

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
ESCUELA DE POSTGRADO



**Efecto de la sobreexpresión de miR-23b sobre la
proliferación, migración e invasión y su efecto sobre
las proteínas c-Myc y VEGF en modelo in vitro de
Cáncer Ovárico Epitelial**

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de
Magíster en Bioquímica área de Especialización en Bioquímica
Clínica.

Andrea Hernández Jorquera

Directora de Tesis: Dra. Carmen Romero Osses

Santiago-Chile

Julio del 2020

FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue financiada por el Proyecto FONDECYT #1160139 (CR)

Divulgación Científica del trabajo de tesis

Presentaciones a congresos nacionales

Andrea Hernández, Margarita Vega, Carmen Romero.

Efecto de la sobreexpresión de mir-23b sobre la proliferación y los niveles de c-Myc en línea celular de cáncer ovárico epitelial.

XXIX Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. 5 al 8 de Septiembre de 2018, Concón, Chile.

Presentaciones a congresos internacionales

Andrea Hernández, Ignacio Torres, Maritza Garrido, Margarita Vega, Carmen Romero

The up-regulation of oncosupressors microRNAs decreases the proliferation, migration and invasion in Epithelial Ovarian Cancer cells

23rd International Symposium on Molecular Medicine. March 28-30, 2019, Bangkok, Thailand

*Dedicado a un profesor que me cambio la vida
Gracias Sergio Santelices Arrospide*

AGRADECIMIENTOS

Primero quisiera agradecer a mi directora de tesis, Dra. Carmen Romero por recibirme durante tantos años en su laboratorio y las muchas oportunidades que se me abrieron gracias a ella. Además, por su gran apoyo y cariño entregados durante este proceso.

A todos en el laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción: a la Dra. Margarita Vega, por su apoyo y gran cariño. A mis primeros compañeros de trabajo. Fueron los mejores compañeros y colegas y me llena de felicidad haber trabajado junto a un gran equipo al que extrañaré mucho, todos y cada uno de ustedes fueron un gran apoyo durante mi estancia. Gracias Paulita, Egardo, Maritza, Sra. Erminia, Sra. Sole, Paola y Carlitos. También una mención a los becados que pasaron por el laboratorio, siempre muy interesados en aprender.

A mis compañeros de laboratorio, que nos brindamos apoyo en este proceso y siempre buena onda, Heidy, Nacho y Flo.

Agradecer a mi mamá y a mi abuela por siempre estar para mí y ayudarme a llegar hasta donde estoy hoy, ya sea con rica comida o una palabra de aliento estoy muy agradecida y orgullosa de la familia que tengo. Las amo infinito.

Quiero aprovechar la oportunidad de agradecer a mi otra familia, la que uno elige. Gracias, tía Adela, tío Rene, mi abuelita Anita, mi casi hermana Natalia y mi bella Amanda, son realmente una familia para mí.

Obviamente también tengo que agradecer a mis amigos que siempre me apoyaron y me hicieron reír, son lo mejor chicos, espero la celebración de todo lo que nos falta luego! Gracias Sara, Checho, Chio y Andrea, son los mejores amigos que se puede pedir.

Tengo que agradecer a mi pololi infinitamente por apoyarme incondicionalmente en todo, en todas y cada una de las locuras que se me han ocurrido en estos ya casi 5 años de relación y dos tesis. Te extraño mucho y te amo Luis.

Un agradecimiento infinito y eterno para la mejor banda del universo **my chemical romance**, les agradezco por su música y por decidir volver a pesar de que la pandemia pusiera en espera el retorno, los espero con ansias. Gracias por existir y hacerme sentir viva.

Y finalmente agradecer a todas las personas que de una u otra manera han aportado en quien soy hoy, pero especialmente quisiera mencionar a mi profesor jefe de III y IV, al cual va dedicada esta tesis, gracias por permitirme soñar en un mejor futuro. Su partida me afectó profundamente, pero siempre será una inspiración para mí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE DE CONTENIDOS	VI
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	VIII
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	IX
<i>ABREVIACIONES</i>	X
RESUMEN	XIII
SUMARY	XVI
I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. CÁNCER OVÁRICO.....	1
I.2. DIAGNÓSTICO	1
I.2.A. MARCADORES TUMORALES PARA COE.....	2
I.3. CAUSAS	3
I.3.A. OVULACIÓN INCESANTE.....	3
I.3.B. ESTIMULACIÓN GONADOTRÓPICA.....	3
I.3.C. EFECTO INFLAMATORIO.....	4
I.4.A. ROL DE NGF EN CÁNCER DE OVARIO	4
I.5. MICRORNAS.....	5
I.5.A. BIOGÉNESIS DE LOS MIRS	5
I.6. MIRS EN CÁNCER	7
I.7. MIRS EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL.....	8
I.8. MIR-23B EN CÁNCER.....	9
II.1 HIPÓTESIS.....	12
II.2 OBJETIVO GENERAL.....	12
II.3 OBJETIVO ESPECÍFICOS.....	12
III. METODOLOGÍA	13
III. 1. CULTIVO CELULAR.....	13
III.1.A. LÍNEAS CELULARES.....	14
III.2. TRANSFECCIÓN DE LÍNEAS CELULARES.....	14
III.3. ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN.....	15
III.4. ENSAYO DE MIGRACIÓN CELULAR.....	15
III.5. ENSAYO DE INVASIÓN	16
III.6. INMUNOCITOQUÍMICA (ICQ)	17
III.7. WESTERN BLOT	18
III.8. ELISA DE VEGF.....	21
III.9. EXTRACCIÓN DE RNA Y RETROTRANSCRIPCIÓN.....	21
III.10. PCR CONVENCIONAL PARA VEGF	22
III.11. QRT-PCR PARA C-MYC.....	23
III.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25

