incremento de IRS-1 ectópico en LNCaP incrementa dramáticamente la actividad de PI3K, incrementando la proliferación debido a las características mitogénicas de IRS-1 (Reiss, Wang et al. 2000, Reiss, Wang et al. 2001).

Como **perspectivas** planteamos seguir analizando la modulación de los dos genes identificados, FNDC3B e IRS-1, mediante estudios de interacción con hsa-miR-183, y ensayos de modulación a nivel de ARNm y proteico. Estos últimos especialmente para el análisis de la expresión del gen FNDC3B, que, como se ha reportado en la bibliografía, su modulación se da más que nada a nivel proteico, y los cambios a nivel de ARNm son indetectables.

ANEXOS

Tabla 1. Algoritmos y criterios establecidos por los 11 programas de predicción: DIANA-microT, MicroInspector, miRanda,MirTarget2, miTarget, NBmiRTar, PicTar, PITA, RNA22, RNAhybrid, y TargetScan de miRecords (http://mirecords.biolead.org)(Xiao, Zuo et al. 2009).

Nombre	Versión del programa y /o año de liberación/descripción	Referencias
DIANA-microT	2004. Identifica ARNm blancos de miRNAs de origen animal y predice los ARNm blancos, que comparten MREs para miRNAs de humano y ratón (http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cei-bin/micro.t.cei).	Kiriakidou, M. et al. A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. Genes Dev. 18.
	be a minute proceduration in the state of the second second by invested the second second second second second	1165-1178 (2004).
MicroInspector	Versión 1.5. Analiza una secuencia de ARN definida por el usuario, la cual es típicamente un ARNm o parte de un ARNm, para determinar la companzia de sitior de unión para miRNAs conocidos y societados. El programa	Rusinov, V., Baev, V., Minkov, I.N. & Tabler, M. MicroInspector: a web tool for dataction of miRNA binding sites in an RNA
	permite la variación de la temperatura. los ajustes de valores de energía y la selección de diferentes base de datos	sequence. Nucleic Acids Res. 33 (Web server issue). W696-700
	de miRNAs para identificar sitios de unión a miRNAs con fuerzas diferenciales (http://mima.imbb.forth.gr/microinspector/).	(2005).
<u>miRanda</u>	Versión 1.9. Método computacional para la predicción de genes blanco de miRNAs a lo largo de todo el genoma.	A.J. Enright, B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander, D.S.Marks; MicroPNA transit in Descentile: General Biology 5(1)-P1 (2002)
	secuencias usando un algoritmo de alineamiento local de posición ponderada (position-weighted local alignment	wild on white Bers in Diosophilia, Genome Biology 3(1).ht. (2003)
	algorithm), energías libres de los dúplex ARN-ARN y la conservación de los sitios blancos en los genomas relacionados (http://microma.sanger.ac.uk/targets).	
MirTarget2	Versión 2.0. Programa de predicción de blancos de miRNA basado en máquinas vectores de soporte (SVM) y una gran base de datos de microarray de entrenamiento (http://micrb.org)	Wang X, El Naga IM. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. Bioinformatics Ech
	0	1;24(3):325-32. (2008).
<u>miTarget</u>	2006. Es una SVM dasificadora de genes blancos predictivos de miRNA. Utiliza un núcleo de base de función	SK Kim*, JW Nam*, JK Rhee, WJ Lee, BT. Zhang. miTarget:
	radial como una medida de similandad para catacterísticas de SVM, que se categorizan estructural, termodinámica y posicionalmente. (<u>http://www.diana.pdbi.upenn.edu/qgi-bin/micro_t.qgi</u>).	Machinen. BMC Bioinformatics, 7:411, (2006).
<u>NBmiRTar</u>	Versión 1.0 Beta. Método de predicción de blancos de miRNAs que no requiere de conservación de secuencias, y	Malik Yousef, Segun Jung, Andrew V. Kossenkov, Louise C. Showe
	que unita aprendizaje automatico del dastricador no parametrico de bayes (http://wotan.wistar.upenn.edu/NBmiRTar/).	and Michael K. Showe wave bayes for Microkina Target. Prediction Bioinformatics. Nov 15; 23(22):2987-92. (2007).
<u>PicTar</u>	2007. Método computacional que identifica blancos de miRNAs comunes. Los test estadísticos que utilizan los	Krek, A. et al. Combinatorial microRNA target predictions. Nat.
	alineamientos de 8 genomas de vertebrados, la habilidad de Picifar de recuperar blancos de miKNAs publicados y las validaciones experimentales de 7 de los blancos predichos por Picifar lo ha destacado de entre los otros	Genet. 37, 495-500 (2005).
	algoritmos (http://genome.ucsc.edu/).	
<u>PITA</u>	2008. Versión 6, . Sigue los ajustes de parámetros estandard del seed y considera seeds de 6-8 bases de longitud,	Kertesz et al., The role of site accessibility in microRNA target
	comenzando en la posicion 2 del miRNA. No permite mismatches ni loops, pero una unica burbuja de 6:U es permitida en 7 u 8 mers (http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html).	recognition, Nature Genetics 39(10), 1278-84 (2007).
<u>RNA22</u>	2008. Método basado en patrones para la identificación de sitios blancos de miRNAs y sus complejos ARN-ARN	T. Huynh, K. Miranda, Y. Tay, YS. Ang, WL. Tarn, A. M.
	correspondientes (<u>http://docsrv.watson.jbm.com/ma22.html</u>).	Thomson, B. Lim, I. A pattern-based method for the identification of microRNA-target sites and their corresponding RNA/RNA
		complexes Rigoutsos Cell, Vol 126, 1203-1217, (2006).
<u>RNAhybrid</u>	Versión 2.2. Herramienta para identificar la hibridación entre una molécula de ARN largo con una molécula de	Marc Rehmsmeier *, Peter Steffen, Matthias Hochsmann, Robert
	ARN corto de menor energía libre. La hibridación se lleva a cabo de la siguiente forma: la secuencia corta es hibridada en la carián minimal de la comunia la productión de blances realizada por PNAbblatid de realiza	Giegerich Fast and effective prediction of microRNA/target
	corriendo una implementación local del algoritmo de RNAhybrid que es provisto por los autores	uupiexes kna, 10.1307-131.(2004).
	(bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mahybrid/).	
TargetScan/	Versión 4.1. Esta herramienta predice blancos biológicos de miRNAs mediante la búsqueda de la presencia de los citica Remu Trans concerne des la transforma terrante en esta b	Lewis, B.P., Shih, I.H., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P. & Burge, C.B. Dradictica of mammalian micro BNA typests. Coll 115, 202 200
Targerscans	situs oner y mer conservatios (<u>http://www.targetscan.org/</u>).	(2003).

Tabla 2. Características relevantes: propiedades del cultivo/morfología celular; procedencia; receptores; es o notumorogénica y antígenos expresados.

