



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Análisis de expresión de microRNAs y sus Proteínas blanco en líneas celulares de Cáncer de Próstata.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

MARCO ANTONIO GÓMEZ VILCHIS



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Prof. Samuel Canizales Quinteros
VOCAL: Prof. Nancy Monroy Jaramillo
SECRETARIO: Prof. Mauricio Rodríguez Dorantes
1er. SUPLENTE: Prof. María Benita Leonor Fernández Salgado
2° SUPLENTE: Prof. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

ASESOR DEL TEMA:

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES

(nombre y firma)

SUSTENTANTE:

MARCO ANTONIO GÓMEZ VILCHIS

(nombre y firma)

“Mucho mejor atreverse a hacer cosas grandes, a obtener triunfos gloriosos, aun cuando matizados con fracasos, que formar en las filas de aquellos pobres de espíritu que ni gozan mucho ni sufren mucho porque viven en el crepúsculo gris que no conoce la victoria ni la derrota”.

*Theodore Roosevelt
Estadista estadounidense (1858 - 1919).*

AGRADECIMIENTOS.

Primero, quiero agradecer a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por abrirme las puertas y brindarme una valiosa oportunidad para crecer en lo profesional y en lo personal. También a mis profesores por toda la experiencia y conocimientos compartidos.

Al Dr. Mauricio Rodríguez Dorantes, por la oportunidad, así como su guía en la realización de este trabajo y confianza, pero sobre todo por la amistad que me brindo.

A Ivan Salido, Pilar García y Susana Solórzano, por todo el apoyo brindado, los consejos y guía en la realización de este trabajo, pero sobre todo por su generosidad y amistad.

Al Dr. Samuel Canizales y a la Dra. Nancy Monroy por sus valiosas aportaciones para mejorar éste trabajo, así como el tiempo invertido en la revisión del mismo.

A mis amigos de la Facultad, Israel Martínez, Alan Ascencio, Cynthia Muñoz, Allan Lozano, Ismael Acosta, Adriana Montaña, Enrique Bohorquez, Maggy Villa, Cuauh Aguilar, Irvin Osorio, David de la Mora, Paola Ziegler, Elizabeth Yau, Adán Saldaña "El Sinaloa", Jonathan Lozano, Fernando Ontiveros, Joyce Álvarez, Juan Valdes, Zulem Mendoza, por su amistad y por todos los momentos que vivimos durante nuestra estancia en la facultad. Un agradecimiento especial para Mónica Solís por todos estos años, en los cuales hemos vivido muchas experiencias gratas, pero sobre todo por aguantarme tanto tiempo.

Por último, quiero agradecer a mis padres por todo el amor y el apoyo brindado y porque hoy veo llegar a su fin una de las metas de mi vida, les agradezco la orientación que siempre me han otorgado.

DEDICATORIA.

A mis padres, porque gracias a su apoyo y consejos he llegado a realizar la más grande de mis metas, la cual constituye la herencia más valiosa que pudiera recibir. Simplemente no existirá una forma de agradecerles una vida de lucha, sacrificios y esfuerzos constantes. De nuevo gracias por ayudarme a hacer posible un logro más; el cual no será el último pero quizá el más importante. Gracias por la fe que depositaron en mí y por dárme todo sin esperar a cambio más que el orgullo de hacer de mí un triunfador.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Generalidades de la próstata	3
2.2 Patología de la próstata	4
2.3 Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata	5
2.4 Curso de la enfermedad.....	6
2.5 Andrógenos en la próstata normal	7
2.6 Los andrógenos en el cáncer de próstata y los mecanismos de desarrollo hacia la independencia de andrógenos.....	9
2.7 microRNA.....	15
2.7.1 Biogénesis de los microRNA	15
2.7.2 Mecanismo de acción de los microRNA	17
2.7.3 Alteración de los microRNA en el cáncer de próstata	19
2.7.4 Interacción de los microRNA y los co-reguladores del Receptor de Andrógenos	20
3. JUSTIFICACIÓN	22
4. HIPÓTESIS	22
5. OBJETIVOS	23
5.1 Objetivo General	23
5.2 Objetivos Particulares	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 Líneas celulares	24
6.2 Tratamientos con dihidrotestosterona y flutamida	24
6.3 Extracción de RNA total de líneas celulares de cáncer de próstata	26
6.4 Retro-Transcripción (RT) de los miRNAs	27
6.5 Retro-Transcripción (RT) de mRNA.	27
6.6 Ensayo de PCR en tiempo real.....	28

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
7.1 Caracterización de los miRNA y sus genes blanco en líneas celulares de cáncer de próstata	32
7.2 Validación de la actividad del receptor de andrógenos en presencia de dihidrotestosterona y flutamida	37
7.3 Evaluación del efecto de la Dihidrotestosterona sobre los miRNA y sus genes blanco.....	41
8. CONCLUSIONES.....	46
9. PERSPECTIVAS	46
10. BIBLIOGRAFÍA	47
APENDICE 1	54
APENDICE 2.....	56

1. RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es el tipo de neoplasia más frecuente en la población masculina y la segunda causa de muerte a nivel mundial en hombres. El crecimiento de estos tumores, depende en un inicio, de la presencia de andrógenos para la supervivencia y la proliferación de las células tumorales. Dado que es una enfermedad indolente, muchos pacientes acuden al médico en etapas avanzadas de la enfermedad en las cuales ya no son candidatos a cirugía. En esta etapa se emplea una terapia antiandrogénica para inducir la regresión de la enfermedad, sin embargo, eventualmente muchos pacientes dejan de responder a la terapia y presentan elevación de antígeno prostático específico (PSA) y recurrencia del CaP. Este estadio es denominado cáncer de Próstata andrógeno independiente, etapa en la que la supervivencia y la proliferación de estas células tumorales es independiente de la acción de los andrógenos (Feldman and Feldman *et al.*, 2001).

Se han propuesto muchas hipótesis que podrían explicar esta independencia de andrógenos, las cuales están relacionadas al Receptor de Andrógenos (AR por sus siglas en inglés). Una de ellas es la relación entre co-reguladores y el AR, al igual que su interacción con otras vías de señalización (Yeh y Chang *et al.*, 1996; Muller *et al.*, 2000; Gregory *et al.* 2001; McKenna y O'Malley *et al.*, 2001; Sharma y Sun *et al.*, 2001). El cambio en el nivel de expresión de estas proteínas pueden actuar en conjunto con otros mecanismos para conferir la independencia de andrógenos; uno de los posibles mecanismos de regulación de los niveles de dichos factores es el mediado por la acción de microRNAs (miRNA) como: miR-100, miR-149 y miR-200b, así como los co-reguladores *NCOR1*, *NCOR2*, *SMARCA5* y *NCOA2* utilizados en este estudio. Como prueba de principio, se validó por medio de PCR en tiempo real la expresión de los miRNA y mRNA de sus respectivos genes blanco en líneas celulares de cáncer de Próstata. Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en los niveles entre las líneas celulares de cáncer de Próstata pero en cuanto a la relación miRNA-blanco, no se observaron diferencias significativas. Para determinar el efecto que la actividad

misma del receptor de andrógenos tiene sobre la expresión de los miRNAs o sus blancos se realizó el tratamiento de líneas celulares utilizando la hormona Dehidrotestosterona (DHT) y flutamida, un antagonista del receptor, como con el objetivo de inducir o inhibir la actividad del AR, y se determinó la expresión de los miRNAs y sus transcritos blanco, donde solo se observó efecto en miR-200b y su gen blanco *NCOA2*. Para evaluar el efecto de los andrógenos se utilizó un gen de respuesta a andrógenos *KLK3* (PSA) como control y se midió la respuesta de este, observándose cambios en los niveles del gen proporcionalmente a la concentración, es decir cuando se aumenta la concentración del agonista, los niveles de expresión del gen aumentan.

Desde su descubrimiento, los miRNA han revolucionado y cambiado la concepción tradicional de los mecanismos de regulación de la expresión génica. Éste trabajo se enfoca en la validación de los miRNA y sus genes blanco aportando información acerca de los mecanismos de regulación mediados por miRNA e identificación de sus genes blanco en cáncer de próstata, pretendiendo demostrar a largo plazo ésta relación y su importancia en la progresión de la enfermedad.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Generalidades de la próstata

La próstata es un órgano glandular del aparato genitourinario, pequeño y con forma semejante a la de una nuez, con un peso aproximado de 20g. Se localiza enfrente del recto, por debajo y a la salida de la vejiga. Su principal función es producir el líquido prostático, el cual es un elemento importante que proporciona soporte nutricional y protección a los espermatozoides en el semen (Fawcett and Raviola *et al.*, 1994). Histológicamente, la próstata se divide en dos tipos celulares principales: el estroma y el epitelio. El estroma está compuesto de células de músculo liso, fibroblastos y células endoteliales, mientras que el epitelio, está compuesto por 4 tipos celulares: células secretoras, células basales, células de transición y células neuroendocrinas (De Marzo *et al.*, 2007).

Anatómicamente en la próstata se distinguen 5 zonas principales: rodeando la uretra, se encuentra la zona periuretral (Figura 1, e), que ocupa el 5% de la próstata; la zona central, por la cual cruzan los conductos eyaculadores, que supone un 20% de la glándula (Figura 1, a); la zona de transición que ocupa el 5% del volumen glandular, y es en esta zona donde la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) ocurre casi de manera exclusiva (Figura 1, c); la zona fibromuscular (Figura 1, b) y la zona periférica (Figura 1, d) que ocupan un 70% del volumen glandular. Especialmente en la zona periférica se desarrolla el 68% de los casos de cáncer (De Marzo *et al.*, 2007).

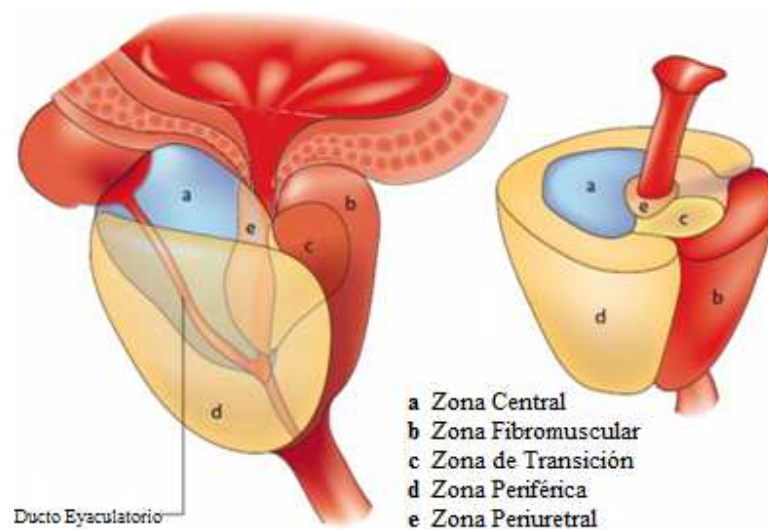


Figura 1. Esquema de las zonas de la próstata y su predisposición a enfermedades. La mayoría de las lesiones de cáncer ocurren en la zona periférica de la glándula (d), pocas ocurren en la zona de transición (c) y casi ninguna en la zona central (a). (Imagen modificada de De Marzo *et al.*, 2007).

2.2 Patología de la próstata

Al igual que todos los órganos, la próstata presenta ciertas enfermedades entre las que destaca la Prostatitis, inflamación de la misma normalmente producida por infecciones bacterianas. La HPB es una hipertrofia o crecimiento del órgano, que causa diversos síntomas, principalmente vaciamiento incompleto de vejiga y nicturia. Este padecimiento afecta a más del 50% de los hombres mayores de 50 años y su prevalencia aumenta con la edad hasta afectar a casi la totalidad de los hombres mayores de 70 años. Por último, el Cáncer de Próstata (CaP) es una enfermedad multifactorial y compleja que involucra alteraciones a nivel molecular. La mayoría de los casos de cáncer de próstata comienzan en la zona periférica y retienen algo de la estructura glandular. Por lo tanto, se clasifican como adenocarcinomas (Schulz *et al.*, 2003). El CaP es el tipo de neoplasia maligna más frecuente en los varones; información reciente indica, que el Distrito Federal presentó la tasa más alta de morbilidad hospitalaria por cada 100 mil hombres con 32.95 casos. Por grupos de edad, la morbilidad hospitalaria por cáncer de próstata sólo afectó al 1.3% de los hombres menores de 45 años, mientras en los mayores de 80 años se incrementa hasta 19.7%, seguidos de los hombres de 70 a 74 años

con 19.3%, y los de 65 a 69 años con 18.5%, lo que convierte al CaP en la segunda causa de muerte en el país (INEGI 2013).

Las causas por las cuales se desarrolla el CaP aún no son elucidadas, pero se han propuesto diversas hipótesis al respecto. De Marzo *et al.*, propone diversos enfoques por los cuales puede ocurrir el desarrollo de la enfermedad. Por ejemplo, la constante exposición a especies reactivas de oxígeno, patógenos o enfermedades autoinmunes, entre otras. Lo cual conlleva a alteraciones en el genoma y por lo tanto generan cambios a nivel molecular (De Marzo *et al.*, 2007).

Mientras que muchos carcinomas de próstata retienen un patrón de crecimiento indolente, se estima que un tercio suele convertirse a invasivo o metástasis a los ganglios linfáticos locales y a tejidos distales, muy frecuentemente óseo (Schulz *et al.*, 2003).

2.3 Factores de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata

A pesar de la elevada tasa de morbilidad, a la fecha las causas exactas que llevan al desarrollo de adenocarcinoma prostático no han sido elucidadas. Tradicionalmente el CaP se ha asociado con factores como la edad avanzada, la etnicidad y la historia familiar. Por otra parte, se tiene conocimiento de muchos factores de riesgo entre los que se encuentran los niveles elevados de andrógenos, la dieta, el tabaquismo, el sedentarismo, factores sexuales y la obesidad. Aunque los cambios en el estilo de vida y la prevención de la exposición a contaminantes químicos parecen ayudar a disminuir la incidencia de la enfermedad, su participación en la etiología del CaP no se ha establecido claramente (Schulz *et al.*, 2003). La patogénesis del cáncer involucra una interacción entre factores ambientales y genéticos. Más aún, se piensa que los factores genéticos contribuyen en un 42% al riesgo del desarrollo y progreso de la enfermedad (Rubin and De Marzo *et al.*, 2004).

2.4 Curso de la enfermedad

Como se mencionó anteriormente el CaP es el tipo de neoplasia más comúnmente diagnosticada en hombres y la segunda causa de muerte en el país en adultos mayores, por lo cual es de suma importancia detectarlo a tiempo (INEGI 2013). Actualmente, las principales pruebas diagnósticas del CaP son la exploración digital rectal, la evaluación del Antígeno Prostático Específico (PSA) en suero y el análisis histológico de biopsia prostática.