IV. RESULTADOS	26
IV. 1. OBJETIVO ESPECÍFICO 1	26
IV. 2. OBJETIVO ESPECÍFICO 2	32
IV. 3. OBJETIVO ESPECÍFICO 3	34
V. DISCUSIÓN.....	38
VI. CONCLUSIONES	43
VI. PROYECCIONES.....	44
VII. REFERENCIAS.....	45
VIII. ANEXO	49

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	6
Figura 2.....	27
Figura 3.....	28
Figura 4.....	29
Figura 5.....	30
Figura 6.....	31
Figura 7.....	32
Figura 8.....	33
Figura 9.....	34
Figura 10.....	35
Figura 11.....	36
Figura 12.....	37
Figura 13.....	49

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.....	21
Tabla 2.....	23
Tabla 3.....	24
Tabla 4.....	24

ABREVIACIONES

Ago2: Componente catalítico RISC de argonauta 2 (del inglés *Argonaute RISC catalytic component 2*)

BCA: Ácido bicinchónico (del inglés *Bicinchonic Acid*)

BSA: Albúmina de suero bovino (del inglés *Bovine Serum Albumin*)

BRCA 1/2: Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1/2 (del inglés *Breast cancer type 1/2 susceptibility protein*)

CA-125: Antígeno del cáncer 125 (del inglés *Cancer Antigen 125*)

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés *complementary Deoxyribonucleic Acid*)

c-Myc: Factor de transcripción oncogénico de la familia básico hélice-lazo-hélice (bHLH)

COE: Cáncer ovárico epitelial

DAB: 3,3'-diaminobencidina

DGCR8: Subunidad compleja de microprocesador DGCR8 (del inglés *DGCR8 microprocessor complex subunit*)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

dNTP: Desoxinucleótidos trifosfato (del inglés *deoxynucleotide triphosphates*)

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés *Ethylenediaminetetraacetic acid*)

ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés *Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

HE-4: Proteína epididimal humana 4 (del inglés *Human Epididymis Protein 4*)

HOSE: Epitelio de la superficie ovárica humana (del inglés *Human Ovarian Surface Epithelium*)

ICQ: Inmunocitoquímica

IOD: Densidad óptica integrada

kDa: kiloDalton

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (del inglés *messenger Ribonucleic Acid*)

miR o miRNA: microRNA

miRISC: Complejo silenciador inducido por miRs (del inglés *miRNA-induced silencing complex*)

MTS: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio

NaCl: Cloruro de Sodio

NGF: Factor de crecimiento nervioso (del inglés *Nerve Growth Factor*)

pb: Pares de base

PBS: Solución tampón de fosfato (del inglés *Phosphate Buffer Solution*)

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *Polymerase Chain Reaction*)

PFA: Paraformaldehído

qRT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés *Real-Time Polymerase Chain Reaction*)

RNA: Ácido ribonucleico (del inglés *Ribonucleic Acid*)

RISC: Complejo silenciador inducido por RNA (del inglés *RNA-induced silencing complex*)

RIPA: Buffer de radioinmunoprecipitación (del inglés *Radioimmunoprecipitation assay buffer*)

ROMA: Algoritmo de riesgo de malignidad ovárica (del inglés *Risk of Ovarian Malignancy Algorithm*)

RPM: Revoluciones por minuto

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (del inglés *Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*)

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés *Sodium Dodecyl-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SFB: Suero fetal bovino

TRBP: Subunidad TARBP2 del complejo de carga RISC (del inglés *TARBP2 subunit of RISC loading complex*)

TRKA: Receptor tirosina quinasa A (del inglés *Tyrosine Receptor KinaseA*)

TTBS: Solución salina de Tris con Tween (del inglés *Tween Tris-Buffered Salt*)

UA: Unidades arbitrarias

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)

WB: Western Blot

Zeb1: Dedo de zinc E-box con unión a homeobox 1 (del inglés *zinc finger E-box binding homeobox 1*)

3'-UTR: Región 3' no traducida (del inglés *3' untranslated region*)