Número ATCC [®] /Designación	Propiedades del cultivo/Morfología celular	Procedencia (Aislamiento)	Receptores	Tumorogénica	Antígenos expresados
HTB-81 = /DU-145	Células en cultivo: adherentes. Células aisladas: forman colonias en agar blando y son de tipo epitelial.	Metástasis cerebral provocada por un carcinoma prostático de un paciente caucásico de 69 años de edad.	Ausencia de AR, débilmente positiva para la fosfatasa ácida.	Si. Generan adenocarcinomas de II grado en ratones nude.	Ausencia de APE y 5œ-reductasa
CRL- 1740/ LINCaP- Clone FGC	Células de tipo epitelial. Se adhieren suavemente al sustrato (crecimiento en cultivo), no se vuelven confluentes y acidifican el medio rápidamente. No producen una monocapa uniforme y generalmente crecen en dusters. Crecimiento lento.	Aislada por J. S. Horoszewicz, et al en 1977 de la región supradavicular izquierda del nódulo linfático de un carcinoma prostático de un paciente caucásico de 50 años de edad.	Presencia de AR y estrógenos y responden a 5-α- dihidrotestosteona.	Si. Generan turnores en ratones nude	
CRL-1573"/HEK-293	Células adherentes de tipo epitelial	Extraídas de riñón embrionario.		Si. Generan turnores en ratones nude	
CRL-11609"/ RWPE-1	Células adherentes, dependientes del andaje/ Tipo epitelial	Aislada de zona periférica de próstata normal de un individuo caucásico de 54 años de edad	Presencia de AR (aumentan luego de exposición a andrógenos)	No, no presenta efectos en agar blando ni en ratones nude	Kallikrein 3 (KLK3); antígeno prostático (APE)
CRL-11610"/RWPE-2	Células adherentes Las células RWPE-2 forman pequeñas colonias en agar blando/Tipo epitelial	Aislada de zona periférica de próstata normal de un individuo caucásico de 54 años de edad	Presencia de AR (aumentan luego de exposición a andrógenos)	Si. Generan turnores en ratones nude	Expresión de APE
CRL-2887"/ WPE-stem	Células adherentes/Tipo epitelial	Aislada de zona periférica de próstata normal de individuo caucásico de 54 años de edad. Enfermedad: papilorna	Presencia de AR (aumentan luego de exposición a andrógenos). La línea celular es andrógeno independiente para el crecimiento y sobrevida.	No, no son tumorogénicas en ratones nude aun luego de 6 meses de la inyección.	Expresión baja de APE
CRL-2888 [—] / WPE-int	Células adherentes, dependientes del andaje/ Tipo epitelial	Aislada de zona periférica de próstata normal de un individuo caucásico de 54 años de edad	Presencia de AR (durante exposición a andrógenos)	No	Expresión de APE
CRL-1435/PC-3	Células adherentes. Crecen en dusters/Tipo epitelial	Aislada de próstata de paciente caucásico de 62 años de edad, con adenocarcinoma (gradoIV) con metástasis ósea.	Ausencia de AR	Si. Se desarrollan turnores a los 21 días de inoculación subcutánea en ratones nude con 107 células en el 100% de los casos	HLA A1, A9. Ausencia de APE y 5œ-reductasa
CRL-2422/ MDA PCa 2b	Células adherentes/ Tipo epitelial	Aislada de próstata de paciente negro de 63 años de edad, con adenocarcinoma con metástasis ósea	Presencia de AR Andrógeno sensible	Si. Generan turnores en ratones nude cuando se inyectan de forma subcutánea u ortópica (intraprostática).	Expresión de APE
CRL-2505 ⁻⁷ /22Rv1	Células adherentes/ Tipo epitelial	Línea celular de carcinoma epitelial de próstata humana derivada de xenograft que fue propagado de forma seriada en ratón luego de la regresión inducida por castración y relapso del xenograft CWR22 dependiente de andrógenos	Presencia de AR -Crecimiento débil estimulada con dihidro- testosterona.	Si. Generan turnores en ratones nude	Expresión de APE

BIBLIOGRAFÍA

Abraham, D., N. Jackson, J. S. Gundara, J. Zhao, A. J. Gill, L. Delbridge, B. G. Robinson and S. B. Sidhu (2011). "MicroRNA profiling of sporadic and hereditary medullary thyroid cancer identifies predictors of nodal metastasis, prognosis, and potential therapeutic targets." <u>Clin Cancer Res</u> **17**(14): 4772-4781.

Adamson, E., I. de Belle, S. Mittal, Y. Wang, J. Hayakawa, K. Korkmaz, D. O'Hagan, M. McClelland and D. Mercola (2003). "Egr1 signaling in prostate cancer." <u>Cancer Biol Ther</u> **2**(6): 617-622.

Ali, S., K. Almhanna, W. Chen, P. A. Philip and F. H. Sarkar (2010). "Differentially expressed miRNAs in the plasma may provide a molecular signature for aggressive pancreatic cancer." <u>Am J Transl Res</u> **3**(1): 28-47.

Altuvia, Y., P. Landgraf, G. Lithwick, N. Elefant, S. Pfeffer, A. Aravin, M. J. Brownstein, T. Tuschl and H. Margalit (2005). "Clustering and conservation patterns of human microRNAs." <u>Nucleic Acids Res</u> **33**(8): 2697-2706.

Ambs, S., R. L. Prueitt, M. Yi, R. S. Hudson, T. M. Howe, F. Petrocca, T. A. Wallace, C. G. Liu, S. Volinia, G. A. Calin, H. G. Yfantis, R. M. Stephens and C. M. Croce (2008). "Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer." <u>Cancer Res</u> **68**(15): 6162-6170.

Amory, J. K. and W. J. Bremner (2003). "Regulation of testicular function in men: implications for male hormonal contraceptive development." <u>J Steroid Biochem Mol Biol</u> **85**(2-5): 357-361.

Andersen, C. L., J. L. Jensen and T. F. Orntoft (2004). "Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets." <u>Cancer Res</u> **64**(15): 5245-5250.

Arnold, J. T. and J. T. Isaacs (2002). "Mechanisms involved in the progression of androgen-independent prostate cancers: it is not only the cancer cell's fault." <u>Endocr Relat Cancer</u> **9**(1): 61-73.

Bahubeshi, A., M. Tischkowitz and W. D. Foulkes (2011). "miRNA processing and human cancer: DICER1 cuts the mustard." <u>Sci Transl Med</u> **3**(111): 111ps146.

Balk, S. P., Y. J. Ko and G. J. Bubley (2003). "Biology of prostate-specific antigen." J Clin Oncol **21**(2): 383-391.

Bandres, E., E. Cubedo, X. Agirre, R. Malumbres, R. Zarate, N. Ramirez, A. Abajo, A. Navarro, I. Moreno, M. Monzo and J. Garcia-Foncillas (2006). "Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues." <u>Mol Cancer</u> **5**: 29.

Banham, A. H., N. Beasley, E. Campo, P. L. Fernandez, C. Fidler, K. Gatter, M. Jones, D. Y. Mason, J. E. Prime, P. Trougouboff, K. Wood and J. L. Cordell (2001). "The FOXP1 winged helix transcription factor is a novel candidate tumor suppressor gene on chromosome 3p." <u>Cancer Res</u> **61**(24): 8820-8829.

Baron, V., E. D. Adamson, A. Calogero, G. Ragona and D. Mercola (2006). "The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin." <u>Cancer Gene Ther</u> **13**(2): 115-124.

Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." <u>Cell</u> **116**(2): 281-297.

Baserga, R. (2009). "The insulin receptor substrate-1: a biomarker for cancer?" Exp Cell Res **315**(5): 727-732.

Beck, M. L., M. A. Myers, M. J. Moulds, S. R. Pierce, P. J. Hardman, J. Wingham and G. W. Bird (1978). "Coexistent Tk and VA polyagglutinability." <u>Transfusion</u> **18**(6): 680-684.

Boominathan, L. (2010). "The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex." <u>PLoS One</u> **5**(5): e10615.

Borchert, G. M., W. Lanier and B. L. Davidson (2006). "RNA polymerase III transcribes human microRNAs." <u>Nat</u> <u>Struct Mol Biol</u> **13**(12): 1097-1101.

Bostwick, D. G. (1994). "Gleason grading of prostatic needle biopsies. Correlation with grade in 316 matched prostatectomies." <u>Am J Surg Pathol</u> **18**(8): 796-803.

Bremnes, R. M., R. Sirera and C. Camps (2005). "Circulating tumour-derived DNA and RNA markers in blood: a tool for early detection, diagnostics, and follow-up?" <u>Lung Cancer</u> **49**(1): 1-12.