Una vez detectado el CaP, el tratamiento se selecciona considerando una variedad de factores, entre ellos: la edad, la expectativa de vida, y las comorbilidades (Antonarakis ES. *et al.*, 2011). Cuando el cáncer está localizado en la próstata es decir que no se ha diseminado fuera de la glándula, el tratamiento estándar incluye: radioterapia, un haz externo dirigido hacia la glándula, o prostatectomía radical que consiste en extirpar la próstata y parte del tejido que la rodea (Wilt TJ. *et al.*, 2008). Por el contrario, cuando el cáncer se ha diseminado fuera de la próstata, el tratamiento de elección es la hormonoterapia ya que los pacientes no son candidatos a operación. Este tratamiento consiste en administrar fármacos antiandrogénicos con el objetivo de disminuir los niveles hormonales ya que tanto las células normales como las células de cáncer de próstata requieren de andrógenos (Testosterona) para su crecimiento y supervivencia (Saraon *et al.*, 2011). Los niveles bajos de andrógenos disminuyen la masa del tumor, probablemente por inducción de la apoptosis e inhibición del crecimiento. Sin embargo, con el tiempo, los carcinomas contienen o desarrollan células que continúan creciendo durante el agotamiento hormonal inevitablemente, por lo tanto las células crecen y sobreviven en ausencia de esta hormona, dando como resultado la transición de andrógeno dependencia a andrógeno independencia (Antonarakis ES. *et al.*, 2011; Saraon *et al.*, 2011). Cuando los pacientes ya no responden a la terapia hormonal se les administra tratamiento paliativo, y también se les da quimioterapia o radioterapia como tratamiento, todo dependerá de la expectativa de vida del paciente.

2.5 Andrógenos en la próstata normal

Los andrógenos son de suma importancia para el desarrollo y mantenimiento de la próstata. Éstos se producen principalmente en forma de testosterona por las células de Leydig en los testículos y en general, se encuentran circulando a través de la sangre donde se unen a la globulina y a la albúmina de unión a hormonas sexuales (SHBG), con una pequeña fracción libre (Greenlee *et al.*, 2000; Feldman and Feldman *et al.*, 2001). Además, los andrógenos suprarrenales, tales como androstenediona, dehidroepiandrosterona (DHEA) y su sulfato, que son secretados por la corteza suprarrenal, aunque no tan potentes como la testosterona, participan en los efectos androgénicos del organismo. La producción de andrógenos en las células de Leydig se regula a través del eje Hipotálamo-Hipófisis-Gonadas. El hipotálamo secreta pulsos de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) cada 90-120 minutos. La GnRH se une a las células gonadotropas en la pituitaria anterior y estimula la liberación de la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículoestimulante (FSH). Cuando la LH se une a las células de Leydig, estimula la producción de andrógenos, y a su vez, éstos alimentan de nuevo la pituitaria para inhibir la secreción de GnRH y LH (Figura 2) (Feldman and Feldman *et al.*, 2001).

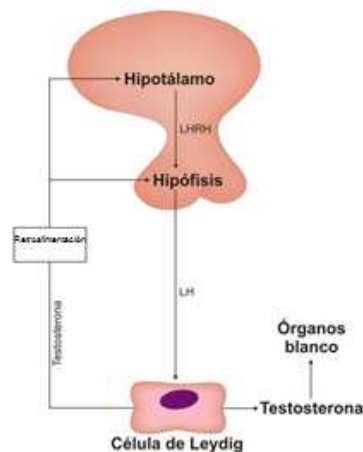


Figura 2. Representación esquemática del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Donde LH es hormona leutinizante y LHRH o GnRH hormona liberadora de gonadotropina (Imagen modificada de Bellido *et al.*, 1999).

Cuando la testosterona libre entra en las células de la próstata, 90% se convierte en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -Reductasa (SRD5A2). DHT es el andrógeno más activo, y tiene aproximadamente cinco veces más afinidad por el receptor de andrógenos (AR) que la testosterona. El AR es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares (Quigley *et al.*, 1999; Brinkmann *et al.*, 1999). Éste se compone principalmente de 3 dominios: el primero se encuentra en el N-terminal y es un dominio de activación transcripcional, el segundo es un dominio de unión a DNA en la región media que contiene dos dedos de zinc y el tercero se encuentra en C-terminal y es un dominio de unión a ligando (Figura 3).

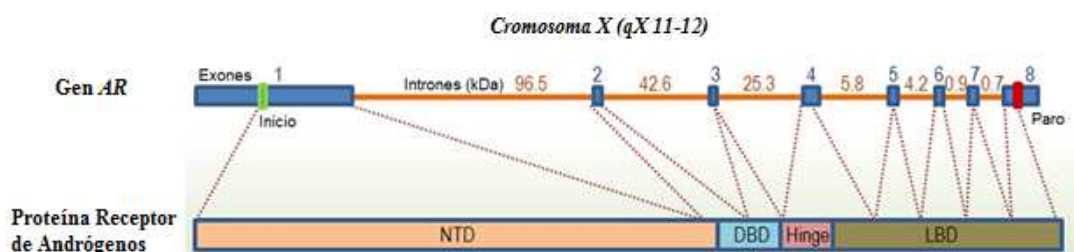


Figura 3. Representación esquemática de los dominios del receptor de andrógenos. Primero se encuentra en el N-terminal un dominio de activación transcripcional (NTD), el segundo es un dominio de unión a DNA en la región media (DBD), después la región bisagra (Hinge) y el tercero se encuentra en C-terminal y es un dominio de unión a ligando (LBD). (Imagen modificada de Nigel *et al.*, 2009).

Al igual que otros receptores nucleares, en el estado basal, el AR se une a las proteínas de choque térmico y otras proteínas en una conformación que impide la unión al DNA. La unión a andrógenos induce un cambio conformacional en el AR que conduce a la disociación de las proteínas de choque térmico y la fosforilación del receptor (Brinkmann *et al.*, 1999), en parte mediada por la proteína cinasa A (Nazareth *et al.*, 1996). El cambio conformacional inducido por la unión del ligando facilita la formación de homodímeros del AR que luego se pueden unir a Elementos de Respuesta a Andrógenos (AREs) en las regiones promotoras de los genes blanco (Figura 4). La unión de los homodímeros al DNA recluta proteínas co-reguladoras, coactivadoras o correpresoras, al complejo. En el AR como en

otros receptores nucleares, la unión del ligando induce la activación de éste, y la conformación activa implica un cambio en la posición de la hélice donde se encuentra el receptor para formar una superficie a la que puedan unirse los co-reguladores (Hyytinen, E. R. *et al.*, 1997). Los co-reguladores permiten la interacción del complejo del AR con el aparato de transcripción para estimular o inhibir la transcripción de genes blanco (Figura 4) (McKenna *et al.*, 1999).

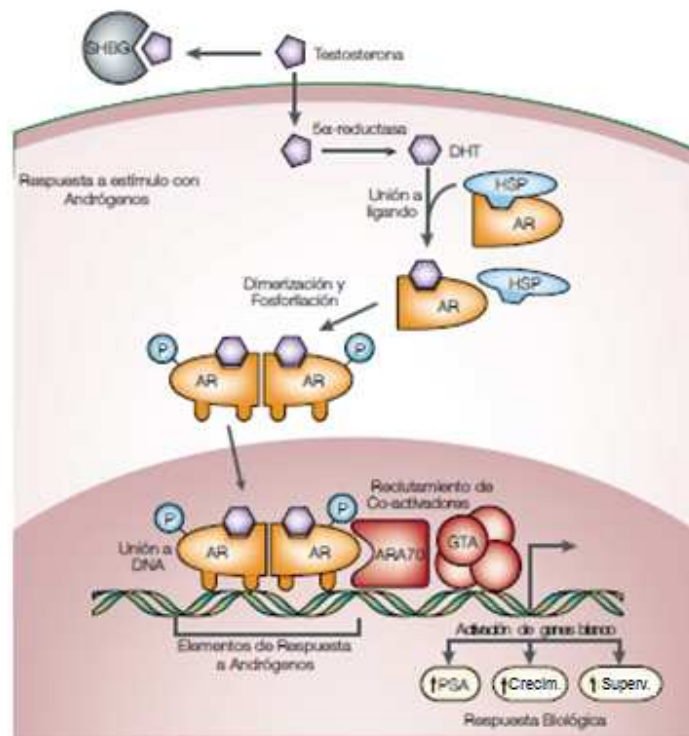


Figura 4. Acción de los andrógenos. La testosterona libre entra en las células de la próstata y se convierte en dihidrotestosterona (DHT) por la enzima 5 α -Reductasa. La unión de DHT a los receptores de andrógenos (AR) induce la disociación de las proteínas de choque térmico (HSPs) y la fosforilación del receptor. El AR se dimeriza y se une a los elementos de respuesta a andrógenos en las regiones promotoras de los genes blanco. La activación (o represión) de los genes blanco conduce a respuestas biológicas, incluyendo el crecimiento, la supervivencia y la producción de antígeno prostático específico (PSA). (Imagen modificada de Feldman and Feldman *et al.*, 2001).

2.6 Los andrógenos en el cáncer de próstata y los mecanismos de desarrollo hacia la independencia de andrógenos

Una próstata normal requiere de concentraciones basales de andrógenos para su crecimiento y supervivencia. De la misma forma, durante el desarrollo del cáncer

de próstata, las células cancerígenas inicialmente requieren de andrógenos. Cuando el cáncer es detectado tardíamente, el bloqueo androgénico se utiliza como tratamiento, ya que esta terapia es efectiva en la destrucción de células cancerígenas, las cuales son dependientes de andrógenos. Sin embargo, después de un tiempo, el continuo bloqueo de andrógenos resulta en la selección de una sub-población celular que puede sobrevivir en ausencia de andrógenos, volviéndose éstas independientes de los mismos. Además, la evolución de estas células andrógeno-independientes puede resultar en un incremento en la angiogénesis por lo cual puede ocurrir metástasis principalmente a hueso y nódulos linfáticos. Las alteraciones moleculares que gobiernan estos cambios permanecen aún desconocidas, pero queda claro el papel del AR como uno de los principales componentes en este proceso. Por lo tanto se han clasificado algunos posibles mecanismos basados en el AR por los cuales se puede desarrollar AI (Figura 5) (P. Saraon *et al.*, 2011).

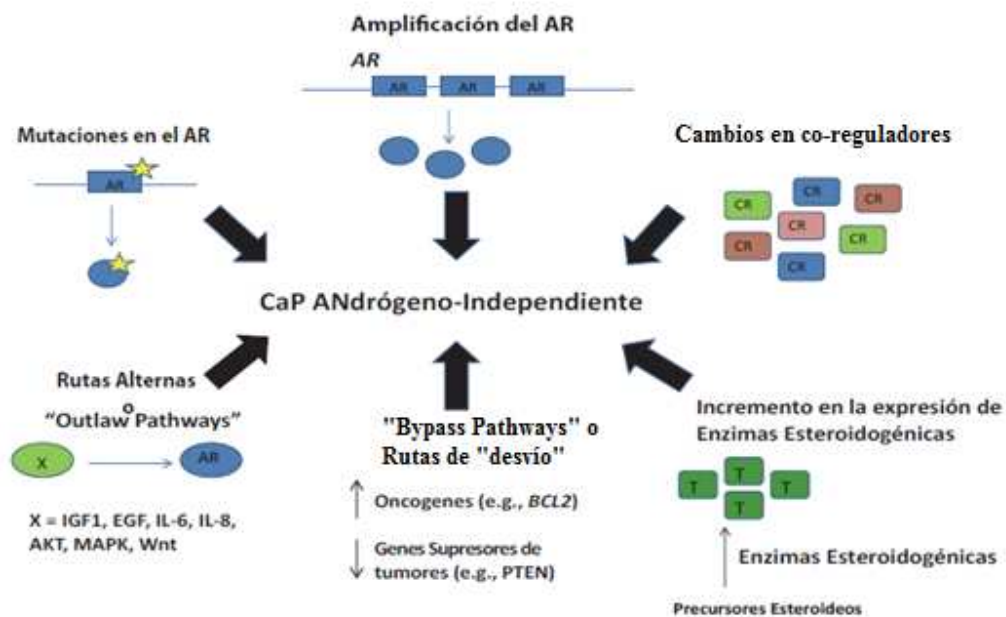


Figura 5. Mecanismos de independencia de andrógenos en el cáncer de próstata. La transición hacia andrógeno-independencia puede iniciar a través de muchos cambios celulares. La vía de señalización del AR es por mucho una de las más estudiadas en el contexto de AI. Esta vía ha mostrado estar regulada aberrantemente en varios niveles, incluyendo amplificación del gen del AR, mutaciones, y cambios en co-reguladores del AR y cambios en enzimas esteroidogénicas. La proteína del AR también ha sido mostrada ser activada de una manera independiente de ligando vía "outlaw pathways", por diferentes proteínas. Varias vías independientes del AR "Bypass Pathways" o rutas de "desvío", también han sido relacionadas al desarrollo de AI. (Imagen modificada de P. Saraon *et al.*, 2011).

Como se mencionó anteriormente, se han propuesto diversos mecanismos de desarrollo hacia la andrógeno-independencia, en los cuales el receptor de andrógenos juega un papel importante, como es el caso de las mutaciones en el mismo *AR*. (Ruijter, E. *et al.*, 1999). A pesar de que las células tienen mecanismos potentes que en condiciones normales protegen el genoma de mutaciones; es posible que, al igual que muchos otros tipos de cáncer, los tumores de próstata inicialmente sufran cambios genéticos que aumentan la probabilidad de mutaciones posteriores (Ruijter, E. *et al.*, 1999). Sin embargo, diversos trabajos han encontrado pocas mutaciones en el *AR* en cáncer de próstata primario (Marcelli, M. *et al.*, 2000); en comparación, con el cáncer de próstata metastásico, con una frecuencia mayor de mutaciones en el *AR* (Taplin, M. E. *et al.*, 1995). Las mutaciones en el *AR* también pueden ser comunes en otras vías cruciales (Ruijter, E. *et al.*, 1999). Un ejemplo de esto, ocurre cuando el *AR* está unido al antiandrógeno flutamida, y éste actúa como un agonista en lugar de un antagonista (Taplin, M. E. *et al.*, 1995). Esto indica que la adquisición de mutaciones en el *AR* probablemente sea un mecanismo para el desarrollo de AI (Craft, N. *et al.*, 1999).

Otro mecanismo es la amplificación del gen *AR*, por lo cual aumenta la expresión del mismo y permite el aumento en la proliferación de las células tumorales a pesar de los niveles bajos de andrógenos circulantes por una interacción mayor con su ligando. Aproximadamente el 30% de los tumores que se convierten en independientes de andrógenos después de la terapia de privación, han mostrado amplificación del gen, lo que resulta en un aumento de la expresión del *AR*, mientras que ninguno de los tumores primarios de los mismos pacientes antes de la privación de andrógenos tenía amplificación del gen *AR* (Koivisto, P. *et al.*, 1999; Visakorpi, T. *et al.*, 1995). Estos resultados indican que la amplificación fue probablemente el resultado de la selección clonal de células que podrían proliferar, a pesar de los niveles bajos de andrógenos. Curiosamente, los pacientes con tumores que tenían amplificación del *AR* sobrevivieron más tiempo que los pacientes con tumores que eran refractarios a la terapia de privación, pero no tienen la amplificación del gen *AR* (Koivisto, P. *et al.*, 1999). Una explicación

posible es que estos tumores amplificados están más diferenciados de otros tipos de cáncer de próstata, tal vez permitiendo que los pacientes tengan un resultado mejor.

Un tercer mecanismo para eludir la terapia de privación de andrógenos es mediante el aumento de la producción local de andrógenos, para compensar la disminución general de la testosterona circulante, por medio del aumento de enzimas esteroidogénicas (Saraon *et al.*, 2011). También las células de la próstata podrían aumentar la tasa de conversión de la testosterona a la hormona DHT mediante el aumento de la actividad enzimática de la 5 α -reductasa. Esto facilitaría continuar con la señalización del AR, incluso con niveles significativamente más bajos de testosterona en suero. En apoyo a este mecanismo es el hallazgo de que, después de la terapia de privación de andrógenos, los niveles séricos de testosterona disminuyen en un 95%, pero la concentración de DHT en el tejido prostático se reduce a sólo el 60% (Labrie, F. *et al.*).