RESUMEN

El cáncer ovárico epitelial (COE) es la primera causa de muerte por neoplasias ginecológicas en países desarrollados como Canadá y EE. UU. En Chile, es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas. Este cáncer se caracteriza por ser de diagnóstico tardío, debido a su sintomatología poco específica y poseer una pobre respuesta al tratamiento. Debido a lo anterior, es importante entender los mecanismos tanto de la génesis como del desarrollo de esta neoplasia. En nuestro grupo se ha encontrado una sobreexpresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) y de su receptor de alta afinidad TRKA durante la progresión de esta neoplasia. La investigación centrada en NGF ha mostrado que este factor de crecimiento tiene un rol importante en COE, estimulando principalmente, la proliferación y la angiogénesis de manera directa e indirecta. Además, NGF es capaz de inducir la expresión de VEGF y c-Myc en explantes de COE. Otras moléculas involucradas en la carcinogénesis son los microRNA (miR), estos son pequeños RNA no codificantes, capaces de regular la expresión génica, al impedir la traducción de RNA mensajeros. Están involucrados en varios procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación, la apoptosis y la proliferación, por lo que los miR también tienen un importante rol en la oncogénesis, debido a que pueden actuar como supresores de tumores o como oncogenes. Uno de estos miR es miR-23b, el cual se ha descrito estar disminuido en varios tipos de cáncer, como lo son el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga y el cáncer ovárico entre otros. La literatura ha descrito al miR-23b como un supresor de tumores, logrando promover la apoptosis e inhibir la proliferación, la migración y la invasión in vitro. En cuanto a los mRNA blancos asociados a este miR, se ha descrito que es capaz de disminuir los niveles de VEGF y que se encuentra formando un loop con c-Myc, el cual está descrito

sería capaz de disminuir la transcripción del miR-23b al tener sitios de unión a la zona del DNA donde ocurre la transcripción del miR-23b. Además, nuestro grupo encontró que los niveles de miR-23b se encontraban disminuidos en la progresión de COE y adicionalmente que sus niveles disminuyen por efecto de NGF en líneas celulares de epitelio ovárico tumorales y no tumorales.

Hipótesis: El aumento en los niveles del miR-23b produce una disminución en la proliferación, migración e invasión y disminuye los niveles de c-Myc y VEGF en un modelo *in vitro* de líneas celulares de epitelio no tumoral y tumoral de ovario.

Objetivo: Evaluar si la sobreexpresión de miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de epitelio ovárico y si esta sobreexpresión disminuye los niveles de c-Myc y VEGF tanto a nivel proteico como de mRNA en líneas celulares de epitelio ovárico.

Metodología: Se realizaron experimentos *in vitro* para evaluar el efecto de la sobreexpresión del miR-23b en las líneas celulares no tumoral (HOSE) y tumoral (A2780). Se realizaron ensayos de proliferación, migración e invasión. Además, se midieron los niveles de mRNA y proteicos de c-Myc y VEGF. Para esto se transfectaron las líneas celulares con 30 nM del miR-23 con lipofectamina por 48 h, usando dos controles, un grupo solo con lipofectamina y un grupo con transfección de un RNA scramble.

Resultados: Al sobreexpresar el miR-23b se encontró en la línea celular A2780 una disminución en la proliferación, migración e invasión, también disminuyeron los niveles proteicos de c-Myc y VEGF, mientras que solo el mRNA de VEGF disminuyó por efecto del miR. En la línea celular HOSE, se encontró una disminución de la proliferación y los niveles proteicos de c-Myc por efecto del miR-23b.

Conclusión: En este trabajo se encontró que el miR-23b presenta un rol supresor de tumores, ya que disminuye varios procesos involucrados en cáncer, como son la proliferación, migración e invasión celular. Además, miR-23b disminuye proteínas importantes para el desarrollo y progresión del cáncer como son el factor transcripcional c-Myc y VEGF, un factor angiogénico muy importante en cáncer ovárico. Estos resultados sugieren la importancia de continuar investigando otras moléculas que pueden ser blancos de este mRNA, así como también utilizar menor concentración de este miR como posible terapia adyuvante en cáncer ovárico epitelial, para no tener efecto en las células no tumorales.

SUMMARY

Effect of miR-23b overexpression on proliferation, migration and invasion and its effect on c-Myc and VEGF in a vitro model of Epithelial Ovarian Cancer

Epithelial ovarian cancer (EOC) is the leading cause of death from gynecological malignancies in developed countries such as Canada and USA. In Chile, it is the second cause of death due to gynecological malignancies. This cancer is characterized by being late diagnosis, due to its little specific symptomatology and having a poor response to treatment. Considering the above, it is important to understand the mechanisms of both the genesis and the development of this neoplasm. In our group we have found an overexpression of the nerve growth factor (NGF) and its high affinity receptor TRKA during the progression of this neoplasm. NGF-focused research has shown that this growth factor has an important role in EOC, primarily stimulating proliferation and angiogenesis directly and indirectly. In addition, NGF can induce the expression of VEGF and c-Myc in OEC explants. Other molecules involved in carcinogenesis are microRNAs (miR), these are small non-coding RNAs, capable of regulating gene expression, by preventing the translation of messenger RNAs. They are involved in several biological processes such as development, differentiation, apoptosis and proliferation, so miRs also have an important role in oncogenesis, because they can act as tumor suppressors or as oncogenes. One of these miRs is miR-23b, which has been described to be diminished in several types of cancer, such as prostate cancer, bladder cancer and ovarian cancer among others. The literature has described miR-23b as a tumor suppressor, managing to promote apoptosis and inhibit proliferation, migration and invasion in vitro. As for the targets mRNAs associated

with this miR, it has been described that it is capable of decreasing VEGF levels and that it is forming a loop with c-Myc, which is described would be able to decrease the transcription of miR-23b to have DNA binding sites where miR-23b transcription occurs. In addition, our group found that miR-23b levels were decreased in EOC progression and additionally that their levels decrease due to NGF in tumor and non-tumor ovarian epithelial cell lines.