Bunt, J., T. G. de Haas, N. E. Hasselt, D. A. Zwijnenburg, J. Koster, R. Versteeg and M. Kool (2010). "Regulation of cell cycle genes and induction of senescence by overexpression of OTX2 in medulloblastoma cell lines." <u>Mol Cancer</u> <u>Res</u> **8**(10): 1344-1357.

Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." <u>Nat Rev Cancer</u> 6(11): 857-866.

Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich and C. M. Croce (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **99**(24): 15524-15529.

Ciafre, S. A., S. Galardi, A. Mangiola, M. Ferracin, C. G. Liu, G. Sabatino, M. Negrini, G. Maira, C. M. Croce and M. G. Farace (2005). "Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma." <u>Biochem Biophys Res</u> <u>Commun</u> **334**(4): 1351-1358.

Coppola, V., R. De Maria and D. Bonci (2010). "MicroRNAs and prostate cancer." <u>Endocr Relat Cancer</u> **17**(1): F1-17. Cox, M. E., M. E. Gleave, M. Zakikhani, R. H. Bell, E. Piura, E. Vickers, M. Cunningham, O. Larsson, L. Fazli and M. Pollak (2009). "Insulin receptor expression by human prostate cancers." <u>Prostate</u> **69**(1): 33-40.

Chandran, U. R., R. Dhir, C. Ma, G. Michalopoulos, M. Becich and J. Gilbertson (2005). "Differences in gene expression in prostate cancer, normal appearing prostate tissue adjacent to cancer and prostate tissue from cancer free organ donors." <u>BMC Cancer</u> **5**: 45.

Chen, C., H. Xiang, Y. L. Peng, J. Peng and S. W. Jiang (2014). "Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/beta-catenin signaling pathway by targeting LRP6." <u>Cell Signal</u> **26**(6): 1155-1165.

Chen, L., F. Giorgianni and S. Beranova-Giorgianni (2010). "Characterization of the phosphoproteome in LNCaP prostate cancer cells by in-gel isoelectric focusing and tandem mass spectrometry." J Proteome Res **9**(1): 174-178.

Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." <u>Cell Res</u> **18**(10): 997-1006.

Chiang, C. H., M. F. Hou and W. C. Hung (2013). "Up-regulation of miR-182 by beta-catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK." <u>Biochim</u> <u>Biophys Acta</u> **1830**(4): 3067-3076.

Chiang, Y., Y. Song, Z. Wang, Z. Liu, P. Gao, J. Liang, J. Zhu, C. Xing and H. Xu (2012). "microRNA-192, -194 and -215 are frequently downregulated in colorectal cancer." <u>Exp Ther Med</u> **3**(3): 560-566.

Chien, C. H., Y. M. Sun, W. C. Chang, P. Y. Chiang-Hsieh, T. Y. Lee, W. C. Tsai, J. T. Horng, A. P. Tsou and H. D. Huang (2011). "Identifying transcriptional start sites of human microRNAs based on high-throughput sequencing data." <u>Nucleic Acids Res</u> **39**(21): 9345-9356.

Chin, L. J. and F. J. Slack (2008). "A truth serum for cancer--microRNAs have major potential as cancer biomarkers." <u>Cell Res</u> **18**(10): 983-984.

Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, M. Acquafondata, T. McHale, R. W. Sobol and R. Dhir (2006). "Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma." <u>Am J Pathol</u> **169**(5): 1812-1820. Cho, W. C. (2007). "OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers." Mol Cancer **6**: 60.

Dahiya, N., C. A. Sherman-Baust, T. L. Wang, B. Davidson, M. Shih le, Y. Zhang, W. Wood, 3rd, K. G. Becker and P. J. Morin (2008). "MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer." <u>PLoS One</u> **3**(6): e2436.

Dehm, S. M. and D. J. Tindall (2006). "Molecular regulation of androgen action in prostate cancer." <u>J Cell Biochem</u> **99**(2): 333-344.

DeVere White, R. W., R. L. Vinall, C. G. Tepper and X. B. Shi (2009). "MicroRNAs and their potential for translation in prostate cancer." <u>Urol Oncol</u> **27**(3): 307-311.

Di Lorenzo, G., G. Tortora, F. P. D'Armiento, G. De Rosa, S. Staibano, R. Autorino, M. D'Armiento, M. De Laurentiis, S. De Placido, G. Catalano, A. R. Bianco and F. Ciardiello (2002). "Expression of epidermal growth factor receptor correlates with disease relapse and progression to androgen-independence in human prostate cancer." <u>Clin</u> <u>Cancer Res</u> **8**(11): 3438-3444.

Diamandis, E. P. and G. M. Yousef (2002). "Human tissue kallikreins: a family of new cancer biomarkers." <u>Clin</u> <u>Chem</u> **48**(8): 1198-1205.

Duhagon, M. A., E. M. Hurt, J. R. Sotelo-Silveira, X. Zhang and W. L. Farrar (2010). "Genomic profiling of tumor initiating prostatospheres." <u>BMC Genomics</u> **11**: 324.

Elcheva, I., S. Goswami, F. K. Noubissi and V. S. Spiegelman (2009). "CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation." <u>Mol Cell</u> **35**(2): 240-246.

Elmen, J., M. Lindow, A. Silahtaroglu, M. Bak, M. Christensen, A. Lind-Thomsen, M. Hedtjarn, J. B. Hansen, H. F. Hansen, E. M. Straarup, K. McCullagh, P. Kearney and S. Kauppinen (2008). "Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver." <u>Nucleic Acids Res</u> **36**(4): 1153-1162.

Esau, C., S. Davis, S. F. Murray, X. X. Yu, S. K. Pandey, M. Pear, L. Watts, S. L. Booten, M. Graham, R. McKay, A. Subramaniam, S. Propp, B. A. Lollo, S. Freier, C. F. Bennett, S. Bhanot and B. P. Monia (2006). "miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting." <u>Cell Metab</u> **3**(2): 87-98.

Estella, C., I. Herrer, J. M. Moreno-Moya, A. Quinonero, S. Martinez, A. Pellicer and C. Simon (2012). "miRNA signature and Dicer requirement during human endometrial stromal decidualization in vitro." <u>PLoS One</u> **7**(7): e41080.

Fabani, M. M. and M. J. Gait (2008). "miR-122 targeting with LNA/2'-O-methyl oligonucleotide mixmers, peptide nucleic acids (PNA), and PNA-peptide conjugates." <u>RNA</u> **14**(2): 336-346.

Fan, X., X. Chen, W. Deng, G. Zhong, Q. Cai and T. Lin (2013). "Up-regulated microRNA-143 in cancer stem cells differentiation promotes prostate cancer cells metastasis by modulating FNDC3B expression." <u>BMC Cancer</u> **13**: 61.

Ferlay, J., H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." Int J Cancer **127**(12): 2893-2917.

Ferraro, B., G. Bepler, S. Sharma, A. Cantor and E. B. Haura (2005). "EGR1 predicts PTEN and survival in patients with non-small-cell lung cancer." <u>J Clin Oncol</u> **23**(9): 1921-1926.

Fevre-Montange, M., J. Champier, A. Durand, A. Wierinckx, J. Honnorat, J. Guyotat and A. Jouvet (2009). "Microarray gene expression profiling in meningiomas: differential expression according to grade or histopathological subtype." Int J Oncol **35**(6): 1395-1407.

Figel, S. and I. H. Gelman (2011). "Focal adhesion kinase controls prostate cancer progression via intrinsic kinase and scaffolding functions." <u>Anticancer Agents Med Chem</u> **11**(7): 607-616.