Un cuarto mecanismo es el que involucra receptores de hormonas esteroides incluyendo el AR, los cuales son activados por mecanismos independientes de ligando y éstos han sido referidos como "*outlaw pathways*" (McGuire, W. L. *et al.*, 1991). Hasta el momento, no se han reportado mutaciones en el AR para adquirir este tipo de actividad, sin embargo, otras vías pueden desestabilizar al AR para convertirse en un receptor de este tipo. Para varios factores de crecimiento, citocinas, cinasas y otras proteínas se ha demostrado que tienen actividad sobre el AR a bajas concentraciones de andrógenos (Saraon *et al.*, 2011).

Los mecanismos analizados hasta ahora son dependientes del AR y de su cascada de señalización para el desarrollo de AI. Sin embargo, las vías alternativas también pueden estar involucradas en la progresión a AI, independientemente de la señalización del AR. Estas vías se han considerado como "*Bypass Pathways*" o rutas de desvío, debido a que se definen como las vías que son completamente independientes de la señalización del AR. Es interesante observar que algunas vías de activación del AR independientes de ligando, también pueden actuar como una vía "*bypass*" o de desvío. Los factores

de crecimiento tales como IGF-1 y sus respectivos receptores de tirosín-cinasa pueden activar una cascada de transducción de señales, induciendo la expresión de diversos genes que promueven el crecimiento y la supervivencia celular. Muchas de estas vías activan ciertas cinasas, tales como MAPK / Ras / Raf / proteína Cinasa C, que influyen en la regulación del ciclo celular y la proliferación celular (Edwards J. *et al.*, 2005).

Durante la privación de andrógenos, se inducen las vías de apoptosis, lo que indica que los factores antiapoptóticos se convierten en una forma importante para eludir la muerte programada de la célula debido a la ausencia de señalización del AR. Bcl-2 es una proteína antiapoptótica que puede ayudar a las células de cáncer de próstata bloqueando la apoptosis. En las células epiteliales de la próstata en condiciones normales, Bcl-2 no se expresa normalmente. Sin embargo se expresa, durante la AI (Colombel M. *et al.*, 1993). Tanto las vías de independientes de ligando como las no relacionadas al AR han demostrado que interactúan una con la otra, ya que pueden inducir la señalización del AR. La regulación a la alza de oncogenes tales como Bcl-2 y las disminuciones en los genes supresores de tumores pueden desempeñar papeles importantes en el desarrollo de AI (Colombel M. *et al.*, 1993).

Varias proteínas actúan junto con los receptores de hormonas esteroides como coactivadores o correpresores de la transcripción (McKenna, N. J. *et al.*, 1999). La modulación de estas proteínas de co-regulación y su función es probable que sean otro mecanismo por el cual el cáncer de próstata avanza a AI. Durante la privación de andrógenos, los cambios en las concentraciones de estos coactivadores y correpresores pueden promover la expresión de genes regulados por andrógenos. El aumento en la expresión de diversos coactivadores, o la disminución en la expresión de correpresores, puede proporcionar un medio para el aumento de la actividad del AR, promoviendo la supervivencia de las células cancerígenas en condiciones de privación de andrógenos (McKenna, N. J. *et al.*, 2001).

Los autores creen que en la mayoría de los casos de cáncer de próstata recurrente se sobre-expresan los coactivadores, facilitando de ese modo la trans-

activación del AR y mejorando la respuesta a los bajos niveles de andrógenos. Ésto representaría una combinación de la vía de hipersensibilidad y la vía promiscua, y hace hincapié en el hecho de que varios mecanismos pueden contribuir a un solo caso de AI. Los coactivadores del AR se pueden clasificar en distintos grupos. Coactivadores SRC/p160 tales como TIF2, GRIP1 y SRC1 que comparten componentes estructurales y son capaces de reclutar a otros factores de transcripción para iniciar la transactivación de genes regulados por el AR (Lemon B *et al.*, 2000). Estos coactivadores también son capaces de reclutar a otros coactivadores que tienen actividad de acetil-transferasa de histonas como Tip60, CBP/p300, y p/CAF, que están implicados en la acetilación de residuos específicos de histonas (Shen HC. *et al.*, 2005). Gregory *et al.* encontró que las concentraciones de TIF2 y SCR1 aumentaron en muestras de AI, los cuales a su vez aumentaron la expresión del AR (Gregory CW *et al.*, 2001). En otro estudio, se encontró que Tip60 también se sobre-expresa en AI (Halkidou K *et al.*, 2003). Otro grupo amplio de proteínas asociadas al AR (ARA) se han descrito como potentes coactivadores del AR. Estas proteínas ARA (ARA24, ARA54, ARA55, ARA70, ARA170 y ARA267) no comparten similitudes estructurales o funcionales, pero todas son coactivadores potentes del AR (Bennett NC *et al.*, 2009). A diferencia de los coactivadores, los correpresores pueden formar complejos con el AR e inhibir la transcripción de genes regulados por el AR. Cualquier alteración en la expresión de estas proteínas correpresoras también puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de AI. Dos correpresores del AR bien caracterizados son NCoR (correpressor del receptor nuclear) y su homólogo SMRT (mediador de silenciamiento para retinoides y los receptores de la hormona tiroidea) (Liao G *et al.*, 2003). Ambos correpresores pueden reclutar deacetilasas de histonas que promueven la compactación de la cromatina, lo que resulta en una reducción de la actividad transcripcional (Liao G *et al.*, 2003).

Actualmente se han hecho estudios en los cuales se relacionan los co-reguladores con los microRNA (miRNA), ya que algunos miRNAs tienen como blanco a co-reguladores del AR, por lo tanto el cambio en la expresión de éstos puede desempeñar un papel importante en el desarrollo de la AI. Por ejemplo, en el

estudio realizado por Narayanan et al., se identificaron circuitos de retroalimentación entre varios miRNA, el AR y sus correpresores. Este grupo de investigación encontró que el AR podría regular la expresión génica a través de una vía de tres pasos que incluye la activación de miRNAs, supresión de correpresores, y su interacción con el ADN (Narayanan R *et al.*, 2010).

2.7 microRNA

En años recientes, el descubrimiento de la regulación genética dependiente de miRNA en eucariontes ha motivado el desarrollo de nuevas estrategias de investigación que permitan elucidar los rasgos importantes de sus funciones biológicas, tanto en el desarrollo celular normal como en el que da lugar a patologías en humanos. La regulación por medio de estos miRNA es otro mecanismo que puede tener un impacto en la progresión hacia la AI.

2.7.1 Biogénesis de los microRNA

Los microRNA (miRNA) son secuencias cortas de RNA no codificantes, de 18 a 22 nucleótidos que se expresan en varios organismos eucariontes (Bushati and Cohen *et al.*, 2007). Los primeros estudios revelaron que la expresión de los miRNA let-7 y lin-4 influye en el desarrollo y el ciclo celular de *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993) y que la pérdida de su función alteraba su desarrollo normal. Estudios subsecuentes describieron patrones de expresión de miRNA específicos de una etapa del desarrollo o de un tipo de tejido en especial en vertebrados (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Estos hallazgos sugieren que los miRNA desempeñan un papel en el control de la expresión génica en eucariontes, al menos tan importante como el de los factores de transcripción.

El mecanismo de biogénesis de los miRNA inicia con el procesamiento de un precursor primario (pri-miRNA) que puede estar contenido en diferentes regiones génicas; intrónicas, exónicas, o regiones no traducidas (UTR). La RNA polimerasa II se encarga de la transcripción del pri-miRNA, el cual, al igual que un mRNA, se

encuentra poliadenilado y tiene CAP en el extremo 5' (Cai *et al.*, 2004). Cada pri-miRNA puede contener uno o más miRNA, cada uno dentro de una secuencia de 60 a 80 nucleótidos que se encuentra plegada sobre sí misma para formar una estructura en forma de horquilla, la cual es referida como pre-miRNA. Sin embargo, la mayoría de los pre-miRNA están organizados en agrupamientos dentro de una misma región cromosómica y presentan patrones de expresión similares, lo que sugiere que su transcripción se realiza en forma de policistrones que están regulados bajo un mismo promotor (Kim *et al.*, 2005). A continuación, las horquillas de pre-miRNA son reconocidas y escindidas dentro del núcleo celular por la acción de un complejo microprocesador que incluye a la enzima DROSHA y su elemento asociado DGCR8. Una vez escindido, el pre-miRNA en forma de horquilla, contiene un segmento de dos nucleótidos en el extremo 3' que es característico del corte producido por Drosha. Este rasgo permite al factor nuclear de exportación conocido como exportina 5, reconocer al pre-miRNA y transportarlo al citoplasma en una forma dependiente de RAN-GTP (Lund *et al.*, 2004). Una vez en el citoplasma, otro complejo que incluye a la RNasa tipo III, Dicer, y a la proteína trans-activadora de unión a RNA (TRBP), realiza un segundo corte sobre el pre-miRNA para generar una molécula de RNA de doble cadena de 18 a 24 nucleótidos de longitud, que contiene dos miRNA maduros potenciales. Este dúplex de RNA se asocia a un complejo proteínico denominado complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). Una de las dos cadenas de RNA es seleccionada por el RISC para actuar como cadena guía, esta cadena constituye el miRNA maduro. La cadena restante, también denominada cadena "pasajera" es degradada por la acción de la proteína Argonauta 2 (AGO2) del complejo RISC (Figura 6). Se piensa que el RISC selecciona la cadena con menor estabilidad termodinámica de apareamiento como la cadena guía, al mismo tiempo que degrada a la cadena pasajera, más estable. Sin embargo, Ro y colaboradores muestran evidencia de que ambas cadenas del dúplex de RNA son susceptibles de ser incorporadas al RISC y co-existir en ciertos tejidos, para actuar sobre diferentes poblaciones de mRNA (Ro *et al.*, 2007).

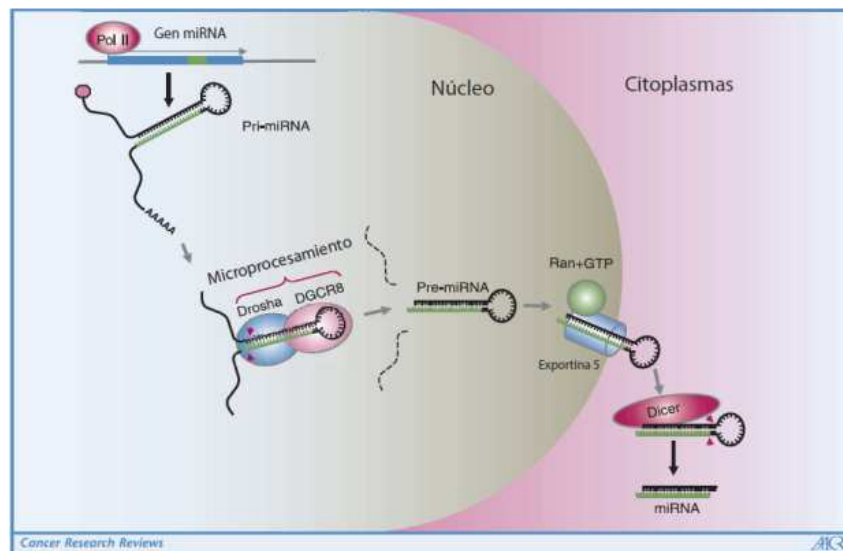


Figura 6. Biogénesis de microRNA. Un transcrito primario denominado pri-miRNA es generado por la RNA polimerasa II. El pri-miRNA es reconocido y procesado por el complejo de la RNAasa tipo II DROSHA y su cofactor DGCR8, lo que da lugar a un precursor denominado pre-miRNA. Finalmente el miRNA maduro es producido por la acción de otra RNAasa tipo II, DICER; y posteriormente es integrado al complejo RISC para ejercer su acción (Imagen modificada de Richard I. *et al.*, 2005).

2.7.2 Mecanismo de acción de los microRNA

De manera general, los miRNA establecen un pareamiento de bases con una secuencia de 6 a 8 nucleótidos que se localiza en la región 3'UTR del mRNA, denominada secuencia semilla (Rajewsky and Socci *et al.*, 2004; Brennecke *et al.*, 2005). El pareamiento del miRNA con su mRNA blanco conduce a la degradación de este último o a la represión de su traducción. El grado de complementariedad entre el miRNA y su mRNA blanco determina el mecanismo de regulación. Si la complementariedad es perfecta, el miRNA induce la escisión del mRNA por acción del RISC. Usualmente, la escisión ocurre dentro de la región de complementariedad miRNA-mRNA y requiere de la participación de AGO2 (Liu *et al.*, 2004). De manera alternativa, si la complementariedad es imperfecta, el RISC actúa silenciando ó bloqueando la traducción del mRNA (Figura 7). Este bloqueo no está del todo elucidado y parece llevarse a cabo durante la traducción, ya sea al inicio o durante la etapa de elongación. Se ha demostrado que existe una represión del mecanismo de reconocimiento del CaP 5', en el que el miRNA impide la unión del factor de inicio de la traducción. La represión de la traducción

mediada por miRNA, también puede ocurrir al inhibirse el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S al complejo de iniciación de la traducción (Filipowics *et al.*, 2008). Aquellos mRNA que han sido silenciados por los mecanismos mencionados son secuestrados dentro de un tipo de estructuras de procesamiento citoplasmáticas denominadas cuerpos P, en donde son almacenados y finalmente, degradados por acción de proteínas que también se encuentra dentro de los cuerpos P, tales como las enzimas que degradan al CAP 5´ DCP1/DCP2 y la exonucleasa 5´- 3´ XRN1; y las que eliminan progresivamente la poliadenilación en 3´ como el complejo CCR4P/POP2P/NOT. De hecho, todo el conjunto RISC se encuentra también dentro de estos cuerpos P, por lo que éste también puede ensamblar la maquinaria que conlleva al decaimiento de los mRNA (Parker and Seth *et al.*, 2007; Fabian *et al.*, 2010). De manera interesante, la versatilidad en el modo de acción de los miRNA no se limita a inhibir la expresión génica de ciertos productos biológicamente funcionales. También se ha demostrado que, de manera opuesta, su presencia y asociación a otros factores, p. ej, la proteína relacionada al síndrome del X frágil, puede inducir e incrementar la traducción del transcrito sobre el que ejercen su efecto, más que impedirlo (Vasudevan *et al.*, 2007).

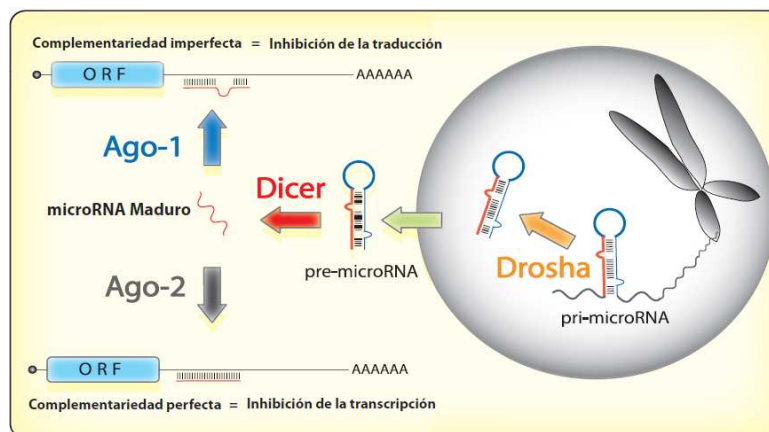


Figura 7. Mecanismo de acción de miRNA. El complejo miRNA-RISC dirige la acción de represión de la traducción del transcrito blanco. Si el nivel de complementariedad es perfecta entre el miRNA y la región semilla del transcrito, éste es degradado. Si es incompleta, se produce un bloqueo de la traducción. ORF: marco abierto de lectura (Imagen modificada de Trinna L *et al.*, 2005).