Hypothesis: Overexpression of miR-23b decreases proliferation, migration and invasion and levels of c-Myc and VEGF in non-tumor epithelial and ovarian tumor cell lines.

Objective: To assess whether overexpression of miR-23b decreases proliferation migration and invasion in ovarian epithelial cell lines and if this overexpression decreases levels of c-Myc and VEGF both at the protein level and of mRNA in ovarian epithelial cell lines.

Methodology: In vitro experiments were performed to assess the effect of miR-23b overexpression on non-tumor (HOSE) and tumor (A2780) cell lines. Proliferation, migration and invasion assays were performed. In addition, mRNA and protein levels of c-Myc and VEGF were measured. For this, cell lines were transfected with 30 nM of miR-23 with lipofectamine for 48 h, using two controls, a group with only lipofectamine and a group with transfection of a scramble RNA.

Results: When overexpressing miR-23b a decrease in proliferation, migration and invasion was found in the A2780 cell line, c-Myc and VEGF protein levels also decreased, while only VEGF mRNA decreased due to miR. In the HOSE cell line, a decrease in the proliferation and protein levels of c-Myc was found due to the effect of miR-23b.

Conclusion: In this work it was found that miR-23b has a tumor suppressor role, since it decreases several processes involved in cancer, such as cell proliferation, migration and invasion. In addition, miR-23b decreases proteins important for the development and progression of cancer such as the transcriptional factor c-Myc and VEGF, a very important angiogenic factor in ovarian cancer. These results suggest the importance of continuing to investigate other molecules that may be targets of this mRNA, as well as using a lower concentration of this miR as a possible adjuvant therapy in epithelial ovarian cancer, so as not to have an effect on non-tumor cells.

I. INTRODUCCIÓN

I.1. Cáncer Ovárico

Dentro de las neoplasias que afectan a las mujeres a nivel mundial, el cáncer de ovario ocupa el sexto lugar. Sin embargo, entre las neoplasias ginecológicas, la incidencia y mortalidad de este cáncer es más alta en países desarrollados como Canadá, EE. UU. y países de Europa occidental (Hennessy, Coleman, & Markman, 2009; Torre et al., 2015). En Chile, el cáncer de ovario es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas (MINSAL, Chile, 2013).

La alta mortalidad en este tipo de cáncer se explica porque la sintomatología es muy inespecífica, la que se asemeja a la de enfermedades ginecológicas, gastrointestinales y genitourinarias, de manera que el diagnóstico se realiza en estadios avanzados de esta enfermedad (Cuello F, 2013; Torre et al., 2015). En estos estadios hay un gran compromiso funcional del ovario y una pobre respuesta a la terapia, lo que lleva a que la supervivencia a 5 años del diagnóstico no sea mayor al 30% (MINSAL, Chile, 2017).

I.2. Diagnóstico

La detección temprana es crítica para mejorar la supervivencia, para lo cual es necesario que la paciente tenga lesiones clínicamente detectables en etapas tempranas (Hennessy et al., 2009). Por otra parte, en la actualidad, los métodos de diagnóstico permiten que sólo el 20% de las pacientes sean diagnosticadas cuando el cáncer se encuentra localizado solamente en el ovario (Bast et al., 2009). En esta línea, uno de los métodos de diagnóstico es la medición sérica del marcador CA-125, el cual por sí solo no posee ni la especificidad ni la sensibilidad para ser usado en screening, de modo que, para mejorar la

especificidad, se usa en conjunto con la ultrasonografía transvaginal (TVS) (Hennessy et al., 2009).

I.2.a. Marcadores Tumorales para COE

Actualmente el marcador más utilizado a nivel mundial es el CA-125, el cual cuenta con una sensibilidad entre un 50% y un 62% y una especificidad entre 94% y 98%. El cual no aumenta lo suficiente sus niveles séricos en estadios tempranos del cáncer de ovario, y sólo un 80% de los cánceres de ovario expresan este marcador (Sölétormos et al., 2016).

En la actualidad se están buscando nuevas alternativas y combinaciones de marcadores para aumentar la sensibilidad y especificidad al momento de realizar un screening para cáncer de ovario en etapas tempranas. Entre las nuevas opciones que están disponibles actualmente como método de screening nos encontramos con la medición en conjunto del CA-125 y el HE-4, los cuales al ser medidos en conjunto se logra aumentar la sensibilidad un 74% en mujeres premenopáusicas y un 95% en mujeres postmenopáusicas y la especificidad a un 89% en premenopáusicas y un 83% en postmenopáusicas, aplicando un algoritmo disponible en la web, llamado ROMA (Sölétormos et al., 2016).

Además, se están desarrollando nuevos métodos de screening, entre los que podemos encontrar la determinación de distintos microRNAs que de manera conjunta podrían funcionar tanto para la detección como para el pronóstico de este cáncer (Meng et al., 2015; Pal 2015).

I.3. Causas

El cáncer de ovario puede desarrollarse a partir de varios tipos celulares como las células germinales, células de la granulosa o células epiteliales. Cuando la malignidad comienza en estas últimas se denomina cáncer ovárico epitelial (COE), constituyendo más del 90% de los tipos de cáncer de ovario (Chen et al., 2003).