Folini, M., P. Gandellini, N. Longoni, V. Profumo, M. Callari, M. Pennati, M. Colecchia, R. Supino, S. Veneroni, R. Salvioni, R. Valdagni, M. G. Daidone and N. Zaffaroni (2010). "miR-21: an oncomir on strike in prostate cancer." <u>Mol Cancer</u> **9**: 12.

Fornaro, M., M. Lovecchio, P. Jose, D. Q. Zheng, L. Moro and L. R. Languino (2001). "Epitope-specific antibodies to the beta(1C) integrin cytoplasmic domain variant." <u>Exp Mol Pathol</u> **70**(3): 275-280.

Freedland, S. J., J. Mavropoulos, A. Wang, M. Darshan, W. Demark-Wahnefried, W. J. Aronson, P. Cohen, D. Hwang, B. Peterson, T. Fields, S. V. Pizzo and W. B. Isaacs (2008). "Carbohydrate restriction, prostate cancer growth, and the insulin-like growth factor axis." <u>Prostate</u> **68**(1): 11-19.

Gao, P., A. Y. Xing, G. Y. Zhou, T. G. Zhang, J. P. Zhang, C. Gao, H. Li and D. B. Shi (2013). "The molecular mechanism of microRNA-145 to suppress invasion-metastasis cascade in gastric cancer." <u>Oncogene</u> **32**(4): 491-501.

Gibson, S. L., Z. Ma and L. M. Shaw (2007). "Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis." <u>Cell</u> <u>Cycle</u> **6**(6): 631-637.

Gitenay, D. and V. T. Baron (2009). "Is EGR1 a potential target for prostate cancer therapy?" <u>Future Oncol</u> **5**(7): 993-1003.

Goel, H. L., N. Alam, I. N. Johnson and L. R. Languino (2009). "Integrin signaling aberrations in prostate cancer." <u>Am</u> <u>J Transl Res</u> 1(3): 211-220.

Goel, H. L., M. Fornaro, L. Moro, N. Teider, J. S. Rhim, M. King and L. R. Languino (2004). "Selective modulation of type 1 insulin-like growth factor receptor signaling and functions by beta1 integrins." <u>J Cell Biol</u> **166**(3): 407-418.

Goel, H. L., J. Li, S. Kogan and L. R. Languino (2008). "Integrins in prostate cancer progression." <u>Endocr Relat Cancer</u> **15**(3): 657-664.

Goke, R., P. Barth, A. Schmidt, B. Samans and B. Lankat-Buttgereit (2004). "Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21(Waf1/Cip1)." <u>Am J Physiol Cell Physiol</u> **287**(6): C1541-1546.

Gorlov, I. P., J. Byun, O. Y. Gorlova, A. M. Aparicio, E. Efstathiou and C. J. Logothetis (2009). "Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data." <u>BMC Med Genomics</u> **2**: 48.

Grossmann, M. E., H. Huang and D. J. Tindall (2001). "Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer." J Natl Cancer Inst **93**(22): 1687-1697.

Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman and D. P. Bartel (2010). "Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels." <u>Nature</u> **466**(7308): 835-840.

Guttilla, I. K. and B. A. White (2009). "Coordinate regulation of FOXO1 by miR-27a, miR-96, and miR-182 in breast cancer cells." J Biol Chem **284**(35): 23204-23216.

Hammerich-Hille, S., V. J. Bardout, S. G. Hilsenbeck, C. K. Osborne and S. Oesterreich (2010). "Low SAFB levels are associated with worse outcome in breast cancer patients." <u>Breast Cancer Res Treat</u> **121**(2): 503-509.

Han, C. H., J. Y. Cho, J. T. Moon, H. J. Kim, S. K. Kim, D. H. Shin, J. Chang, C. M. Ahn, S. K. Kim and Y. S. Chang (2006). "Clinical significance of insulin receptor substrate-I down-regulation in non-small cell lung cancer." <u>Oncol Rep</u> **16**(6): 1205-1210. Hanke, M., K. Hoefig, H. Merz, A. C. Feller, I. Kausch, D. Jocham, J. M. Warnecke and G. Sczakiel (2010). "A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer." <u>Urol Oncol</u> **28**(6): 655-661.

Hassan, O., A. Ahmad, S. Sethi and F. H. Sarkar (2012). "Recent updates on the role of microRNAs in prostate cancer." <u>J Hematol Oncol</u> **5**: 9.

Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido and T. Takahashi (2005). "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation." <u>Cancer Res</u> **65**(21): 9628-9632.

He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernando-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon and S. M. Hammond (2005). "A microRNA polycistron as a potential human oncogene." <u>Nature</u> **435**(7043): 828-833.

Heffelfinger, C., Z. Ouyang, A. Engberg, D. J. Leffell, A. M. Hanlon, P. B. Gordon, W. Zheng, H. Zhao, M. P. Snyder and A. E. Bale (2012). "Correlation of Global MicroRNA Expression With Basal Cell Carcinoma Subtype." <u>G3</u> (Bethesda) **2**(2): 279-286.

Heneghan, H. M., N. Miller, R. Kelly, J. Newell and M. J. Kerin (2010). "Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease." <u>Oncologist</u> **15**(7): 673-682.

Heni, M., J. Hennenlotter, M. Scharpf, S. Z. Lutz, C. Schwentner, T. Todenhofer, D. Schilling, U. Kuhs, V. Gerber, F. Machicao, H. Staiger, H. U. Haring and A. Stenzl (2012). "Insulin receptor isoforms A and B as well as insulin receptor substrates-1 and -2 are differentially expressed in prostate cancer." <u>PLoS One</u> **7**(12): e50953.

Hirata, H., K. Ueno, V. Shahryari, G. Deng, Y. Tanaka, Z. L. Tabatabai, Y. Hinoda and R. Dahiya (2013). "MicroRNA-182-5p promotes cell invasion and proliferation by down regulating FOXF2, RECK and MTSS1 genes in human prostate cancer." <u>PLoS One</u> **8**(1): e55502.

Huang, S. F., S. J. Kim, A. T. Lee, T. Karashima, C. Bucana, D. Kedar, P. Sweeney, B. Mian, D. Fan, D. Shepherd, I. J. Fidler, C. P. Dinney and J. J. Killion (2002). "Inhibition of growth and metastasis of orthotopic human prostate cancer in athymic mice by combination therapy with pegylated interferon-alpha-2b and docetaxel." <u>Cancer Res</u> **62**(20): 5720-5726.

Huang, Y., S. Yang, J. Zhang, L. Tan, F. Jiang, N. Li, J. Cheng, Y. Lu and Y. Dai (2010). "MicroRNAs as promising biomarkers for diagnosing human cancer." <u>Cancer Invest</u> **28**(6): 670-671.

Hughes, P., D. Marshall, Y. Reid, H. Parkes and C. Gelber (2007). "The costs of using unauthenticated, overpassaged cell lines: how much more data do we need?" <u>Biotechniques</u> **43**(5): 575, 577-578, 581-572 passim.

Isaacs, W., A. De Marzo and W. G. Nelson (2002). "Focus on prostate cancer." Cancer Cell 2(2): 113-116.

Kent, O. A. and J. T. Mendell (2006). "A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes." <u>Oncogene</u> **25**(46): 6188-6196.

Kharaziha, P., S. Ceder, Q. Li and T. Panaretakis (2012). "Tumor cell-derived exosomes: a message in a bottle." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1826**(1): 103-111.

Koda, M., M. Sulkowska, L. Kanczuga-Koda, J. Golaszewska, W. Kisielewski, M. Baltaziak, A. Wincewicz and S. Sulkowski (2005). "Expression of the Insulin Receptor Substrate 1 in primary tumors and lymph node metastases in breast cancer: correlations with Bcl-xL and Bax proteins." <u>Neoplasma</u> **52**(5): 361-363.