2.7.3 Alteración de los microRNA en el cáncer de próstata

Estos pequeños RNA no codificantes pueden regular la expresión génica de una manera postranscripcional. Tienen funciones críticas durante el desarrollo y la patología de muchas enfermedades, incluyendo el cáncer, en donde la regulación de estos miRNA promueven la formación y progresión tumoral. Al igual que varias proteínas se pueden clasificar como oncogenes y genes supresores de tumores, los miRNA pueden actuar de una manera similar. miRNA regulados a la alta que inhiben los genes supresores de tumores en las células cancerosas se han denominado miRNA oncogénicos o oncomiR. Por el contrario, los miRNA que son regulados a la baja y promueven la progresión del cáncer se conocen como miRNA supresores de tumores. Muchos estudios se han realizado con el propósito de elucidar cuales miRNA experimentan problemas en la regulación durante la progresión del cáncer de próstata. En la actualidad, aún existe controversia en la literatura respecto a la regulación de los miRNA en el cáncer de próstata, ya que estos estudios son a menudo contradictorios. Sin embargo, se han estudiado miRNA específicos en el contexto de la AI como miR-221, miR-222, miR-125b, y miR-146 (Coppola V. *et al.*, 2010; Sevli S. *et al.*, 2010).

Dos de los miRNA más frecuentemente sobre-expresados en muchos tipos de cáncer incluyen a miR-221 y miR-222, que han sido identificados como oncomiR porque se dirigen a p27, un gen inhibidor del ciclo celular (Galardi S. *et al.*, 2007). Interesantemente, se ha encontrado que estos miRNA que se sobre-expresan en AI, en el cáncer de próstata dependiente de andrógenos, se encuentran sub-expresados. Sun *et al.* determinó que sobre-expresando ambos miRNA en la línea celular LNCaP, dependiente de andrógenos, no se observó transición hacia la andrógeno-independencia (Sun T. *et al.*, 2009). Por el contrario, inhibiendo miR-221 y miR-222 en una clona de LNCaP independiente de andrógenos dió como resultado la disminución de la tasa de crecimiento de estas células y el aumento de la dependencia y la sensibilidad a la DHT. Además, a diferencia de miR-221 y miR-222, miR146 se ha demostrado consistentemente estar sub-expresado en líneas celulares andrógeno-independientes en comparación con las líneas celulares andrógeno-dependientes (Lin SL. *et al.*, 2008). En la línea celular

andrógeno-independiente PC3 al sobre-expresar a miR-146 disminuyó la proliferación celular y la supervivencia. Lo que implica que el miR-146 puede actuar como un supresor tumoral que es regulado a la baja durante la progresión de AI (Lin SL. *et al.*, 2008).

2.7.4 Interacción de los microRNA y los co-reguladores del Receptor de Andrógenos

Como se mencionó anteriormente, en el estudio realizado por Narayanan *et al.*, se identificaron interacciones entre miRNA, el AR y sus correpresores. Este grupo de investigación propuso una hipótesis basándose en las observaciones de la inhibición de la función del AR, la cual se produjo por inhibición de la síntesis de los miRNA, sugiriendo que los miRNA tienen como función la inhibición de los correpresores del AR. Por ejemplo NCoR y SMRT, son dos represores bien caracterizados del AR. En presencia de ligando, los niveles del AR aumentan, por lo tanto se incrementa la síntesis de ciertos miRNA y estos a su vez, se unen a la región 3'UTR de NCoR y SMRT permitiendo la degradación de estos dos correpresores. En consecuencia esto puede incrementar los niveles de los blancos del AR. Por otra parte, en ausencia de DICER, la síntesis de los miRNAs y la unión a la región 3'UTR de los correpresores pudiera verse comprometida, lo que lleva a la abundancia de los correpresores y la inhibición del gen blanco del AR (Figura 8) (Narayanan R. *et al.*, 2010). Al existir estas interacciones entre el AR y los miRNA, es interesante observar como el AR tiene efecto sobre algunos genes de los miRNA, es decir que el mismo AR regula la expresión de estos dependiendo del ambiente hormonal y así contribuye a la patogénesis del CaP, como en el estudio realizado por Ribas J. *et al* 2009.

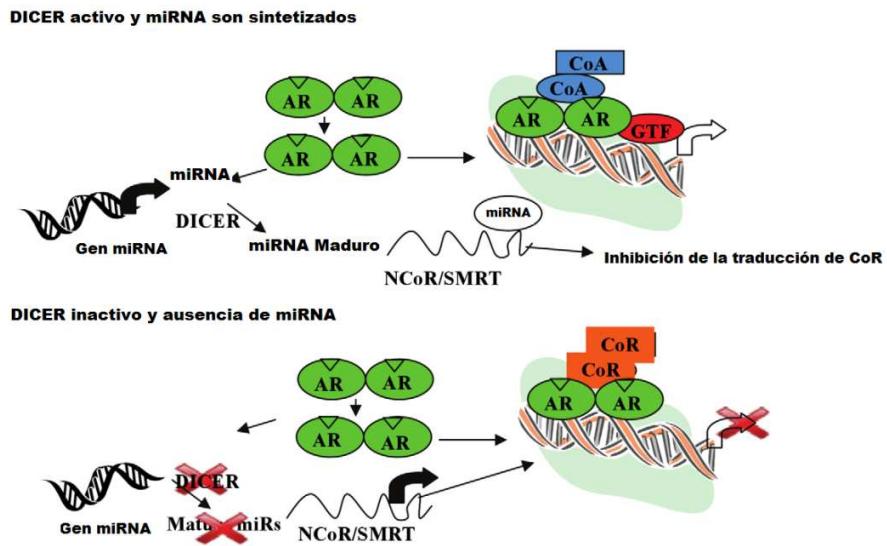


Figura 8. Mecanismo posible para la regulación de la función AR por medio de miRNA. 1. En presencia de DICER, el tratamiento con andrógenos aumenta la síntesis y maduración de los miRNA, así como la unión a la región 3'UTR de los correpresores, NCoR y SMRT. Esto a su vez inhibe la traducción de los correpresores resultando en un aumento en los niveles del AR. 2. En ausencia de DICER, la maduración de los miRNAs se inhibe, conduciendo a una mayor expresión de los correpresores, y posteriormente la función del AR se ve reprimida. CoA: coactivador, CoR: correpresor, GTF: factor de transcripción general (Imagen modificada de Narayanan R. *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de próstata es una enfermedad que ha ido en aumento a nivel nacional y mundial, además de presentar elevadas tasas de mortalidad. Este problema es aún mayor, ya que si no se detecta a tiempo, las opciones de tratamiento son escasas o poco eficientes, como es el caso de recurrencia.

Sin embargo, gracias a los estudios en biología molecular, se ha obtenido un mayor entendimiento acerca de esta enfermedad. En los últimos años, se ha descubierto la presencia de los miRNAs y su participación en la modulación de la expresión de genes importantes. Cada día, es mayor el número de reportes en donde se evidencian firmas moleculares de los miRNAs y la importante participación de éstos en las enfermedades como el cáncer de próstata. Es por ello, que comprender el papel que estos miRNAs juegan en el desarrollo y progresión del CaP, representa una posible herramienta que contribuya a un mejor entendimiento de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

Los microRNA, se han propuesto como un mecanismo de regulación de la expresión génica en diversos procesos importantes. Por lo tanto, la expresión aberrante de éstos puede tener un impacto importante en el desarrollo y progresión del cáncer; entonces esto nos permite evaluar la expresión de los microRNA y sus genes blanco, para encontrar diferencias de éstos entre dos condiciones distintas del CaP.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo General

Evaluar el perfil de expresión de *miR-100*, *miR-149* y *miR-200b*, al igual que sus genes blanco (*NCOR1*, *NCOR2*, *SMARCA5* y *NCOA2*) en líneas celulares de Cáncer de Próstata.

5.2 Objetivos Particulares

- ✓ Determinar el posible efecto que la actividad misma del *AR* tiene sobre la expresión de los miRNA o sus genes blanco, tratando la línea celular LNCaP con un inductor y un inhibidor de la actividad del *AR*.

- ✓ Determinar las diferencias de expresión de miRNAs y mRNA, utilizando el método comparativo $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre las condiciones de dependencia/independencia de andrógenos.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Líneas celulares

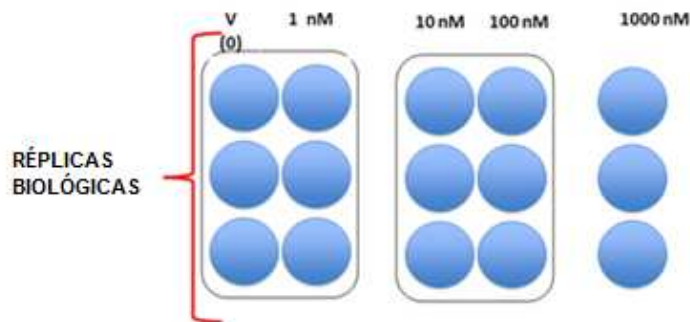
Las líneas celulares LNCaP y PC3 se obtuvieron del *American type culture collection* (ATCC) (Rockville, Maryland, USA). La línea LNCaP se cultivó en medio RPMI 1640 y la línea PC3 en medio DMEM, ambos suplementados con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en inglés) al 10% y una atmósfera conteniendo el 5% de CO₂ (Apéndice 1).

6.2 Tratamientos con dihidrotestosterona y flutamida

Para las concentraciones utilizadas, primero se consultó la literatura, para obtener referencias de éstas. Una vez determinadas las concentraciones, se realizaron las curvas para comprobar y elegir la concentración adecuada (Cai C. *et al.*, 2011).

Para los tratamientos farmacológicos solo se utilizó la línea celular LNCaP ya que PC3 es insensible a andrógenos. Se utilizaron placas de 6 pozos en las cuales se sembraron 2×10^5 células, contadas por medio de la cámara de Neubauer, en medio RPMI 1640 y se cultivaron hasta llegar a una confluencia de 70% - 80%, momento en el que el medio RPMI 1640 fue reemplazado con RPMI sin rojo fenol y suplementado con FBS filtrado por carbón activado (CSS, por sus siglas en inglés) al 10%. 48 horas después, las células fueron tratadas con DHT a concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 nM por un período de 24 horas. El esquema de los tratamientos se representa gráficamente en la Figura 9. Por cada concentración se realizó un triplicado biológico.

Esquema tratamiento con DHT: Serie de concentraciones.

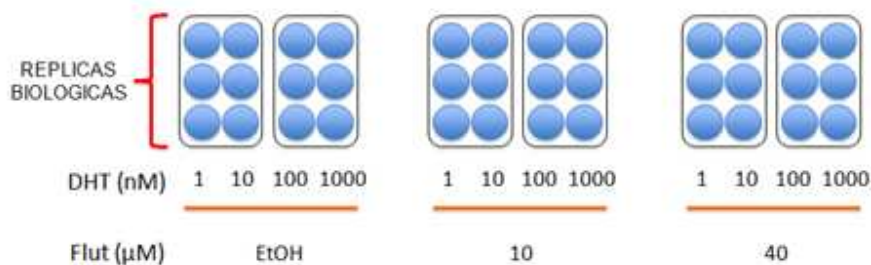


Tiempo de tratamiento : 24 h

Figura 9. Esquema de tratamiento con DHT después de 24h a concentración de 1, 10, 100 y 1000 nM, con su respectivo control. Por cada concentración se realizó un triplicado biológico.

Una vez que se obtuvo el tratamiento con DHT, lo siguiente fue obtener el tratamiento combinado, es decir DHT más flutamida, un antagonista del AR. Las concentraciones utilizadas para la DHT fueron: 1, 10, 100 y 1000 nM y para la Flutamida: 10 y 40 μ M, por un período de 24 horas. El esquema de los tratamientos se representa gráficamente en la Figura 10. Por cada concentración se realizó un triplicado biológico.

Esquema tratamiento con DHT + Flutamida: Serie de concentraciones.



Tiempo de tratamiento : 24 h

Figura 10. Esquema de tratamiento combinado con DHT + Flutamida después de 24h a concentración de 1, 10, 100 y 1000 nM y 10, 40 μ M respectivamente. Por cada concentración se realizó un triplicado biológico. EtOH: etanol, el cual fue utilizado como vehículo y como control.

6.3 Extracción de RNA total de líneas celulares de cáncer de próstata

Una vez transcurridas las 24h de tratamiento, las células fueron recolectadas y colocadas en tubos. Los tubos se centrifugaron a 3,000rpm durante 15 minutos a 15°C y se desecho el sobrenadante para obtener un botón que contiene el paquete celular.

A continuación se prosiguió con el protocolo del kit comercial *RNeasy Mini Kit*, (Qiagen Inc., Valencia CA, USA). El protocolo tiene como base una membrana de sílica que permite una unión selectiva de los RNA y de este modo permitir su aislamiento. El primer paso consistió en disolver la pastilla en 400µL de Buffer RLT, si el botón era pequeño se disminuía la cantidad de Buffer RLT, para lisar las células, después se homogenizó mediante vórtex. Lo siguiente fue adicionar un volumen de etanol al 70% con el fin de incrementar la selectividad de la unión del RNA con la matriz, se mezcló por pipeteo. Posteriormente se agregaron 700µL de la muestra a la columna colocada previamente en el tubo de recolección de 2mL; se centrifugó a 10,000rpm durante 15 segundos y se tiró el sobrenadante. Este paso se repitió hasta que la muestra pasó completamente por la columna. Después se agregaron 700µL de Buffer RW1 para lavar la columna, y se centrifugó a 10,000rpm durante 15 segundos. Se desechó el tubo con el sobrenadante y se transfirió la columna a un tubo nuevo de recolección de 2mL. Se realizó un lavado con 500µL de Buffer RPE, y se centrifugó a 10,000rpm durante 15 segundos y se retiró el sobrenadante. Nuevamente se agregó 500µL de Buffer RPE y se centrifugó a 10,000rpm durante 2 minutos. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000rpm durante 30 segundos y un pulso a máxima velocidad. La columna se transfirió a un tubo de 1.5mL con tapa y se agregaron 10µL de agua libre de RNAsas en el centro de la columna sin tocar la membrana, para eluir el RNA. El tubo con el RNA se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000rpm durante 1 minuto. Una vez colectada la elusión, la concentración de RNA se determinó por medición espectrofotométrica a 260nm, empleando el equipo *NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA USA). Para

evaluar la calidad de la extracción se utilizó la proporción de las absorbancias 260/280 nm.

6.4 Retro-Transcripción (RT) de los miRNAs

La reacción de RT se realizó con el estuche comercial, *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit*, (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA, USA). La técnica de RT para fragmentos de RNA mayores a 200pb, permite su transcripción a cDNA, mediante el uso de cebadores lineales. La diferencia fundamental, en este caso, es el uso de cebadores con diseño de tallo y asa que se unen al extremo 3' del miRNA durante la reacción de RT lo que incrementa la especificidad y la capacidad de discriminar entre secuencias de miRNA maduros muy similares. En segundo lugar, la estructura de doble cadena de la porción de tallo previene que los cebadores formen un pareamiento con precursores de miRNA. Finalmente, la base que proporciona la porción de asa aumenta la estabilidad del heterodúplex de miRNA y DNA, lo que mejora la eficiencia de la reacción de RT (*Applied Biosystems*).