Existen diversas mutaciones, que contribuyen a la patogénesis de muchos tipos de cáncer. Específicamente en COE, un 15% de las pacientes tiene mutaciones en el gen BRCA1 o BRCA2 (Wahner et al., 2017).

Hoy en día, existen tres hipótesis relacionadas entre sí que tratan de explicar el desarrollo de esta patología.

I.3.a. Ovulación incesante

Se postula que las sucesivas rupturas del epitelio de la superficie ovárica y la consiguiente proliferación celular, como mecanismo reparativo post-ovulación, conlleva a la formación de quistes de inclusión. Estos quistes aumentarían el riesgo de carcinogénesis capturando células epiteliales en un ambiente con constante estimulación autocrina y/o paracrina por factores de crecimiento como hormonas, fosfolípidos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), etc. (Hennessy et al., 2009).

I.3.b. Estimulación gonadotrópica.

Se postula que los altos niveles de las gonadotrofinas durante la ovulación y las altas concentraciones en la menopausia estimulan a las células epiteliales de la superficie ovárica, lo que conlleva a la carcinogénesis (Hennessy et al., 2009). Lo anterior se explica debido a que las gonadotrofinas producen un aumento en la producción de estrógenos en las células epiteliales (Fleming et al., 2006),

aumentando así la expresión del factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor TRKA, los que juegan un rol importante en la angiogénesis y proliferación del cáncer ovárico epitelial (Campos et al., 2007). Además, los genes de NGF y VEGF tienen elemento de respuesta para estradiol (Valladares et al., 2017), lo que implica un aumento de la angiogénesis, ya que en nuestro laboratorio se ha encontrado que ambos factores de crecimiento aumentan con la progresión del COE (Tapia et al., 2011), ya que este cáncer se caracteriza por ser altamente angiogénico.

I.3.c. Efecto inflamatorio

Se postula que durante la ruptura de los folículos maduros (producto de la ovulación) y la consiguiente proliferación de las células epiteliales como mecanismo reparativo, se genera un proceso inflamatorio llevado a cabo por citoquinas y moléculas pro-inflamatorias. Este proceso inflamatorio se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer ovárico epitelial (Fleming et al., 2006).

I.4.a. Rol de NGF en cáncer de ovario

Debido a que NGF promueve la proliferación y supervivencia celular, éste juega un rol importante en el desarrollo y progresión del cáncer ovárico epitelial. Por otro lado, NGF también promueve la angiogénesis, proceso que es clave para la mantención y progresión de cualquier tipo de cáncer. Lo anterior se explica por el hecho que las células de la granulosa secretan NGF y, de manera autocrina, éste estimula a través de la activación de su receptor TRKA, causando la secreción de VEGF, provocando el aumento en la supervivencia, proliferación y migración de las células endoteliales (Campos et al., 2007; Tapia et al., 2011).

También NGF puede actuar aumentando otras proteínas, como lo es el factor transcripcional c-Myc, el cual se encuentra comúnmente asociado a un aumento de la proliferación (Urzúa et al., 2012).

I.5. microRNAs

Los microRNAs (miRNA o miR) son moléculas de RNA pequeños con una longitud de entre 18 y 25 nucleótidos, no codificantes y altamente conservados entre las especies (Kinose et al., 2014).

Su función es el silenciamiento de moléculas de mRNA a través de la represión transcripcional o la degradación dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el mRNA. Por lo general el sitio de unión al mRNA blanco está dado por la región 3'-UTR de este mRNA (Piva et al., 2013). La región 5' del miR, desde el nucleótido en la posición 2 al 7 son conocidos como la región semilla y es una región clave para el reconocimiento de su blanco (Ha & Kim, 2014). El resto de los nucleótidos no requieren de una total complementariedad para lograr ejercer su función (Müller et al., 2014).

I.5.a. Biogénesis de los miRs

La biogénesis de los miRNAs está dada por las secuencias precursoras de los miRNAs, ubicadas en diferentes partes del DNA y que pueden presentarse como unidades transcripcionales mono o policistrónicas (Olena & Patton, 2009).

Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II desde el genoma, produciendo una molécula larga con una estructura en forma de horquilla (stem-loop), denominada pri-miRNA. Luego, el pri-miRNA es cortado por la endonucleasa Drosha que junto con el cofactor DGCR8 (también llamado Pasha en invertebrados), forman el complejo microprocesador. DGCR8 interactúa con los pri-miRNAs a través de los segmentos de cadena simple y del tallo,

permitiendo que Drosha los corte. El producto resultante es una molécula de 60-70 nucleótidos denominada pre-miRNA (Ha & Kim, 2014).

El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma gracias a la exportina-5. Una vez en el citoplasma, el pre-miRNA es liberado del complejo exportador al desensamblarse, y es reconocido por el complejo endonucleasa formado por Dicer y TRBP (Proteína de unión a RNA). Dicer rompe y elimina el bucle de los pre-miRNAs, generando un miRNA de doble hebra de aproximadamente 22 nucleótidos, que contiene una cadena madura de miRNA y su cadena complementaria.

Finalmente, este complejo se ensambla con la proteína Ago2 gracias a la unión con TRBP, para formar el complejo silenciador miRISC, el cual selecciona una de las cadenas que será responsable de dirigir el silenciamiento (por complementariedad), y la otra hebra podría o no ser degradada (Ha & Kim, 2014). (Figura 1).