Koda, M., M. Sulkowska, L. Kanczuga-Koda and S. Sulkowski (2005). "Expression of insulin receptor substrate 1 in primary breast cancer and lymph node metastases." J Clin Pathol **58**(6): 645-649.

Krohn, A., A. Seidel, L. Burkhardt, F. Bachmann, M. Mader, K. Grupp, T. Eichenauer, A. Becker, M. Adam, M. Graefen, H. Huland, S. Kurtz, S. Steurer, M. C. Tsourlakis, S. Minner, U. Michl, T. Schlomm, G. Sauter, R. Simon and H. Sirma (2013). "Recurrent deletion of 3p13 targets multiple tumour suppressor genes and defines a distinct subgroup of aggressive ERG fusion-positive prostate cancers." J Pathol **231**(1): 130-141.

Krol, J., I. Loedige and W. Filipowicz (2010). "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay." <u>Nat Rev Genet</u> **11**(9): 597-610.

Krutzfeldt, J., S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2007). "Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs." <u>Nucleic Acids Res</u> **35**(9): 2885-2892.

Krutzfeldt, J., N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan and M. Stoffel (2005). "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'." <u>Nature</u> **438**(7068): 685-689.

La Rocca, G., M. Badin, B. Shi, S. Q. Xu, T. Deangelis, L. Sepp-Lorenzinoi and R. Baserga (2009). "Mechanism of growth inhibition by MicroRNA 145: the role of the IGF-I receptor signaling pathway." J Cell Physiol **220**(2): 485-491.

La Rocca, G., B. Shi, M. Badin, T. De Angelis, L. Sepp-Lorenzino and R. Baserga (2009). "Growth inhibition by microRNAs that target the insulin receptor substrate-1." <u>Cell Cycle</u> **8**(14): 2255-2259.

Ladeiro, Y., G. Couchy, C. Balabaud, P. Bioulac-Sage, L. Pelletier, S. Rebouissou and J. Zucman-Rossi (2008). "MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations." <u>Hepatology</u> **47**(6): 1955-1963.

Lankat-Buttgereit, B. and R. Goke (2009). "The tumour suppressor Pdcd4: recent advances in the elucidation of function and regulation." <u>Biol Cell</u> **101**(6): 309-317.

Larkin, S. E., B. Zeidan, M. G. Taylor, B. Bickers, J. Al-Ruwaili, C. Aukim-Hastie and P. A. Townsend (2010). "Proteomics in prostate cancer biomarker discovery." <u>Expert Rev Proteomics</u> **7**(1): 93-102.

Law, P. T., A. K. Ching, A. W. Chan, Q. W. Wong, C. K. Wong, K. F. To and N. Wong (2012). "MiR-145 modulates multiple components of the insulin-like growth factor pathway in hepatocellular carcinoma." <u>Carcinogenesis</u> **33**(6): 1134-1141.

Lawrie, C. H., S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A. H. Banham, F. Pezzella, J. Boultwood, J. S. Wainscoat, C. S. Hatton and A. L. Harris (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma." <u>Br J Haematol</u> **141**(5): 672-675.

Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14." <u>Cell</u> **75**(5): 843-854.

Lehmann, U. (2010). "MicroRNA-profiling in formalin-fixed paraffin-embedded specimens." <u>Methods Mol Biol</u> **667**: 113-125.

Lehmann, U., T. Streichert, B. Otto, C. Albat, B. Hasemeier, H. Christgen, E. Schipper, U. Hille, H. H. Kreipe and F. Langer (2010). "Identification of differentially expressed microRNAs in human male breast cancer." <u>BMC Cancer</u> **10**: 109.

Leite, K. R., J. M. Canavez, S. T. Reis, A. H. Tomiyama, C. B. Piantino, A. Sanudo, L. H. Camara-Lopes and M. Srougi (2011). "miRNA analysis of prostate cancer by quantitative real time PCR: comparison between formalin-fixed paraffin embedded and fresh-frozen tissue." <u>Urol Oncol</u> **29**(5): 533-537.

Leite, K. R., J. M. Sousa-Canavez, S. T. Reis, A. H. Tomiyama, L. H. Camara-Lopes, A. Sanudo, A. A. Antunes and M. Srougi (2011). "Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis." <u>Urol Oncol</u> **29**(3): 265-269.

Li, G., C. Luna, J. Qiu, D. L. Epstein and P. Gonzalez (2010). "Targeting of integrin beta1 and kinesin 2alpha by microRNA 183." J Biol Chem **285**(8): 5461-5471.

Li, H. and D. M. Fekete (2010). "MicroRNAs in hair cell development and deafness." <u>Curr Opin Otolaryngol Head</u> <u>Neck Surg</u> **18**(5): 459-465.

Li, H., W. Kloosterman and D. M. Fekete (2010). "MicroRNA-183 family members regulate sensorineural fates in the inner ear." J Neurosci **30**(9): 3254-3263.

Li, J., H. Fu, C. Xu, Y. Tie, R. Xing, J. Zhu, Y. Qin, Z. Sun and X. Zheng (2010). "miR-183 inhibits TGF-beta1-induced apoptosis by downregulation of PDCD4 expression in human hepatocellular carcinoma cells." <u>BMC Cancer</u> **10**: 354. Li, J., S. Liang, H. Jin, C. Xu, D. Ma and X. Lu (2012). "Tiam1, negatively regulated by miR-22, miR-183 and miR-31, is

involved in migration, invasion and viability of ovarian cancer cells." <u>Oncol Rep</u> **27**(6): 1835-1842.

Lin, Q., W. Mao, Y. Shu, F. Lin, S. Liu, H. Shen, W. Gao, S. Li and D. Shen (2012). "A cluster of specified microRNAs in peripheral blood as biomarkers for metastatic non-small-cell lung cancer by stem-loop RT-PCR." <u>J Cancer Res Clin</u> <u>Oncol</u> **138**(1): 85-93.

Liu, A. M., T. J. Yao, W. Wang, K. F. Wong, N. P. Lee, S. T. Fan, R. T. Poon, C. Gao and J. M. Luk (2012). "Circulating miR-15b and miR-130b in serum as potential markers for detecting hepatocellular carcinoma: a retrospective cohort study." <u>BMJ Open</u> **2**(2): e000825.

Liu, W. H. and L. S. Chang (2012). "Suppression of Akt/Foxp3-mediated miR-183 expression blocks Sp1-mediated ADAM17 expression and TNFalpha-mediated NFkappaB activation in piceatannol-treated human leukemia U937 cells." <u>Biochem Pharmacol</u> **84**(5): 670-680.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." <u>Methods</u> **25**(4): 402-408.

Lodrini, M., I. Oehme, C. Schroeder, T. Milde, M. C. Schier, A. Kopp-Schneider, J. H. Schulte, M. Fischer, K. De Preter, F. Pattyn, M. Castoldi, M. U. Muckenthaler, A. E. Kulozik, F. Westermann, O. Witt and H. E. Deubzer (2013). "MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma." <u>Nucleic Acids Res</u> **41**(12): 6018-6033. Lowery, A. J., N. Miller, R. M. Dwyer and M. J. Kerin (2010). "Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells." <u>BMC Cancer</u> **10**: 502.

Luo, D., J. M. Wilson, N. Harvel, J. Liu, L. Pei, S. Huang, L. Hawthorn and H. Shi (2013). "A systematic evaluation of miRNA:mRNA interactions involved in the migration and invasion of breast cancer cells." <u>J Transl Med</u> **11**: 57.

Lynam-Lennon, N., S. G. Maher and J. V. Reynolds (2009). "The roles of microRNA in cancer and apoptosis." <u>Biol</u> <u>Rev Camb Philos Soc</u> **84**(1): 55-71.