La reacción de RT se realizó a partir de 300ng de RNA total aislado. Se utilizaron 0.8µL de los cebadores *RT primers Megaplex™* (10X), 0.2µL de dNTPs con dTTP (100mM), 1.5µL de la *Transcriptasa reversa Multiscribe* (50 U/µL), 0.8µL de solución amortiguadora para RT (10X), 0.1µL de *Inhibidor de RNAsa* (20U/µL) y cuanto baste de H₂O libre de nucleasas para un volumen final de 7.5µL, todos estos reactivos del estuche comercial mencionado. La reacción se incubó en el equipo termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (*Applied Biosystem Llc, Foster City, CA USA*) bajo las siguientes condiciones: 16°C por 2min (A lineamiento de los cebadores); seguido de 40 ciclos a 42°C por 1min y 50 °C por 1seg (Transcripción Reversa); e inactivación de la reacción a 85°C por 5min.

6.5 Retro-Transcripción (RT) de mRNA.

La RT se realizó mediante el kit comercial de *Invitrogen, SuperScript™ II Reverse Transcriptase* (Cat. No. 18064-022) siguiendo el protocolo se partió de una concentración de 500ng de RNA en 8µL. Se realizó una mezcla de 20µL (1X) que contenía los siguientes reactivos: 1µL dATP, 1µL dCTP, 1µL dGTP, 1µL dTTP y 1µL

de oligo dT. La reacción se incubó en el equipo termociclador *GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystem Llc, Foster City, CA USA)* a 65°C durante 5 minutos y después se colocó en hielo durante 5 minutos. A continuación se agregaron 4µL 5x *First-Strand Buffer*, 2µL DTT, 1µL *RNase OUT*. Se mezcló el contenido y se dió un pulso para bajar al fondo la mezcla y se incubó a 42°C durante 2 minutos. Por último, se añadió 1µl de *Super Script II RT*, y se mezcló con pipeteo y se incubó a 42°C durante 50 minutos. La reacción se inactivó a 70°C durante 10 minutos.

6.6 Ensayo de PCR en tiempo real.

El principio de la técnica empleada para la detección y cuantificación de miRNAs y mRNA por qPCR (*TaqManTM MicroRNA Assays, Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA*), se basa en el sistema TaqMan, en el que se emplean sondas que presentan en el extremo 5' una marca fluorescente (reportero) y en el extremo 3' un apagador (*quencher*), cuando estos dos están unidos por la sonda, la fluorescencia emitida por el reportero es absorbida por el *quencher* o apagador. De esta forma cuando la DNA polimerasa con actividad de exonucleasa hidroliza la sonda, el reportero es liberado y la fluorescencia emitida por éste puede ser determinada por el sistema de detección del instrumento. Ésto presenta muchas ventajas debido a que la fluorescencia registrada corresponde únicamente al producto de amplificación deseado; es decir, la reacción es altamente específica. Los ensayos de PCR en tiempo real (qPCR) es decir la amplificación y la detección se llevó a cabo en el equipo *VIIA7 Real Time PCR System (Applied Biosystem Llc, Foster City, CA USA)* bajo las siguientes condiciones de termociclado: 50°C por 2 min y 95°C por 15 seg (activación), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 1 min (desnaturalización) y 60°C por 2 min (alineamiento y extensión).

Para cada ensayo, se preparó una mezcla de reacción en un volumen final de 9.5µL, los cuales incluyen 3.4µL de H₂O libre de DNAsa y RNAsa, 5.5µL de *Master Mix Universal* para PCR TaqMan y 0.6µL de sonda *TaqMan (TaqMan Gene*

Expression Assay 20X y TaqMan MicroRNA Expression Assay). Las sondas utilizadas para microRNA son las siguientes: miR-100 (#Cat: 4427975, 000437) con la siguiente secuencia AACCCGUAGAUCCGAACUUGUG, miR-149 (#Cat: 4427975, 002255) con la secuencia UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC, miR-200b (#Cat: 4427975, 002251) con la secuencia UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA, y como gen constitutivo o gen normalizador *RNU48* (#Cat: 4427975, 001006). Las sondas de mRNA que se utilizaron son las siguientes: *NCOR1* (#Cat: 4331182, Hs01094540_m1), *NCOR2* (#Cat: 4331182, Hs00196955_m1), *SMARCA5* (#Cat: 4331182, Hs00186149_m1), *NCOA2* (#Cat: 4331182, Hs00896106_m1) y como gen constitutivo o gen normalizador *GAPDH* (#Cat: 4331182, Hs02758991_g1). Los 9.5µL de la mezcla se colocaron en un pozo de la placa de 96 pozos, junto con 1µL de la reacción RT ya sea miRNA o mRNA, y se mezcló con pipeta.

Las lecturas realizadas por el equipo son corregidas con respecto a una línea base de la señal (por ejemplo, eliminación de ruido de fondo) y transformadas a valores de “*Cycle Threshold*” o comúnmente conocido como Ct (Apéndice 2). Para identificar la diferencia de expresión, se realizó un análisis comparativo de los valores de Ct entre las dos condiciones, también conocido como método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen *et al.*, 2008). Este método permite normalizar la fluorescencia detectada durante el proceso de amplificación, respecto a un control endógeno. Para determinar los cambios estadísticamente significativos se aplicó una prueba t de student.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Muchos miRNA se encuentran localizados en regiones del genoma humano susceptibles de sufrir amplificaciones, deleciones o rearrreglos en tumores malignos, obteniendo así una expresión aberrante de los mismos, lo que refuerza la hipótesis acerca del importante papel de los miRNA en la patogénesis del cáncer (Calin *et al.*, 2004).

Existen diversos reportes en los cuales se caracterizan perfiles de expresión diferencial de los miRNA entre dos condiciones: andrógeno independencia y andrógeno dependencia en CaP, como es el trabajo de Xu G. *et al.*, 2010 en el cual a partir de líneas celulares de CaP, obtuvo un conjunto de 20 miRNA diferencialmente expresados en CaP, como miR-100, miR-200b, miR-30, miR-96, etc. (Xu G. *et al.*, 2010). En muchos reportes se presentan estos perfiles de expresión y de igual forma por métodos de predicción bio-informáticos, se obtienen los blancos de estos miRNA, pero muy pocos son sustentados por métodos experimentales (Leite K. *et al.*, 2013).

En un trabajo previo se eligieron 21 miRNA por su expresión diferencial de una serie de 373 miRNA, de los cuales tres resultaron ser buenos candidatos: miR-100, miR-149 y miR-200b. Una vez identificados los miRNA con expresión diferencial significativa en CaP, se realizó un análisis de predicción bio-informático (Tabla 1) utilizando "*miRWalk-The database on predicted and validated microRNA targets*", donde se identificaron los blancos de estos tres posibles candidatos (miR-100, miR-149 y miR-200b) para determinar su posible participación en el desarrollo y progresión de la enfermedad. De éstos, miR-100 y miR-149 cuyos niveles se encuentran alterados en CaP tienen como blancos a *NCOR2* y *SMARCA5*; y *NCOR1*, respectivamente, y miR-200b a *NCOA2* y *NCOR2*.

Tabla 1. Predicción de genes blanco de miRNA alterados en CaP.

MicroRNA	Gen	miRanda	miRDB	miRWalk	PICTAR4	RNA22	Targetscan	SUM
hsa-miR-100	<i>NCOR2</i>	1	0	1	0	0	0	2
hsa-miR-100	<i>SMARCA5</i>	1	1	1	1	0	1	5
hsa-miR-149	<i>NCOR1</i>	1	0	1	0	0	1	3
hsa-miR-200b	<i>NCOA2</i>	1	1	1	0	0	1	4
hsa-miR-200b	<i>NCOR2</i>	1	1	1	0	0	1	4

En esta tabla se puede observar la suma del puntaje otorgado (última columna) a los principales blancos de los miRNA que fueron sometidos por los programas de predicción (miRanda, miRDB, miRWalk, PICTAR4, RNA22, Targetscan). Éstos son programas que ayudan a predecir blancos moleculares de los miRNA, en base a datos descargados en estos.

Los productos de los blancos seleccionados resultaron relacionados con el AR; NCOR1, NCOR2 y SMARCA5 son correpresores del AR, mientras que NCOA2 es coactivador del mismo. Por lo tanto resultó interesante ya que se involucran dos mecanismos, tanto co-reguladores como miRNA y éstos al actuar juntos podrían tener una participación importante en el desarrollo y progresión de la enfermedad (Narayanan R *et al.*, 2010). Otro ejemplo de esto es miR-221, el cual al estar sobre-expresado en LNCaP demostró una reducción en la transcripción de un sub-grupo de genes responsivos a andrógenos afectando al AR. Por análisis informáticos se hallaron dos blancos de éste miRNA, *HECTD2* y *RAB1A*, los cuales al estar sub-expresados por la regulación del miRNA, afectan la transcripción mediada por el AR, promoviendo el crecimiento celular (Sun T. *et al.*, 2013).

Basándonos en lo anterior, este estudio a largo plazo, pretende demostrar por métodos experimentales la relación entre los miRNA, co-reguladores y el AR, y su importancia en la transición hacia la andrógeno independencia. Por el momento este trabajo solo se enfoca en la validación de los miRNA y sus genes blanco. Por

ello, es importante establecer como prueba de principio la posible correlación negativa entre los niveles de miRNA y sus blancos moleculares.

7.1 Caracterización de los miRNA y sus genes blanco en líneas celulares de cáncer de próstata

Para comprobar lo ya mencionado, se compararon los niveles de expresión de los miRNA con sus genes blanco en dos líneas celulares que representan dos condiciones distintas del CaP. La línea LNCaP que es sensible a andrógenos y la línea PC3 que es insensible a andrógenos. Para determinar si existía o no diferencias significativas entre las dos condiciones se utilizó la prueba estadística t-student y para calcular la diferencia de expresión se utilizó el método comparativo $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Apéndice 2). Se graficó con los datos de $2^{-\Delta Ct}$, esto con el fin de disminuir los errores por la diferencia de desviaciones entre los datos, como en el trabajo realizado por Schmittgen *et al.*, 2008 (Schmittgen *et al.*, 2008).

Se determinó la expresión de miR-100 y sus dos genes blanco *SMARCA5* y *NCOR2* en las dos líneas celulares, con el objetivo de comparar la expresión de éstos entre las dos condiciones. Para miR-100 se observó una diferencia significativa, con un valor estadístico de $p=0.0002$, en la expresión, obteniendo un $Fc=7$ entre las dos condiciones (Figura 11, A). Con respecto a *SMARCA5* también se observó una diferencia significativa con un valor de $p=0.0001$ y un $Fc= 3$ (Figura 11, B). De igual forma para *NCOR2* se observó una diferencia significativa con un valor estadístico de $p=0.0001$ y un $Fc=2$, entre las dos condiciones (Figura 11, C).

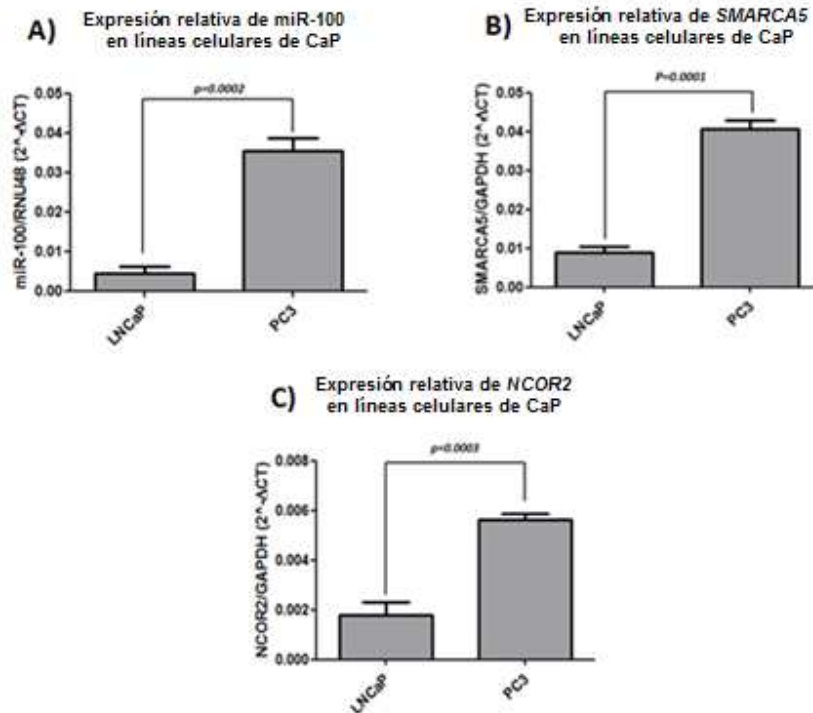


Figura 11. Expresión relativa de los miRNAs y sus genes blanco. A) Expresión de miR-100 donde se observa diferencia significativa ($p=0.0002$) entre las 2 condiciones. B) *SMARCA5* un gen blanco de miR-100 también presenta diferencias significativas ($p=0.0001$) y C) *NCOR2* otro gen blanco de miR-100 de igual forma presenta diferencias significativas ($p=0.0003$) en las líneas celulares de cáncer de próstata. *RNU48* y *GAPDH* se utilizaron como genes normalizadores y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la expresión de miR-100 entre las dos líneas celulares, concordando con algunos otros reportes como el descrito por Xu G. *et al.*, en el cual se observa una mayor expresión de miR-100 en la línea que representa la condición de AI (Xu G. *et al.*, 2010). Con respecto a los genes blanco de este microRNA (*NCOR2* y *SMARCA5*), como se observa en la figura 11, los niveles en PC3 son mayores con respecto a LNCaP, pero entre miR-100, *NCOR2* y *SMARCA5* no se observan cambios estadísticamente significativos, lo cual revela que a nivel de transcrito no se presentan estos cambios, por lo cual es conveniente determinar los niveles de proteína, ya que si recordamos existen dos mecanismos por los cuales los miRNA pueden actuar, ya sea por inhibición de la traducción o por degradación del transcrito (Trinna L. *et al.*, 2005).

Los resultados anteriores concuerdan de la misma forma con los obtenidos por Leite K. *et al.*, 2013, donde encontró una mayor expresión de miR-100 en la línea que representa la condición de AI (Leite K. *et al.*, 2013).

Por otra parte, se determinó la expresión de miR-149 y su gen blanco *NCOR1* en las dos líneas celulares y se comparó la expresión entre las dos condiciones. Para miR-149 se observó una diferencia significativa con un valor de $p=0.04$ y un $Fc=2$ (Figura 12, A) entre las dos líneas celulares. Con respecto a *NCOR1*, se observó una diferencia significativa con un valor estadístico de $p=0.0007$ y una diferencia en la expresión de tres veces ($Fc=3$) entre las dos condiciones (Figura 12, B).