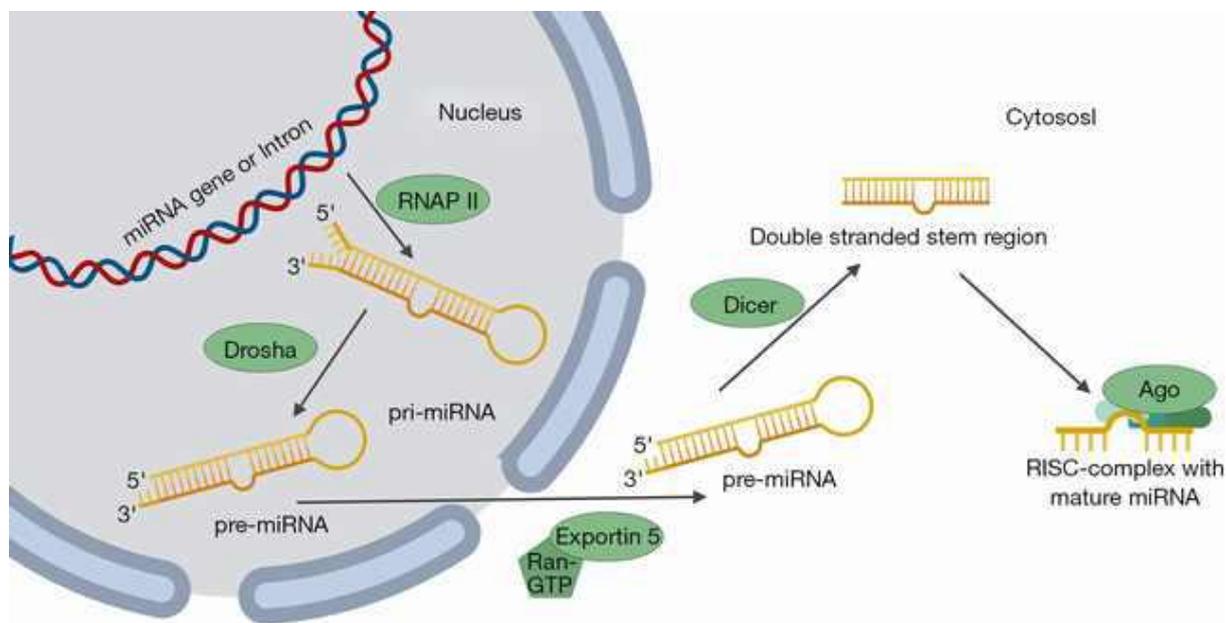


Figura 1. Biogénesis de los microRNA. Los miRNAs son transcritos como Pri-miRNA por la RNA Pol II en el núcleo, luego son cortados por Drosha y DGCR8 produciendo el Pre-miRNA, que es exportado desde el núcleo al citoplasma por Exportina5 y es posteriormente procesado por Dicer generando un miRNA maduro de doble hebra, este se ensambla con Ago2, formando el complejo miRISC (Foessl et al., 2019).

Es importante entender el rol que cumplen los microRNA en las enfermedades como el cáncer, ya que la regulación y el equilibrio de los miRNAs es muy importante para el correcto funcionamiento celular, ya que estos están regulando proteínas oncogénicas y oncosupresoras. Mientras que en el proceso neoplásico se pierde este equilibrio y cambia la expresión de los miRNAs (Iorio & Croce, 2012).

I.6. miRs en cáncer

Se estima que los miRs estarían regulando aproximadamente un 60% de la expresión génica (Enokida, 2018). Esto es debido a que un solo miRNA es capaz de reconocer múltiples blancos y que solo un mRNA puede ser regulado por múltiples miRNAs, por tanto, es importante entender la regulación de los microRNA y sus blancos (Piva et al., 2013).

Los miRNAs están involucrados en variados procesos biológicos como el ciclo celular, la diferenciación celular y la apoptosis, razón por la cual su desregulación está asociada a distintas enfermedades como el cáncer (Chou et al., 2018).

La primera evidencia que vincula a los miRs con el desarrollo del cáncer es en el año 2002, pero desde entonces se han seguido recopilando antecedentes, relacionando a los miRs con el inicio, la progresión, la metástasis y la resistencia a drogas a través de los mRNA blancos asociados al cáncer (Enokida, 2018).

Varios estudios muestran que los miRs se expresan de forma anormal en diferentes tipos de neoplasias (Visone & Croce, 2009). Además, se ha determinado que más del 50% de los genes que transcriben para estos miRs, se localizan en sitios de inestabilidad genómica asociadas al desarrollo de cáncer (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

Estudios más recientes buscan usar a los miR como biomarcadores de diagnóstico y de pronóstico para distintos tipos de cáncer (Wang, Chen, & Sen, 2016), pero también se están investigando como alternativas, para en conjunto con terapias tradicionales para tener una mayor eficacia (Christopher et al., 2016; Rupaimoole & Slack, 2017). En la actualidad, el nuevo desafío es encontrar patrones de expresión de los miRNAs en los distintos cánceres, identificar posibles miRs que sirvan de biomarcadores y blancos terapéuticos para los distintos tipos de cáncer.