Ma, Z., S. L. Gibson, M. A. Byrne, J. Zhang, M. F. White and L. M. Shaw (2006). "Suppression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) promotes mammary tumor metastasis." <u>Mol Cell Biol</u> **26**(24): 9338-9351.

Mahn, R., L. C. Heukamp, S. Rogenhofer, A. von Ruecker, S. C. Muller and J. Ellinger (2011). "Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer." <u>Urology</u> **77**(5): 1265 e1269-1216.

Maroney, P. A., Y. Yu, J. Fisher and T. W. Nilsen (2006). "Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells." <u>Nat Struct Mol Biol</u> **13**(12): 1102-1107.

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

Mattie, M. D., C. C. Benz, J. Bowers, K. Sensinger, L. Wong, G. K. Scott, V. Fedele, D. Ginzinger, R. Getts and C. Haqq (2006). "Optimized high-throughput microRNA expression profiling provides novel biomarker assessment of clinical prostate and breast cancer biopsies." <u>Mol Cancer</u> **5**: 24.

Mayr, C., M. T. Hemann and D. P. Bartel (2007). "Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation." <u>Science</u> **315**(5818): 1576-1579.

Mazieres, J., T. Antonia, G. Daste, C. Muro-Cacho, D. Berchery, V. Tillement, A. Pradines, S. Sebti and G. Favre (2004). "Loss of RhoB expression in human lung cancer progression." <u>Clin Cancer Res</u> **10**(8): 2742-2750.

Meerson, A., L. Cacheaux, K. A. Goosens, R. M. Sapolsky, H. Soreq and D. Kaufer (2010). "Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions." J Mol Neurosci **40**(1-2): 47-55.

Metias, S. M., E. Lianidou and G. M. Yousef (2009). "MicroRNAs in clinical oncology: at the crossroads between promises and problems." J Clin Pathol **62**(9): 771-776.

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

Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **105**(30): 10513-10518.

Montano, X. and M. B. Djamgoz (2004). "Epidermal growth factor, neurotrophins and the metastatic cascade in prostate cancer." <u>FEBS Lett</u> **571**(1-3): 1-8.

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

Moreno-Layseca, P. and C. H. Streuli (2014). "Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression." <u>Matrix Biol</u> **34C**: 144-153.

Motoyama, K., H. Inoue, Y. Takatsuno, F. Tanaka, K. Mimori, H. Uetake, K. Sugihara and M. Mori (2009). "Over- and under-expressed microRNAs in human colorectal cancer." Int J Oncol **34**(4): 1069-1075.

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

Nadiminty, N., R. Tummala, W. Lou, Y. Zhu, J. Zhang, X. Chen, R. W. eVere White, H. J. Kung, C. P. Evans and A. C. Gao (2012). "MicroRNA let-7c suppresses androgen receptor expression and activity via regulation of Myc expression in prostate cancer cells." J Biol Chem **287**(2): 1527-1537.

Ozsolak, F., L. L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X. S. Liu, R. G. Roeder, X. Zhang, J. S. Song and D. E. Fisher (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." <u>Genes Dev</u> **22**(22): 3172-3183.

Pang, J. C., W. K. Kwok, Z. Chen and H. K. Ng (2009). "Oncogenic role of microRNAs in brain tumors." <u>Acta</u> <u>Neuropathol</u> **117**(6): 599-611.

Pang, S. T., X. Fang, A. Valdman, G. Norstedt, A. Pousette, L. Egevad and P. Ekman (2004). "Expression of ezrin in prostatic intraepithelial neoplasia." <u>Urology</u> **63**(3): 609-612.

Pasquinelli, A. E. (2012). "MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship." <u>Nat Rev Genet</u> **13**(4): 271-282.

Pelliccia, F., V. Ubertini and N. Bosco (2012). "The importance of molecular cytogenetic analysis prior to using cell lines in research: The case of the KG-1a leukemia cell line." <u>Oncol Lett</u> **4**(2): 237-240.

Peng, X., W. Guo, T. Liu, X. Wang, X. Tu, D. Xiong, S. Chen, Y. Lai, H. Du, G. Chen, G. Liu, Y. Tang, S. Huang and X. Zou (2011). "Identification of miRs-143 and -145 that is associated with bone metastasis of prostate cancer and involved in the regulation of EMT." <u>PLoS One</u> **6**(5): e20341.

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

Potter, S. R., W. Horniger, M. Tinzl, G. Bartsch and A. W. Partin (2001). "Age, prostate-specific antigen, and digital rectal examination as determinants of the probability of having prostate cancer." <u>Urology</u> **57**(6): 1100-1104.

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

Prueitt, R. L., M. Yi, R. S. Hudson, T. A. Wallace, T. M. Howe, H. G. Yfantis, D. H. Lee, R. M. Stephens, C. G. Liu, G. A. Calin, C. M. Croce and S. Ambs (2008). "Expression of microRNAs and protein-coding genes associated with perineural invasion in prostate cancer." <u>Prostate</u> **68**(11): 1152-1164.

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

Rebhan, M., V. Chalifa-Caspi, J. Prilusky and D. Lancet (1998). "GeneCards: a novel functional genomics compendium with automated data mining and query reformulation support." <u>Bioinformatics</u> **14**(8): 656-664.

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

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

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

Ribas, J., X. Ni, M. Haffner, E. A. Wentzel, A. H. Salmasi, W. H. Chowdhury, T. A. Kudrolli, S. Yegnasubramanian, J. Luo, R. Rodriguez, J. T. Mendell and S. E. Lupold (2009). "miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth." <u>Cancer Res</u> **69**(18): 7165-7169.

Rocha, R. L., S. G. Hilsenbeck, J. G. Jackson, C. L. VanDenBerg, C. Weng, A. V. Lee and D. Yee (1997). "Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival." <u>Clin Cancer Res</u> **3**(1): 103-109.

Rosenfeld, N., R. Aharonov, E. Meiri, S. Rosenwald, Y. Spector, M. Zepeniuk, H. Benjamin, N. Shabes, S. Tabak, A. Levy, D. Lebanony, Y. Goren, E. Silberschein, N. Targan, A. Ben-Ari, S. Gilad, N. Sion-Vardy, A. Tobar, M. Feinmesser, O. Kharenko, O. Nativ, D. Nass, M. Perelman, A. Yosepovich, B. Shalmon, S. Polak-Charcon, E. Fridman, A. Avniel, I. Bentwich, Z. Bentwich, D. Cohen, A. Chajut and I. Barshack (2008). "MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin." <u>Nat Biotechnol</u> **26**(4): 462-469.

Rottiers, V. and A. M. Naar (2012). "MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **13**(4): 239-250.

Russell, P. J., S. Bennett and P. Stricker (1998). "Growth factor involvement in progression of prostate cancer." <u>Clin</u> <u>Chem</u> **44**(4): 705-723.

Saini, H. K., A. J. Enright and S. Griffiths-Jones (2008). "Annotation of mammalian primary microRNAs." <u>BMC</u> <u>Genomics</u> **9**: 564.

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

Sarver, A. L., L. Li and S. Subramanian (2010). "MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration." <u>Cancer Res</u> **70**(23): 9570-9580.

Schaefer, A., M. Jung, G. Kristiansen, M. Lein, M. Schrader, K. Miller, C. Stephan and K. Jung (2010). "MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology." <u>Urol Oncol</u> **28**(1): 4-13.

Schaefer, A., M. Jung, K. Miller, M. Lein, G. Kristiansen, A. Erbersdobler and K. Jung (2010). "Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer." <u>Exp Mol Med</u> **42**(11): 749-758.

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

Schefe, J. H., K. E. Lehmann, I. R. Buschmann, T. Unger and H. Funke-Kaiser (2006). "Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula." <u>J Mol Med (Berl)</u> **84**(11): 901-910.