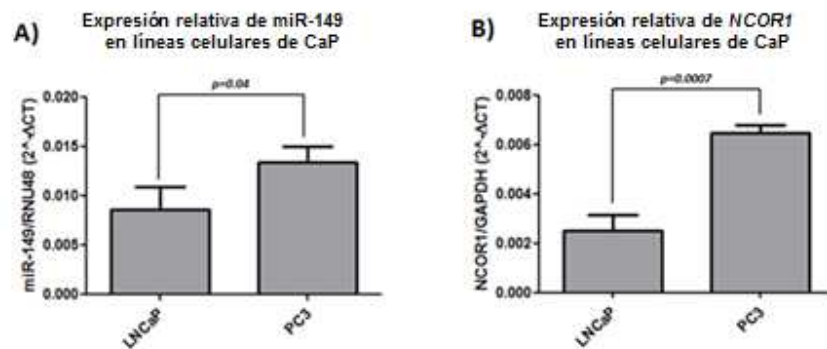


Figura 12. Expresión relativa de miR-149 A) y su gen blanco *NCOR1* B), en los cuales se observó diferencias significativas con valores de $p=0.04$ y $p=0.0007$, respectivamente entre las dos líneas celulares. *RNU48* y *GAPDH* se utilizaron como genes normalizadores y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

También para miR-149 y *NCOR1* se observaron diferencias significativas entre las dos condiciones. De la misma forma se observó un aumento en los niveles de expresión de ambos en PC3 con respecto a LNCaP (Figura 12). Aunque no hubo cambios a nivel de transcrito, se debe evaluar los niveles de proteína. La relación negativa miRNA-mRNA para LNCaP se observó un poco más marcada, pero no existieron diferencias significativas entre éstos.

De igual forma se determinó la expresión de miR-200b y sus dos genes blanco *NCOA2* y *NCOR2*. Se observó diferencia significativa para miR-200b, *NCOA2* y

NCOR2 con un valor estadístico de $p=0.002$, $p=0.0003$ y $p=0.0003$ respectivamente. La diferencia de expresión para miR-200b fue de diez veces, para *NCOA2* y *NCOR2* el cambio de expresión fue de dos veces (Figura 13).

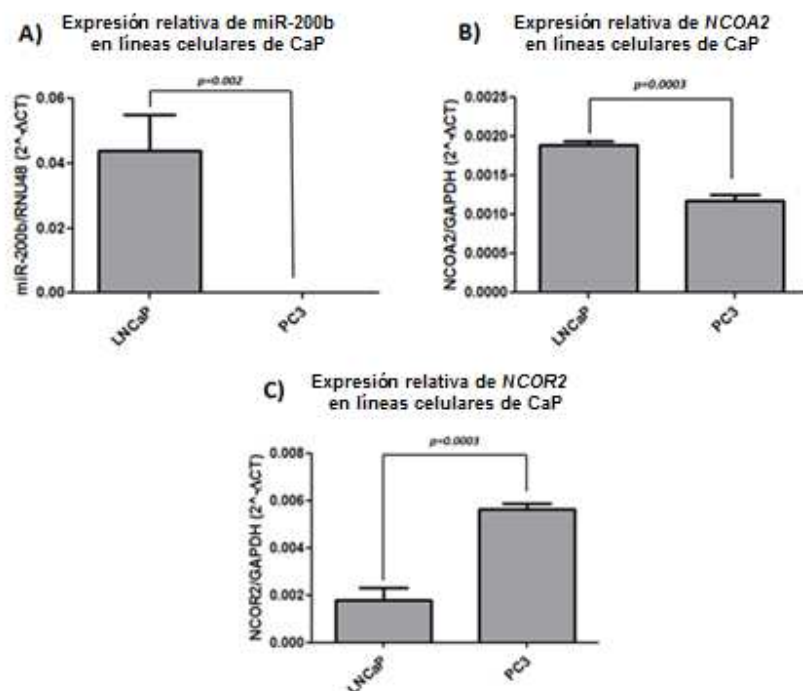


Figura 13. Expresión relativa de miR-200b A) y sus dos genes blanco *NCOA2* B) y *NCOR2* C), donde se observaron diferencias significativas con valores de $p=0.002$, $p=0.0003$ y $p=0.0003$ respectivamente entre las dos líneas celulares. *RNU48* y *GAPDH* se utilizaron como genes normalizadores y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

Para miR-200b se observaron diferencias significativas entre las dos líneas, teniendo un aumento considerable en LNCaP en comparación con PC3. En *NCOA2* existió un aumento, de igual forma en LNCaP con respecto a PC3, pero para *NCOR2* el aumento fue en PC3 (Figura 13). En este caso los niveles de miR-200b en LNCaP fueron mucho mayores que los niveles de *NCOR2*, sugiriendo que cuando los niveles de miR-200b aumentan, los de *NCOR2* disminuyen, esto concuerda, ya que miR-200b podría inducir la degradación de *NCOR2* a nivel de transcrito o inhibición de la traducción, y así observar los niveles de este más bajos. De la misma manera que para los anteriores miRNA se deben evaluar las proteínas. Al igual que para miR-100, en el estudio realizado por Xu G. *et al.*, miR-

200b se encontró diferencialmente expresado entre las dos condiciones, solo que en este caso la expresión elevada de este miRNA se encontró en la línea que representa la condición de Andrógeno Dependencia (Xu G. *et al.*, 2010).

El resultado anterior concuerda con el estudio realizado por He M. *et al.*, 2013, en el cual se observó una baja expresión de miR-200b en la línea celular PC3, incrementando la proliferación de la misma (He M. *et al.*, 2013).

La relación entre el AR y los co-reguladores es muy importante ya que estos pueden reprimir o potenciar la actividad de éste. Por ejemplo, NCOR1 y NCOR2, dos miembros de una familia de proteínas correpressoras asociadas a receptores de la hormona tiroidea y ácido retinoico, reclutan desacetilasas de histonas (HDACs) promoviendo la condensación de la cromatina, por lo cual se impide el paso de la maquinaria de transcripción (Bennett N. *et al.*, 2009). SMARCA5, otro correpresor del AR miembro de la familia de proteínas SWI/SNF inhibe la transcripción de genes alterando la estructura de la cromatina (Leite K. *et al.*, 2013). Si los niveles de proteínas de estos correpresores están alterados, el AR podría transactivarse de una manera constante y permitir a la células cancerígenas sobrevivir y seguir proliferando. Esto es de mucha importancia en la terapia de privación de andrógenos, ya que se administra un antagonista del AR como flutamida o bicalutamida y la unión de éstos al AR recluta corre reguladores para inhibir la actividad del AR (Hodgson M. *et al.*, 2007). Si los niveles de corre reguladores son bajos al unirse el antagonista al AR no habrá inhibición de la actividad del mismo y se podrá activar por diversos mecanismos, incluso el mismo antagonista podría actuar como agonista (Hodgson M. *et al.*, 2007). Los bajos niveles de los corre reguladores podrían estarse dando por la acción de los miRNA que tienen como blanco a éstos y así disminuir la cantidad ya sea a nivel de transcrito o de proteína.

Actualmente el análisis bioinformático, es de mucha importancia, ya que con estos se pueden determinar perfiles de expresión diferencial, entre distintas condiciones de una enfermedad, como es el caso del CaP. Existen diversos trabajos en los cuales se determinó perfiles de expresión diferencial de microRNA en CaP, así

como sus blancos moleculares como es el caso del realizado por He HC. *et al.*, 2013, en el cual obtiene un análisis global de miRNA diferencialmente expresado. Otro trabajo es el realizado por Li J. *et al.*, 2013 en el cual se identificaron genes diferencialmente expresados y el potencial regulatorio que tienen algunos miRNA sobre estos.

Como se mencionó anteriormente al existir interacciones entre el AR, co-reguladores y los miRNA, es importante determinar el efecto que tiene el AR sobre algunos genes de los miRNA, es decir, que el mismo AR regula la expresión de éstos dependiendo del ambiente hormonal y así contribuir a la patogénesis del CaP, como en el estudio realizado por Ribas J. *et al* 2009, en el cual expone como el AR regula la expresión de miR-21 en presencia de andrógenos, y como éste a su vez regula la expresión de genes importantes, sugiriendo así una participación en la patogénesis del CaP (Ribas J. *et al.*, 2009). Otro ejemplo con este mismo miRNA, es la inhibición de *TGFBR2*, un gen relacionado con la proliferación celular, esta inhibición se ve potenciada por el AR (Mishra S. *et al.*, 2013).

7.2 Validación de la actividad del receptor de andrógenos en presencia de dihidrotestosterona y flutamida

En primera instancia, se determinó la actividad misma del AR, tratando solo a la línea celular LNCaP, ya que PC3 es una línea insensible a andrógenos, utilizando la hormona DHT y un antagonista del AR como flutamida con el objetivo de inducir o inhibir la actividad del mismo. También se determinó la concentración a la cual la DHT comenzaba a tener efecto sobre el AR, utilizando como gen reportero a *KLK3*, ya que éste es un elemento de respuesta a andrógenos.

Para validar la actividad del AR, primero se trató con DHT a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 nM) por 24 horas, con el objetivo de inducir la actividad de éste y así encontrar la concentración ideal a la cual se comienza a ver esta actividad; se utilizó como reportero al gen *KLK3* o *PSA*, ya que como se mencionó, es un elemento de respuesta a andrógenos, y éste responderá de una manera proporcional a la actividad del AR. Se observó que a partir de 10nM de

DHT hubo diferencia significativa, con un valor estadístico de $p < 0.0009$ (Figura 14).

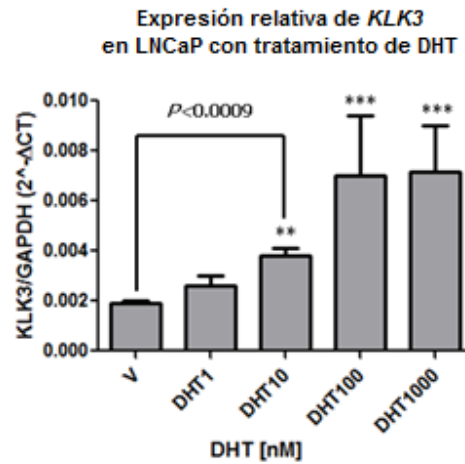


Figura 14. Expresión relativa de *KLK3* (*PSA*) en la línea celular LNCaP y con tratamiento de DHT a diferentes concentraciones (1, 10, 100 y 1000 nM) por 24h. Se observa diferencias significativas a partir de la concentración de 10nM de DHT ($p < 0.0009$). *GAPDH* se utilizó como gen normalizador y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

La concentración 10nM de DHT mostró mejores resultados. Una vez obtenida la concentración deseada, se realizó una curva de tiempo para determinar la actividad del *AR* y observar en qué tiempo se ve el efecto máximo de la DHT.

A partir de 4 horas se observó un aumento de *KLK3*, pero a las 24 horas se obtuvo el efecto máximo de la DHT ($p < 0.0007$) (Figura 15).

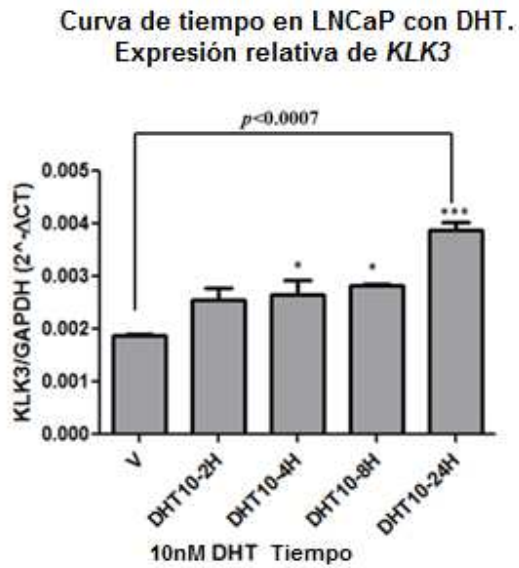


Figura 15. Expresión relativa de *KLK3* en LNCaP con DHT a una concentración de 10nM, a diferentes tiempos (2, 4, 8 y 24h). Se observan diferencias significativa a partir de 4h, pero el efecto máximo se obtiene a las 24h ($p < 0.0007$). *GAPDH* se utilizó como gen normalizador y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

También se obtuvo la expresión relativa del AR en LNCaP con tratamiento de DHT, para observar el efecto directo sobre el AR, a las concentraciones de 10nM y 100nM. Al igual que con *KLK3* se observó que a partir de 10nM de DHT hubo diferencia significativa, con un valor estadístico de $p < 0.005$ (Figura 16).

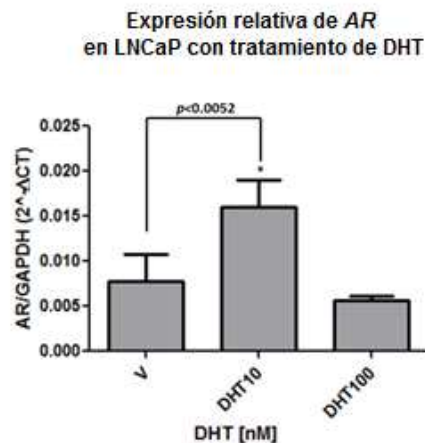


Figura 16. Gráfica de expresión relativa del AR en LNCaP con tratamiento de DHT, donde se muestra diferencias significativas a partir de la concentración de 10nM. *GAPDH* se utilizó como gen normalizador y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

Como un control más se determinó la expresión del *AR* a dos diferentes concentraciones obteniendo una diferencia significativa a 10nM de DHT, a 100nM la expresión del *AR* se ve disminuida. Esto posiblemente puede explicarse porque al ser una concentración mayor el efecto es más rápido o también a que el efecto máximo a esta concentración requiere de más tiempo.

Una vez que se trataron las células con DHT, lo siguiente fue realizar un tratamiento combinado de DHT + flutamida con el objetivo de observar el efecto de la flutamida sobre el *AR*, utilizando como reportero a *KLK3* y al adicionar un antagonista del *AR*, este dará una respuesta a causa del estímulo. El tratamiento se dió a diferentes concentraciones tanto de DHT como de flutamida. Para DHT se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 10, 100 y 1000 nM, para flutamida se utilizaron: 10 y 40 μ M.

A partir de 1nM y hasta 100nM de DHT, se observaron diferencias significativas tanto a 10 μ M como a 40 μ M de flutamida (Figura 17).

Expresión relativa de *KLK3* en LNCaP con tratamiento de flutamida

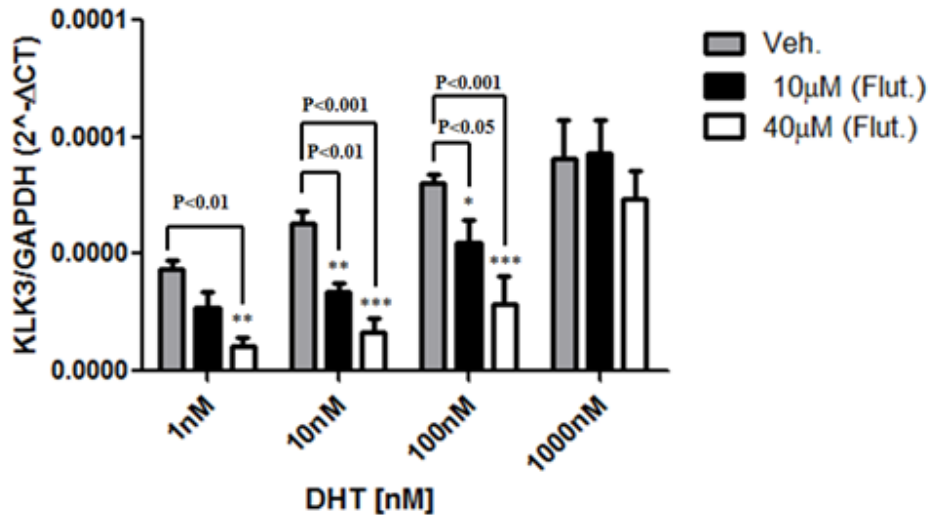


Figura 17. Expresión relativa de *KLK3* con tratamiento combinado de DHT + flutamida. A 1nM de DHT se observa diferencia significativa para 40μM de flutamida ($p<0.01$), para 10nM de DHT diferencias significativas para 10μM ($p<0.01$) y 40μM ($p<0.001$) de flutamida y para 100nM de DHT, de igual forma se observaron diferencias significativas para 10μM ($p<0.05$) y 40μM ($p<0.001$) de flutamida. Para la concentración de 1000nM de DHT ya no se observan cambios significativos. *GAPDH* se utilizó como gen normalizador y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

Se adicionó un antagonista para ver el efecto contrario a la DHT, lo cual se comprobó al ver una disminución en *KLK3* a las dos concentraciones diferentes añadidas de flutamida. Esto se realizó con un tratamiento combinado, con el objetivo de generar competencia por el sitio activo y así poder ver el efecto de la flutamida.