Con el objetivo de comprender el funcionamiento de los miRs en el desarrollo de la metástasis, el grupo de Zhang (Zhang et al., 2011) realizó un microarray para 904 miRs en distintas líneas celulares cancerígenas. de los cuales encontraron que aproximadamente un 20% estaban relacionados con la regulación en la migración. Luego realizaron ensayos de migración, invasión y apoptosis, obteniendo un total de 36 miRs capaces de regular negativamente la migración, la invasión e inducir la apoptosis de manera significativa, entre los que destacaron miR-143, miR-145, miR-185, miR-451, miR-593* y el miR-23b. En donde el miR-23b fue el que presentó un mayor cambio, por lo que tendría una mayor capacidad para regular la migración, la invasión y la apoptosis (Zhang H. et al., 2011).

I.7. miRs en cáncer ovárico epitelial

Particularmente en COE hay una amplia evidencia de que los miRNAs están desregulados. Dentro de los miRs que están elevados en esta patología, tenemos a la familia del miR-200, al miR-221, entre otros. Mientras que los miRs que están disminuidos podemos encontrar al miR-145, al miR-125b y al miR-23b entre otros (Kinose et al., 2014; Mezzanzanica et al., 2010).

Un estudio de miRs en plasma de pacientes con cáncer ovárico, en búsqueda de nuevos marcadores diagnósticos y pronósticos proponen que al usar el CA-125 en conjunto con la medición de los niveles de let-7f y miR-205 serían potenciales marcadores para el diagnóstico temprano de COE (Zheng et al., 2013). Además del estudio anterior, se ha reportado que los niveles de miR-21 en suero también podrían ser utilizados como marcador diagnóstico y pronóstico de la sobrevida en COE (Xu et al., 2013).

Otro miRNA que se ve alterado en COE es el miR-145, el cual se encuentra disminuido tanto en tejidos como en líneas celulares de COE y al aumentar sus niveles in vitro se reducen los niveles de VEGF (Xu et al., 2012) y además estaría modulando al factor transcripcional c-Myc (Zhang et al., 2014).

En nuestro grupo, se encontró un aumento de la expresión de NGF durante la progresión del cáncer ovárico epitelial y una disminución en los niveles de miR-23b. A su vez, en líneas celulares de epitelio ovárico estimuladas con NGF se observó una disminución de los niveles de miR-23b (Retamales-Ortega et al., 2017). Estos resultados sugieren que existe un control de NGF en la expresión del miR-23b en el COE. El miR-23b es un miRNA de 21 pb involucrado en diferentes enfermedades, entre ellas la regulación cardiovascular y el control de infecciones virales. Pero el rol más destacado es como supresor de metástasis en varios tipos de cáncer (Wang et al., 2018).

I.8. miR-23b en cáncer

El miR-23b es un claro ejemplo de un modulador pleiotrópico, ya que es capaz de afectar una amplia gama de procesos celulares. Se ha identificado que el miR-23b es capaz de regular normalmente varios procesos, en los que podemos encontrar la embriogénesis, la motilidad y la diferenciación. Además, se ha encontrado que juega roles importantes en procesos celulares tales como la

diferenciación, en la homeostasis de endotelios y en distintas enfermedades como lo son el cáncer (Viswanathan, Fields, & Boman, 2014).

Se ha documentado que, en cáncer de mama, próstata y de cuello uterino se encuentran niveles reducidos de este miR (Campos-Viguri et al., 2015).

Adicionalmente, en COE se han encontrado que sus niveles están significativamente disminuidos (Li et al., 2014; Retamales-Ortega et al., 2017)

Al sobreexpresar los niveles de miR-23b in vitro, se observó una disminución de la proliferación, la migración y la invasión en líneas celulares de cáncer prostático (Majid et al., 2012). Además, en una línea celular de cáncer colorrectal transfectada con un mimic de miR-23b mostró una reducción del 25% de los niveles de VEGF secretados (Zhang et al., 2011). Mientras que en un modelo in vivo se encontró que miR-23b era capaz de inhibir la metástasis (Zhang et al., 2011).

Por otro lado, hay varios trabajos que han encontrado una relación entre miR-23b y c-Myc, pero principalmente mencionan que c-Myc estaría reprimiendo la expresión de miR-23b al unirse a su región promotora (Amodio et al., 2013; Chen et al., 2015; Gao, Ping, 2009). Más recientemente se ha mencionado una nueva relación, en donde miR-23b y c-Myc estarían formando un loop (Fulciniti et al., 2016).

Los estudios anteriormente mencionados, nos muestran que miR-23b tiene un gran potencial para ser estudiado en cáncer ovárico epitelial, ya que sería capaz de disminuir la proliferación, la migración, la invasión, la angiogénesis y la metástasis a través de distintas proteínas que serían sus blancos.

Con estos antecedentes planteados, sería importante evaluar en líneas celulares epiteliales no tumorales y tumorales de ovario, si el miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión, así como también las proteínas VEGF y c-Myc, las cuales aumentan por efecto de NGF tanto en explantes de COE como

en líneas celulares de COE; ya que en trabajos previos de nuestro grupo se encontró que NGF disminuye los niveles de miR-23b en una línea celular de cáncer ovárico epitelial (Tesis para optar al Título de Bioquímica de Andrea Hernández, 2017).