Schnarr, B., K. Strunz, J. Ohsam, A. Benner, J. Wacker and D. Mayer (2000). "Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer." Int J Cancer **89**(6): 506-513.

Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin and P. D. Zamore (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." <u>Cell</u> **115**(2): 199-208.

Shi, X. B., A. H. Ma, C. G. Tepper, L. Xia, J. P. Gregg, R. Gandour-Edwards, P. C. Mack, H. J. Kung and R. W. deVere White (2004). "Molecular alterations associated with LNCaP cell progression to androgen independence." <u>Prostate</u> **60**(3): 257-271.

Shi, X. B., C. G. Tepper and R. W. White (2008). "MicroRNAs and prostate cancer." J Cell Mol Med **12**(5A): 1456-1465.

Shi, X. B., L. Xue, J. Yang, A. H. Ma, J. Zhao, M. Xu, C. G. Tepper, C. P. Evans, H. J. Kung and R. W. deVere White (2007). "An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **104**(50): 19983-19988.

Shi, X. Y., L. Gu, J. Chen, X. R. Guo and Y. L. Shi (2014). "Downregulation of miR-183 inhibits apoptosis and enhances the invasive potential of endometrial stromal cells in endometriosis." <u>Int J Mol Med</u> **33**(1): 59-67.

Shimono, Y., M. Zabala, R. W. Cho, N. Lobo, P. Dalerba, D. Qian, M. Diehn, H. Liu, S. P. Panula, E. Chiao, F. M. Dirbas, G. Somlo, R. A. Pera, K. Lao and M. F. Clarke (2009). "Downregulation of miRNA-200c links breast cancer stem cells with normal stem cells." <u>Cell</u> **138**(3): 592-603.

Srivastava, A., S. Suy, S. P. Collins and D. Kumar (2011). "Circulating MicroRNA as Biomarkers: An Update in Prostate Cancer." <u>Mol Cell Pharmacol</u> **3**(3): 115-124.

Stanton, M. J., S. Dutta, N. S. Polavaram, S. Roy, M. H. Muders and K. Datta (2013). "Angiogenic growth factor axis in autophagy regulation." <u>Autophagy</u> **9**(5): 789-790.

Suzuki, H., M. Ouchida, H. Yamamoto, M. Yano, S. Toyooka, M. Aoe, N. Shimizu, H. Date and K. Shimizu (2008). "Decreased expression of the SIN3A gene, a candidate tumor suppressor located at the prevalent allelic loss region 15q23 in non-small cell lung cancer." <u>Lung Cancer</u> **59**(1): 24-31.

Szczyrba, J., E. Loprich, S. Wach, V. Jung, G. Unteregger, S. Barth, R. Grobholz, W. Wieland, R. Stohr, A. Hartmann, B. Wullich and F. Grasser (2010). "The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing." <u>Mol</u> <u>Cancer Res</u> **8**(4): 529-538.

Takamizawa, J., H. Konishi, K. Yanagisawa, S. Tomida, H. Osada, H. Endoh, T. Harano, Y. Yatabe, M. Nagino, Y. Nimura, T. Mitsudomi and T. Takahashi (2004). "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival." <u>Cancer Res</u> **64**(11): 3753-3756.

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

Tang, X., D. Zheng, P. Hu, Z. Zeng, M. Li, L. Tucker, R. Monahan, M. B. Resnick, M. Liu and B. Ramratnam (2013). "Glycogen synthase kinase 3 beta inhibits microRNA-183-96-182 cluster via the beta-Catenin/TCF/LEF-1 pathway in gastric cancer cells." <u>Nucleic Acids Res</u>.

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

Taylor, B. S., N. Schultz, H. Hieronymus, A. Gopalan, Y. Xiao, B. S. Carver, V. K. Arora, P. Kaushik, E. Cerami, B. Reva, Y. Antipin, N. Mitsiades, T. Landers, I. Dolgalev, J. E. Major, M. Wilson, N. D. Socci, A. E. Lash, A. Heguy, J. A. Eastham, H. I. Scher, V. E. Reuter, P. T. Scardino, C. Sander, C. L. Sawyers and W. L. Gerald (2010). "Integrative genomic profiling of human prostate cancer." <u>Cancer Cell</u> **18**(1): 11-22.

Thigpen, A. E., K. M. Cala, J. M. Guileyardo, K. H. Molberg, J. D. McConnell and D. W. Russell (1996). "Increased expression of early growth response-1 messenger ribonucleic acid in prostatic adenocarcinoma." <u>J Urol</u> **155**(3): 975-981.

Thobe, M. N., R. J. Clark, R. O. Bainer, S. M. Prasad and C. W. Rinker-Schaeffer (2011). "From prostate to bone: key players in prostate cancer bone metastasis." <u>Cancers (Basel)</u> **3**(1): 478-493.

Thompson, I. M., D. K. Pauler, P. J. Goodman, C. M. Tangen, M. S. Lucia, H. L. Parnes, L. M. Minasian, L. G. Ford, S. M. Lippman, E. D. Crawford, J. J. Crowley and C. A. Coltman, Jr. (2004). "Prevalence of prostate cancer among men with a prostate-specific antigen level < or =4.0 ng per milliliter." <u>N Engl J Med</u> **350**(22): 2239-2246.

Tindall, D. J. and R. S. Rittmaster (2008). "The rationale for inhibiting 5alpha-reductase isoenzymes in the prevention and treatment of prostate cancer." <u>J Urol</u> **179**(4): 1235-1242.

Tong, A. W., P. Fulgham, C. Jay, P. Chen, I. Khalil, S. Liu, N. Senzer, A. C. Eklund, J. Han and J. Nemunaitis (2009). "MicroRNA profile analysis of human prostate cancers." <u>Cancer Gene Ther</u> **16**(3): 206-216.

Torres, A. G., M. M. Fabani, E. Vigorito and M. J. Gait (2011). "MicroRNA fate upon targeting with anti-miRNA oligonucleotides as revealed by an improved Northern-blot-based method for miRNA detection." <u>RNA</u> **17**(5): 933-943.

Torres, A. G., R. N. Threlfall and M. J. Gait (2011). "Potent and sustained cellular inhibition of miR-122 by lysinederivatized peptide nucleic acids (PNA) and phosphorothioate locked nucleic acid (LNA)/2'-O-methyl (OMe) mixmer anti-miRs in the absence of transfection agents." <u>Artif DNA PNA XNA</u> **2**(3): 71-78.

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

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

Uhlen, M., E. Bjorling, C. Agaton, C. A. Szigyarto, B. Amini, E. Andersen, A. C. Andersson, P. Angelidou, A. Asplund, C. Asplund, L. Berglund, K. Bergstrom, H. Brumer, D. Cerjan, M. Ekstrom, A. Elobeid, C. Eriksson, L. Fagerberg, R. Falk, J. Fall, M. Forsberg, M. G. Bjorklund, K. Gumbel, A. Halimi, I. Hallin, C. Hamsten, M. Hansson, M. Hedhammar, G. Hercules, C. Kampf, K. Larsson, M. Lindskog, W. Lodewyckx, J. Lund, J. Lundeberg, K. Magnusson, E. Malm, P. Nilsson, J. Odling, P. Oksvold, I. Olsson, E. Oster, J. Ottosson, L. Paavilainen, A. Persson, R. Rimini, J. Rockberg, M. Runeson, A. Sivertsson, A. Skollermo, J. Steen, M. Stenvall, F. Sterky, S. Stromberg, M. Sundberg, H. Tegel, S. Tourle, E. Wahlund, A. Walden, J. Wan, H. Wernerus, J. Westberg, K. Wester, U. Wrethagen, L. L. Xu, S. Hober and F. Ponten (2005). "A human protein atlas for normal and cancer tissues based on antibody proteomics." <u>Mol Cell Proteomics</u> **4**(12): 1920-1932.