7.3 Evaluación del efecto de la Dihidrotestosterona sobre los miRNA y sus genes blanco

Una vez que se evaluó el efecto de la DHT en el *AR*, y se determinó la concentración adecuada, lo siguiente fue determinar el efecto posible que la actividad misma del *AR* tiene sobre la expresión de los miRNA y sus genes blanco. Se determinó la expresión de los miRNA en la línea celular LNCaP con tratamiento

de DHT a 10nM y 100nM. Se encontraron diferencias significativas a estas concentraciones para miR-100 ($p<0.0006$) (Figura 18, A) y miR-149 ($p<0.0001$) (Figura 18, B), también para miR-200b ($p<0.0006$) (Figura 18, C) por lo que podemos decir que el AR tiene actividad sobre la expresión de estos miRNA a una concentración de 10nM de DHT.

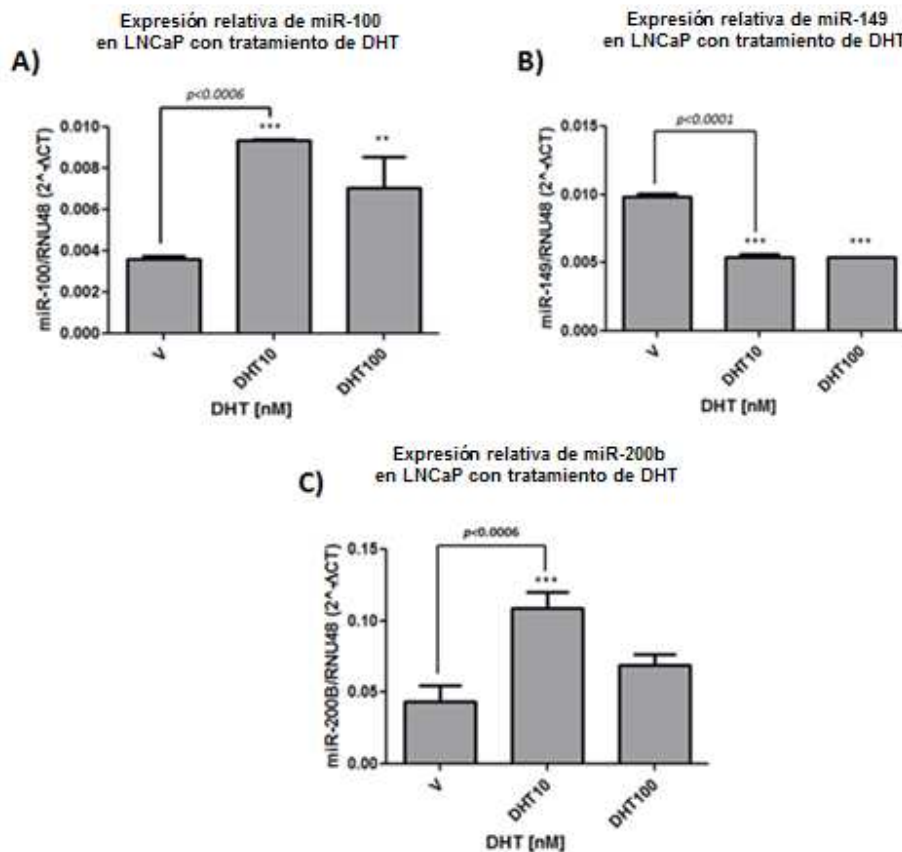


Figura 18. Gráficas de caracterización efecto de DHT sobre la expresión de los miRNAs. No se encontró diferencia significativa en ninguna de las concentraciones probadas para miR-100 y miR-149, mientras que para miR-200b se obtuvieron diferencias significativas ($p<0.0006$) a 10nM de DHT. *RNU48* se utilizó como gen normalizador y se graficó con los datos de $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Se observaron diferencias significativas con respecto a miR-100 y miR-149 en las dos concentraciones de DHT, al igual que para miR-200b a una concentración de 10nM se observó un aumento en la expresión, por lo tanto estos miRNAs podrían tener un posible efecto en presencia de la DHT. Lo cual nos indicaría que el AR

regula la expresión de estos microRNA, teniendo una relación compleja entre los co-reguladores, el AR y los miRNA. Ya que el AR regula la expresión de los miRNA, éstos a su vez, regulan la expresión de los co-reguladores, los cuales regulan la actividad del AR. Si la expresión de los miRNA se ve afectada, esto repercute en la regulación de la actividad del AR, contribuyendo así a la progresión y desarrollo del CaP.

Ya que se determinó el efecto que tiene el AR sobre los miRNA, lo siguiente fue determinar el posible efecto que la actividad del AR tiene sobre los genes blanco. Se determinó la expresión de los mRNA en la línea celular LNCaP con tratamiento de DHT a 10nM y 100nM. No se encontraron diferencias significativas a estas concentraciones para *NCOR1* ($p>0.07$), *NCOR2* ($p>0.05$) y *SMARCA5* ($p>0.9$), por lo que podemos decir que el AR no tiene actividad sobre la expresión de estos mRNA. Mientras que para *NCOA2* si se observaron diferencias significativas ($p<0.006$) a 10nM de DHT (Figura 19).

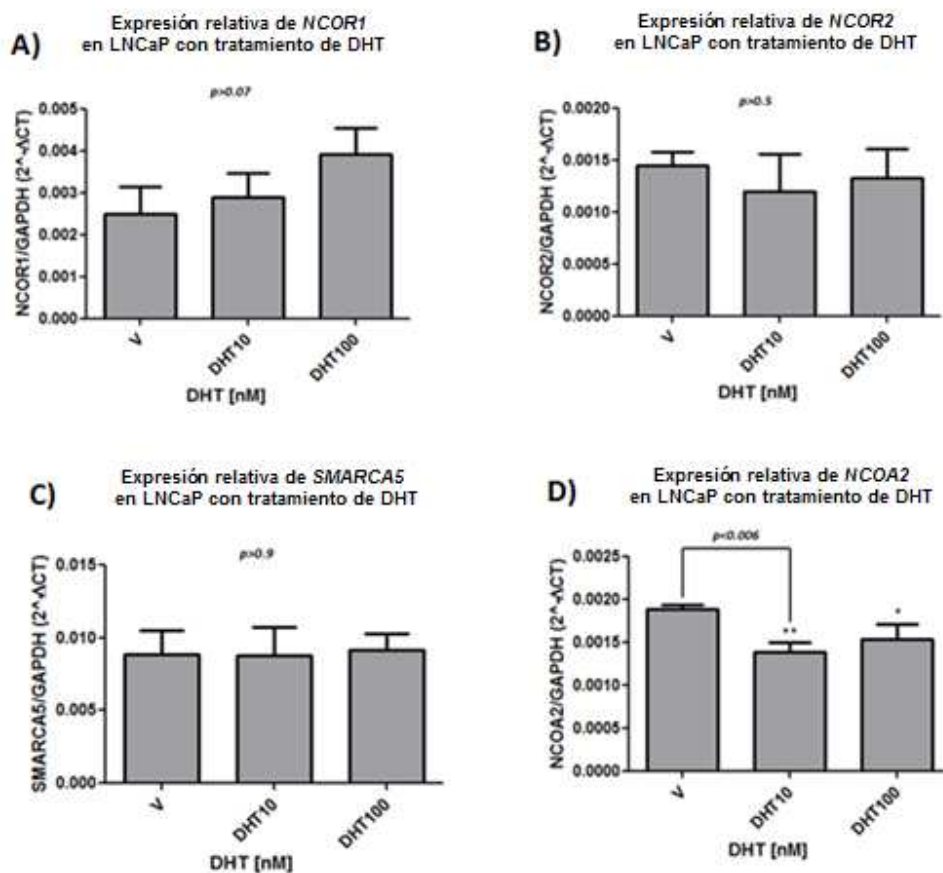


Figura 19. Gráficas de caracterización efecto de DHT sobre la expresión de los genes blanco. No se encontró diferencia significativa en ninguna de las concentraciones para *NCOR1* A), *NCOR2* B) y *SMARCA5* C), por el contrario para *NCOA2* D) se obtuvo diferencias significativas ($p < 0.006$) a una concentración de 10nM de DHT. *GAPDH* se utilizó como gen normalizador y se graficó con los datos de $2^{-\Delta CT}$.

Para los genes blanco de los miRNA no se encontró diferencia significativa en ninguna de las concentraciones para *NCOR1*, *NCOR2* y *SMARCA5*, por el contrario para *NCOA2* se obtuvieron diferencias significativas a una concentración de 10nM de DHT, teniendo un efecto contrario a miR-200b.

Debido al papel regulatorio de los miRNA en la expresión de diversos genes, es evidente que la identificación de miRNA relacionados al CaP podría aportar información valiosa sobre las alteraciones moleculares asociadas a la patogénesis del CaP. Recientemente, se han reportado diversos estudios de la expresión de miRNA específicos en muestras de CaP, en el contexto de la AI como miR-221, miR-222, miR-125b, y miR-146 (Coppola V. *et al.*, 2010; Sevlı S. *et al.*, 2010).

Existen algunos miRNA como miR-221 y miR-222 los cuales están expresados en diferentes tipos de cáncer, han sido identificados como oncomiRs porque inhiben el ciclo celular (Galardi S. *et al.*, 2007). De manera interesante, estos miRNA que se sobre-expresan en AI, se encuentran sub-expresados en células dependientes de andrógenos (Sun T. *et al.*, 2009). Inhibiendo miR-221 y miR-222 en LNCaP independiente de andrógenos dió como resultado una disminución de la tasa de crecimiento de estas células y el aumento de la dependencia y la sensibilidad a la DHT. Otro ejemplo es miR-146 el cual está sub-expresado en líneas celulares andrógeno-independientes en comparación con las líneas celulares andrógeno-dependientes (Lin SL. *et al.*, 2008). Por ejemplo, en la línea celular andrógeno-independiente PC3 al sobre-expresar miR-146 disminuyó la proliferación celular y la supervivencia. Por lo tanto miR-146 puede actuar como un supresor tumoral que es regulado a la baja durante la progresión de AI (Lin SL. *et al.*, 2008). También, algunos miRNA como: miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 y miR-654-3p, localizados en el mismo cromosoma, regulan la proliferación celular, apoptosis, migración e invasión en CaP metastásico (Formosa A. *et al.*, 2013).

A los miRNA, dependiendo de su blanco molecular, se les puede considerar como microRNA supresor de tumores o también como microRNA oncogénico, como es el caso de miR-100, el cual tiene como blancos a *BAZ2*, *mTOR*, *FGFR3*, *SMARCA5* y *THAP2*, genes importantes en la proliferación celular, supervivencia y estabilidad cromosómica (Leite K. *et al.*, 2013). Otros miRNA que actúan como supresor de tumores son miR-130a, miR-203 y miR-205, los cuales están sub-expresados, permitiendo a genes relacionados con las vías MAPK y del AR, con los que están relacionados, estar sobre-expresados, permitiendo la transición hacia la AI. Éstos miRNA al ser reconstituidos en LNCaP, inducen cambios en la célula, al igual que arresto en el ciclo celular y apoptosis (Boll K. *et al.*, 2013).

Finalmente, los datos de este estudio proporcionan información basal de la expresión de los miRNA y sus genes blanco, que servirán como control para experimentos futuros.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Se determinó la expresión de los miRNA y sus genes blanco en dos líneas celulares de CaP, donde se observaron diferencias significativas entre las dos condiciones de dependencia/independencia de andrógenos.
- ✓ Se determinó la concentración de DHT (10nM) a la cual se observó un efecto en la actividad del AR, al igual que el tiempo (24h) donde se obtuvo el efecto máximo de la DHT a la concentración determinada.
- ✓ También se obtuvieron las concentraciones de flutamida (10 y 40µM), por medio de un tratamiento combinado con DHT, teniendo competencia tanto del agonista como del antagonista.
- ✓ Se evaluó el posible efecto del AR sobre la expresión de los miRNA, y se observó a 10nM de DHT diferencias significativas para los tres miRNA (miR-100, miR-149 y miR-200), por lo que podemos decir que el AR tiene actividad sobre la expresión de estos miRNA.
- ✓ Se determinó la expresión de los genes blanco (*NCOR1*, *NCOR2*, *SMARCA5* y *NCOA2*) con tratamiento de DHT, no mostró diferencias significativas con excepción de *NCOA2*, teniendo una relación inversa con miR-200b.
- ✓ Se definieron las diferencias de expresión de miRNAs y mRNA, utilizando el método de cuantificación relativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ entre dos condiciones de CaP, obteniéndose diferencias marcadas en la expresión de estos entre las 2 condiciones.

9. PERSPECTIVAS

- Realizar ensayos de *Western Blot* para determinar los posibles cambios en los niveles de expresión de las proteínas, al igual que con los tratamientos de DHT y Flutamida.
- Realizar transfección de los miRNA en las líneas celulares de CaP con el objetivo de estudiar más a fondo el papel funcional de éstos.
- Una vez realizada la transfección, determinar los niveles de transcrito y proteína de los blancos moleculares de los miRNA, para confirmar la relación miRNA-mRNA.
- Emplearlos como posibles marcadores para el diagnóstico, seguimiento o pronóstico del CaP.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Antonarakis *et al.*, Expanding treatment options for metastatic prostate cancer. *N Engl J Med.* 2011 May 26;364(21):2055-8.
2. Attar *et al.*, Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes., *Clin Cancer Res.* 2009 May 15;15(10):3251-5.
3. Bellido *et al.*, Reproducción en el varón. In *Fisiología Humana*. Edited by Tresguerres JAF. Madrid, España: McGRAW-Hill-Interamericana; 1999; 1033-1047.
4. Bennett *et al.*, Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; 42:813–27.
5. Brennecke *et al.*, Principles of microRNA-target recognition., *PLoS Biol.* 2005 Mar;3(3):e85.
6. Brinkmann *et al.*, Mechanisms of androgen receptor activation and function. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1999; 69, 307–313.
7. Boll K. *et al.*, 2013. MiR-130a, miR-203 and miR-205 jointly repress key oncogenic pathways and are downregulated in prostate carcinoma. *Oncogene.* 2013 Jan 17;32(3):277-85.
8. Buchanan *et al.*, Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2001; 7, 1273–1281.
9. Bushati *et al.*, microRNA functions., *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:175-205.
10. Cai *et al.*, Androgen receptor gene expression in prostate cancer is directly suppressed by the androgen receptor through recruitment of lysine-specific demethylase 1, *Cancer Cell.* 2011 Oct 18;20(4):457-71.
11. Cai X *et al.*, Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. 2004, *RNA* 10;1957–1966.
12. Craft, N. *et al.* Evidence for clonal outgrowth of androgen-independent prostate cancer cells from androgen-dependent tumors through a two-step process. *Cancer Res.*, 1999; 59, 5030–5036.
13. Craft, N *t al.*, A mechanism for hormone-independent prostate cancer through modulation of androgen receptor signaling by the HER-2/neu tyrosine kinase. *Nature Med.*, 1999; 5, 280–285.

14. Colombel *et al.*, Detection of the apoptosis-suppressing oncoprotein bc1-2 in hormone-refractory human prostate cancers. *Am J Pathol* 1993 ;143:390-400.
15. Collette, L *et al.*, Why phase III trials of maximal androgen blockade versus castration in M1 prostate cancer rarely show statistically significant differences. *Prostate*, 2001; 48, 29-39.
16. Coppola V *et al.*, MicroRNAs and prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 2010;17: F1-17.
17. Culig Z *et al.*, Androgen receptor activation in prostatic tumor cell lines by insulin-like growth factor-I, keratinocyte growth factor, and epidermal growth factor. *Cancer Res.* 1994; 54: 5474-5478.
18. Datta, S *et al.*, Cellular survival: a play in three AKTs. *Genes Dev.*, 1999; 13, 2905-2927.
19. De Marzo *et al.*, Nelson WG. *Nat Rev Cancer.* 2007 Apr; 7(4):256-69.
20. Eder, *et al.*, Molecular biology of the androgen receptor: from molecular understanding to the clinic. *Eur. Urol.*, 40, 241±251.
21. Eder, I.E *et al.*, Inhibition of LNCaP prostate tumor growth in vivo by an antisense oligonucleotide directed against the human androgen receptor. *Cancer Gene Ther.*, 9, 117±125.
22. Edwards *et al.*, The androgen receptor and signal-transduction pathways in hormonerefractory prostate cancer. Part 2: androgenreceptor cofactors and bypass pathways. *BJU Int* 2005;95:1327-35.
23. Fabian, *et al.*, Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351-379.
24. Fawcett and Raviola, *et al.*, Bloom and Fawcett - A Textbook of Histology. Chapman and Hall, New York 1994.
25. Feldmann and Feldmann *et al.*, The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* 2001;1(1):34-45
26. Filipowics *et al.*, Mechanisms of posttranscriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature Reviews Genetics* 2008. 9: 102-114.
27. Galardi S *et al.*, miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J Biol Chem* 2007;282:23716-24.

28. Greenlee *et al.*, Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7–33.
29. Gregory, C *et al.*, Androgen receptor stabilization in recurrent prostate cancer is associated with hypersensitivity to low androgen. *Cancer Res.* 61, 2892–2898.
30. Gregory *et al.*, A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 2001;61:4315–9.
31. Halkidou K *et al.*, Expression of Tip60, an androgen receptor coactivator, and its role in prostate cancer development. *Oncogene* 2003;22:2466 –77.
32. He M. *et al.*, 2013. Down-regulation of miR-200b-3p by low p73 contributes to the androgen-independence of prostate cancer cells. *Prostate.* 2013 Jul;73(10):1048-56.
33. He HC. *et al.*, 2013. Global analysis of the differentially expressed miRNAs of prostate cancer in Chinese patients. *BMC Genomics.* 2013 Nov 5;14(1):757.
34. Hiytinen, E. R. *et al.*, Genetic changes associated with the acquisition of androgen-independent growth, tumorigenicity and metastatic potential in a prostate cancer model. *Br. J. Cancer*, 1997; 75, 190–195.
35. Hobisch, A *et al.*, Interleukin-6 regulates prostate-specific protein expression in prostate carcinoma cells by activation of the androgen receptor. *Cancer Res.* 1998; 58, 4640±4645.
36. Hodgson MC *et al.*, Activity of Androgen Receptor Antagonist Bicalutamide in Prostate Cancer Cells Is Independent of NCoR and SMRT Corepressors, *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67(17):8388-95.
37. Isaacs, J. *et al.*, The biology of hormone refractory prostate cancer. Why does it develop? *Urol. Clin.*, 1999; *North Am.* 26, 263–273.
38. Ittmann, M. *et al.*, Chromosome 10 alterations in prostate adenocarcinoma. *Oncol. Rep.*, 1998; 5, 1329–1335.
39. Jarrard, D *et al.*, Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998; 58, 5310±5314.
40. Kim V *et al.*, MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2005; 6 376–385.
41. Koivisto, P. *et al.*, Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 57, 314–319.

42. Labrie, F. *et al.*, Treatment of prostate cancer with gonadotropin-releasing hormone agonists. *Endocr. Rev.* 1986; 7, 67–74.
43. Labrie, F. *et al.*, Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin. Invest. Med.* 1993; 16, 475–492.
44. Lagos-Quintana *et al.*, Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294 853–858.
45. Lee R *et al.*, The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*., *Cell.* 1993 Dec 3;75(5):843-54.
46. Lee, W. H. *et al.*, Cytidine methylation of regulatory sequences near the β -class glutathione S-transferase gene accompanies human prostatic carcinogenesis. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1994; 91, 11733–11737.
47. Leite K. *et al.*, 2013. MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer., *Clinics (Sao Paulo)*. 2013 Jun;68(6):797-802.
48. Lemon B, *et al.*, Orchestrated response: a symphony of transcription factors for gene control. *Genes Dev* 2000;14:2551– 69.
49. Li, J. *et al.*, *PTEN*, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science.* 1997; 275, 1943–1947.
50. Li, J. *et al.*, 2013. Identifying differentially expressed genes and small molecule drugs for prostate cancer by a bioinformatics strategy. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(9):5281-6.
51. Liao G *et al.*, Regulation of androgen receptor activity by the nuclear receptor corepressor SMRT. *J Biol Chem* 2003;278:5052– 61.
52. Lin *et al.*, Loss of miR-146a function in hormone-refractory prostate cancer. *Rna* 2008;14:417–24.
53. Liu J. *et al.*, Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004, 305 1437–1441.
54. Livak KJ. *Et al.*, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method, *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
55. Lund E, *et al.*, Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004, 303 95–98.

56. Makridakis, N. *et al.*, A prevalent missense substitution that modulates activity of prostatic steroid 5 α -reductase. *Cancer Res.* 1997; 57, 1020–1022.
57. Marcelli, M. *et al.*, Androgen receptor mutations in prostate cancer. *Cancer Res.* 2000; 60, 944–949.
58. McGuire W, *et al.*, Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol. Endocrinol.* 1991; 5, 1571–1577.
59. McKenna, N. J., *et al.*, Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr. Rev.* 1999, 20, 321–344.
60. McKenna, N.J. *et al.*, Nuclear receptor coactivators—An update. *Endocrinology.* 2001; 143, 2461–2465.
61. Medema, R., *et al.*, AFX-like Forkhead transcription factors mediate cell-cycle regulation by Ras and PKB through p27kip1. *Nature.* 2000; 404, 782–787.
62. Mishra S. *et al.*, 2013. Androgen receptor and microRNA-21 axis downregulates transforming growth factor beta receptor II (TGFB2) expression in prostate cancer., *Oncogene.* 2013 Sep 16.
63. Muller, J.M, *et al.*, FHL2, a novel tissue-specific coactivator of the androgen receptor. *EMBO J.* 2000; 19, 359–369.
64. Nazareth, L. *et al.*, Activation of the human androgen receptor through a protein kinase A signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 1996; 271, 19900–19907.
65. Narayanan R, *et al.*, MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle. *PLoS One* 2010;5:e13637.
66. Nigel C, *et al.*, Molecular cell biology of androgen receptor signaling, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2009.
67. Parker, R, *et al.*, P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 2007; 635-646.
68. Pilat, M. J., *et al.*, Hormone resistance in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 1998; 17, 373–381.
69. Quigley, C. A. *et al.*, Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives. *Endocr. Rev.* 16, 271–321.
70. Rajewsky N, *et al.*, Computational identification of microRNA targets., *Dev Biol.* 2004 Mar 15;267(2):529-35.

71. Ribas J, *et al.*, miR-21: An Androgen Receptor-Regulated MicroRNA that Promotes Hormone-Dependent and Hormone-Independent Prostate Cancer Growth. *Cancer Res.* 2009;69(18):7165-7169.
72. Richard I. *et al.*, MicroRNA Biogenesis and Cancer, *Cancer Res* 2005;65:3509-3512.
73. Ro S, *et al.*, Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental Biology* 2007; 311, 592–602
74. Rubin MA, De Marzo AM., *et al.*, Molecular genetics of human prostate cancer., *Mod Pathol.* 2004 Mar;17(3):380-8.
75. Ruijter, E. *et al.*, Molecular genetics and epidemiology of prostate carcinoma. *Endocr. Rev.* 1999; 20, 22–45.
76. Schulz W, *et al.*, Molecular biology of prostate cancer., *Mol Hum Reprod.* 2003 Aug;9(8):437-48.
77. Sevli S, *et al.*, The function of microRNAs, small but potent molecules, in human prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2010;13:208 –17.
78. Sharma, M. *et al.*, 5' TG3' interacting factor interacts with Sin3A and represses AR-mediated transcription. *Mol. Endocrinol.* 2001; 15, 1918±1928.
79. Shen HC, *et al.*, The androgen receptor: unlocking the secrets of its unique transactivation domain. *Vitam Horm* 2005;71:301–19.
80. Stambolic, V. *et al.*, Negative regulation of PKB/AKT-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell.* 1998; 95, 29–39.
81. Sun T, *et al.*, The role of microRNA-221 and microRNA-222 in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 2009;69:3356–63.
82. Sun T. *et al.*, 2013. MiR-221 promotes the development of androgen independence in prostate cancer cells via downregulation of HECTD2 and RAB1A. *Oncogene.* 2013 Jun 17.
83. Taplin, M. E. *et al.*, Mutation of the androgen-receptor gene in metastatic androgen-independent prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 1995; 332, 1393–1398.
84. Tilley, W. D., *et al.*, Mutations in the androgen receptor gene are associated with progression of human prostate cancer to androgen independence. *Clin. Cancer Res.* 1996; 2, 277–285.

85. Trinna L, *et al.*, MicroRNAs and endocrine biology, *Journal of Endocrinology*. 2005; 187, 327–332.
86. Vasudevan, S., *et al.*, Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318, 1931-1934.
87. Veldscholte, J., *et al.*, A mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to anti-androgens. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990; 173, 534±540.
88. Visakorpi T *et al.*, In vivo amplification of the androgen receptor gene and progression of human prostate cancer. *Nat Genet.* 1995 Apr ;9(4):401-6.
89. Wen, Y. *et al.*, HER-2/neu promotes androgen-independent survival and growth of prostate cancer cells through the AKT pathway. *Cancer Res.* 2000; 60, 6841–6845.
90. Wilt TJ, *et al.*, Systematic review: comparative effectiveness and harms of treatments for clinically localized prostate cancer. *Ann Intern Med.* 2008;148(6):435-448.
91. Xu G, *et al.*, Characterization of the small RNA transcriptomes of androgen dependent and independent prostate cancer cell line by deep sequencing, *PLoS One.* 2010 Nov 30;5(11):e15519.
92. Yeh S, *et al.*, "Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1996 May 28; 93(11):5517-21.
93. Yeh, S. *et al.*, From HER2/Neu signal cascade to androgen receptor and its coactivators: a novel pathway by induction of androgen target genes through MAP kinase in prostate cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci.* 1999; 96, 5458–5463.
94. Zhou, H, *et al.*, AKT regulates cell survival and apoptosis at a postmitochondrial level. *J. Cell Biol.* 2000; 151, 483–494.
95. <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>

APENDICE 1

Línea celular LNCaP

Es una línea celular humana hipotetraploide. El número cromosómico modal fue 84, que se producen en el 22% de las células. Sin embargo, las células con recuentos cromosómicos de 86 (20%) y 87 (18%) también se produjeron a altas frecuencias. El tipo de células con ploidías mayores fue del 6,0% (ATCC).

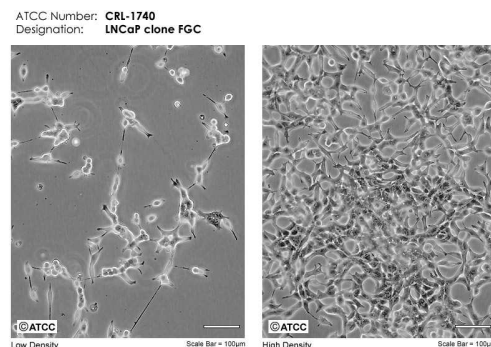


Imagen de la línea celular LNCaP

LNCaP fue aislada en 1977 por J. S. Horoszewicz, et al., a partir de una biopsia del ganglio linfático supraclavicular izquierdo de un varón de 50 años de edad, de raza caucásica (tipo de sangre B +) con diagnóstico confirmado de carcinoma de próstata metastásico. Expresa el AR y PSA, además de ser responsiva a andrógenos (ATCC). Ésta línea celular se cultiva en el medio RPMI 1640.

Medio RPMI 1640

El medio RPMI-1640 modificado contiene 2 mM de L-glutamina, 10 mM HEPES, 1 mM de piruvato de sodio, 4.500 mg/L de glucosa, y 1,500 mg/L de bicarbonato de sodio, para su uso en incubadoras utilizando 5% de CO₂ en aire. Bicarbonato de sodio adicional puede ser requerido para su uso en incubadoras que contienen porcentajes más altos de CO₂ (ATCC).

Línea celular PC3

Las células PC3 tienen alto potencial metastásico. Se establecieron en 1979 de la metástasis ósea de grado IV de cáncer de próstata de un hombre de 62-años de

edad, de raza caucásica. Estas células no responden a los andrógenos, glucocorticoides, o factores de crecimiento epidérmico o fibroblastos. No expresa PSA . Esta línea se cultiva en medio DMEM (ATCC).

Medio DMEM

El medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), es modificado para contener 4 mM de L-glutamina, 4,500 mg / L de glucosa, piruvato sódico 1 mM, y 1,500 mg / L de bicarbonato de sodio (ATCC).

APENDICE 2

Cálculo del cambio de expresión por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

El Ct es el ciclo en el cual la fluorescencia generada dentro de la reacción sobrepasa el umbral y es detectada por el equipo. El valor de Ct asignado a una muestra en particular refleja el punto en el cual un número suficiente de amplicones se ha acumulado dentro de la reacción y se presenta un crecimiento exponencial (Schmittgen *et al.*, 2008).

El cálculo del cambio de expresión por el método comparativo Ct, se utiliza para el análisis de cuantificación relativa por PCR en tiempo real. Esta forma de la ecuación se utiliza para comparar la expresión de un gen en dos muestras diferentes (A y B); cada muestra se normaliza con respecto a un control interno ó normalizador, calculando la diferencia de valores de Ct (ΔCt) de la siguiente manera:

$$\Delta Ct_{\text{muestra A}} = Ct_{\text{gen de interés}} - Ct_{\text{control interno}}$$

Lo mismo se aplica para la muestra B. Posteriormente, se calcula la diferencia de valores de ΔCt , entre las muestras ($\Delta\Delta Ct$). Supongamos para este ejemplo, que la muestra problema es A y el calibrador ó muestra control es la B:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{muestra A}} - \Delta Ct_{\text{muestra B}}$$

Finalmente se determina el cambio en el nivel de expresión del gen de interés en A con respecto a B, calculando el antilogaritmo base 2 del $-\Delta\Delta Ct$.

$$\text{Cambio de expresión} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$