Uhlen, M., P. Oksvold, L. Fagerberg, E. Lundberg, K. Jonasson, M. Forsberg, M. Zwahlen, C. Kampf, K. Wester, S. Hober, H. Wernerus, L. Bjorling and F. Ponten (2010). "Towards a knowledge-based Human Protein Atlas." <u>Nat Biotechnol</u> **28**(12): 1248-1250.

Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee and J. O. Lotvall (2007). "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." <u>Nat Cell Biol</u> **9**(6): 654-659.

Valdman, A., X. Fang, S. T. Pang, B. Nilsson, P. Ekman and L. Egevad (2005). "Ezrin expression in prostate cancer and benign prostatic tissue." <u>Eur Urol</u> **48**(5): 852-857.

Varambally, S., Q. Cao, R. S. Mani, S. Shankar, X. Wang, B. Ateeq, B. Laxman, X. Cao, X. Jing, K. Ramnarayanan, J. C. Brenner, J. Yu, J. H. Kim, B. Han, P. Tan, C. Kumar-Sinha, R. J. Lonigro, N. Palanisamy, C. A. Maher and A. M. Chinnaiyan (2008). "Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase EZH2 in cancer." <u>Science</u> **322**(5908): 1695-1699.

Vasudevan, S. and J. A. Steitz (2007). "AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2." <u>Cell</u> **128**(6): 1105-1118.

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

Walter, B. A., V. A. Valera, P. A. Pinto and M. J. Merino (2013). "Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer." <u>J Cancer</u> **4**(5): 350-357.

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

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

Wang, J., D. Duncan, Z. Shi and B. Zhang (2013). "WEB-based GEne SeT AnaLysis Toolkit (WebGestalt): update 2013." <u>Nucleic Acids Res</u> **41**(Web Server issue): W77-83.

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

Wang, J. M., J. T. Wu, D. K. Sun, P. Zhang and L. Wang (2012). "Pathway crosstalk analysis based on protein-protein network analysis in prostate cancer." <u>Eur Rev Med Pharmacol Sci</u> **16**(9): 1235-1242.

Watahiki, A., Y. Wang, J. Morris, K. Dennis, H. M. O'Dwyer, M. Gleave, P. W. Gout and Y. Wang (2011). "MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer." <u>PLoS One</u> **6**(9): e24950.

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

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

Weston, M. D., M. L. Pierce, H. C. Jensen-Smith, B. Fritzsch, S. Rocha-Sanchez, K. W. Beisel and G. A. Soukup (2011). "MicroRNA-183 family expression in hair cell development and requirement of microRNAs for hair cell maintenance and survival." <u>Dev Dyn</u> **240**(4): 808-819.

Weston, M. D., M. L. Pierce, S. Rocha-Sanchez, K. W. Beisel and G. A. Soukup (2006). "MicroRNA gene expression in the mouse inner ear." <u>Brain Res</u> **1111**(1): 95-104.

Xiao, F., Z. Zuo, G. Cai, S. Kang, X. Gao and T. Li (2009). "miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions." <u>Nucleic Acids Res</u> **37**(Database issue): D105-110.

Xu, B., X. Niu, X. Zhang, J. Tao, D. Wu, Z. Wang, P. Li, W. Zhang, H. Wu, N. Feng, Z. Wang, L. Hua and X. Wang (2011). "miR-143 decreases prostate cancer cells proliferation and migration and enhances their sensitivity to docetaxel through suppression of KRAS." <u>Mol Cell Biochem</u> **350**(1-2): 207-213.

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

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

Xu, Q., Y. Jiang, Y. Yin, Q. Li, J. He, Y. Jing, Y. T. Qi, Q. Xu, W. Li, B. Lu, S. S. Peiper, B. H. Jiang and L. Z. Liu (2013). "A regulatory circuit of miR-148a/152 and DNMT1 in modulating cell transformation and tumor angiogenesis through IGF-IR and IRS1." J Mol Cell Biol **5**(1): 3-13.

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

Yamada, Y., H. Enokida, S. Kojima, K. Kawakami, T. Chiyomaru, S. Tatarano, H. Yoshino, K. Kawahara, K. Nishiyama, N. Seki and M. Nakagawa (2011). "MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology." <u>Cancer Sci</u> **102**(3): 522-529.

Yamashita, A. S., M. V. Geraldo, C. S. Fuziwara, M. A. Kulcsar, C. U. Friguglietti, R. B. da Costa, G. S. Baia and E. T. Kimura (2013). "Notch pathway is activated by MAPK signaling and influences papillary thyroid cancer proliferation." <u>Transl Oncol</u> **6**(2): 197-205.

Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C. G. Liu, C. M. Croce and C. C. Harris (2006). "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis." <u>Cancer Cell</u> **9**(3): 189-198.

Yin, Y., M. Li, H. Li, Y. Jiang, L. Y. Cao, H. F. Zhang and X. C. Xu (2010). "[Expressions of 6 microRNAs in prostate cancer]." <u>Zhonghua Nan Ke Xue</u> **16**(7): 599-605.

Yin, Y., Z. P. Yan, N. N. Lu, Q. Xu, J. He, X. Qian, J. Yu, X. Guan, B. H. Jiang and L. Z. Liu (2013). "Downregulation of miR-145 associated with cancer progression and VEGF transcriptional activation by targeting N-RAS and IRS1." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1829**(2): 239-247.

Yu, J., V. Baron, D. Mercola, T. Mustelin and E. D. Adamson (2007). "A network of p73, p53 and Egr1 is required for efficient apoptosis in tumor cells." <u>Cell Death Differ</u> **14**(3): 436-446.

Zhang, B., S. Kirov and J. Snoddy (2005). "WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts." <u>Nucleic Acids Res</u> **33**(Web Server issue): W741-748.

Zhang, B., X. Pan, G. P. Cobb and T. A. Anderson (2007). "microRNAs as oncogenes and tumor suppressors." <u>Dev</u> <u>Biol</u> **302**(1): 1-12.

Zhang, J., Y. Y. Du, Y. F. Lin, Y. T. Chen, L. Yang, H. J. Wang and D. Ma (2008). "The cell growth suppressor, mir-126, targets IRS-1." <u>Biochem Biophys Res Commun</u> **377**(1): 136-140.

Zhang, Q. H., H. M. Sun, R. Z. Zheng, Y. C. Li, Q. Zhang, P. Cheng, Z. H. Tang and F. Huang (2013). "Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues." <u>Gene</u> **527**(1): 26-32.

Zhang, X., S. Liu, T. Hu, S. Liu, Y. He and S. Sun (2009). "Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression." <u>Hepatology</u> **50**(2): 490-499. Zhang, Y., D. Akinmade and A. W. Hamburger (2005). "The ErbB3 binding protein Ebp1 interacts with Sin3A to

repress E2F1 and AR-mediated transcription." <u>Nucleic Acids Res</u> **33**(18): 6024-6033. Zhou, T., G. J. Zhang, H. Zhou, H. X. Xiao and Y. Li (2014). "Overexpression of microRNA-183 in human colorectal cancer and its clinical significance." <u>Eur J Gastroenterol Hepatol</u> **26**(2): 229-233.

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

Zhu, S., M. L. Si, H. Wu and Y. Y. Mo (2007). "MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1)." J Biol Chem **282**(19): 14328-14336.

Zhu, W., X. Liu, J. He, D. Chen, Y. Hunag and Y. K. Zhang (2011). "Overexpression of members of the microRNA-183 family is a risk factor for lung cancer: a case control study." <u>BMC Cancer</u> **11**: 393.