II.1 HIPÓTESIS

El aumento en los niveles del miR-23b produce una disminución en la proliferación, migración e invasión y disminuye los niveles de c-Myc y VEGF en un modelo in vitro de líneas celulares de epitelio no tumoral y tumoral de ovario.

II.2 OBJETIVO GENERAL

Evaluar si la sobreexpresión de miR-23b disminuye la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de epitelio ovárico y si esta sobreexpresión disminuye los niveles de c-Myc y VEGF tanto a nivel proteico como de mRNA en líneas celulares de epitelio ovárico.

II.3 OBJETIVO ESPECÍFICOS

1. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b en la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de epitelio ovárico.
2. Determinar los niveles de mRNA de c-Myc y VEGF en la línea celular de cáncer ovárico epitelial al sobreexpresar el miR-23b.
3. Estudiar los niveles proteicos de c-Myc y VEGF en las líneas celulares de epitelio ovárico al sobreexpresar el miR-23b.

III. METODOLOGÍA

III. 1. Cultivo Celular

Para los estudios *in vitro* se utilizaron cultivos de las líneas celulares del epitelio de la superficie ovárica humana no tumoral (HOSE) y de cáncer de ovario epitelial humano (A2780). Las células se cultivaron en placas de 100 mm, con medio de crecimiento DMEM Ham F12 convencional sin rojo de fenol (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma Aldrich D2906-IL) suplementado con 1,2 g/L de bicarbonato de Sodio, 10% de suero fetal bovino (SFB) tratado con carbón dextrano (Hyclone Thermo Fisher Scientific) y antibióticos y antimicóticos 1X, a temperatura de 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Cuando las células presentaron confluencia del 80%, se lavaron con PBS 1X estéril (Dulbecco's Phosphate-Buffered Salines, GIBCO, Invitrogen); posteriormente, las células se disociaron de la superficie con Tripsina-EDTA al 0,25%. (Gibco, Thermo Fisher Scientific 25300054) por 3 min a 37°C.

El conteo de las células en suspensión se realizó con el contador automático de células LUNA (BioRad), para lo cual se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos en medio 10% SFB para luego realizar los tratamientos para la posterior extracción de RNA y proteínas. Para los ensayos de Inmunocitoquímica (ICQ), se sembraron 50,000 células por pocillo en placas de 24 pocillos sobre un cubreobjeto redondo. Para los ensayos de migración e invasión se utilizaron 100.000 y 70.000 células respectivamente en los insertos correspondientes.

III.1.a. Líneas Celulares

Se utilizaron células de epitelio de superficie ovárica humana no tumorales (A2780) y no tumorales (HOSE). Las células epiteliales de la superficie ovárica inmortalizadas (HOSE) fueron obtenidas desde una paciente posmenopáusica con cáncer endometrial.

La línea celular de Carcinoma Ovárico Epitelial Humano (A2780) es una línea celular de cáncer ovárico epitelial, sensible a fármacos. Esta línea celular fue establecida a partir de tejido tumoral de una paciente, previo al tratamiento.

III.2. Transfección de líneas celulares

Las Transfecciones fueron realizadas en medio 2% SFB por un periodo de 48 h. La condición control, corresponde al medio 2% SFB con lipofectamina 2.000 (Thermo Scientific 11668019), con una concentración final de 1:1.000, la condición miR-23b corresponde a la incubación de las células con lipofectamina y un mimic del miR-23b en una concentración final de 30 nM y finalmente la condición scramble corresponde a la incubación de las células con la lipofectamina y un RNA scramble con una concentración final de 40 nM (Santa Cruz Biotechnology SC-37007) que se utilizará como control negativo de la transfección. Todos los estímulos se incubaron a 37°C y en atmosfera 5% de CO₂.

La eficiencia de la transfección será evaluada mediante una marca fluorescente roja (Cy5) que posee el mimic del miR-23b en su hebra 5'.

III.3. Ensayos de Proliferación

Para evaluar la capacidad proliferativa de las líneas celulares HOSE y A2780, se realizó un ensayo de MTS (Abcam ab197010), para lo cual, se sembraron 5.000 células por pocillo en una placa de 96 pocillos con medio de cultivo 10% SFB. Pasadas 24 h, fueron estimuladas en las condiciones antes mencionadas por 48 h. Se retira el medio de los pocillos y cada pocillo se lava con PBS 1X tibio, se agregan 90 μ L de medio sin suero y 10 μ L del reactivo MTS, se deja incubar 1 h a 37°C. Cada condición se realizó en duplicado y se leyó la placa a 490 nm (BIOTEK EL800). Además, se hará una detección de Ki-67 por inmunocitoquímica (ICQ) con anticuerpo Ki-67 (Santa Cruz Biotechnology SC-23900). Los datos se graficaron como la Media \pm Error Estándar.

III.4. Ensayo de migración celular

Los insertos *transwell* corresponden a cámaras que se caracterizan por tener una membrana porosa en su base, con un tamaño de poro de 8 μ m para permitir el paso de las células A2780. En este ensayo las células son sembradas sobre los insertos y aquellas con capacidad migratoria, traspasan la membrana porosa.

El día anterior al ensayo, la base de los insertos es recubierta con fibronectina 0.003 mg/mL en PBS 1X y se deja a 4°C. Al día siguiente, el inserto se lava en PBS 1X y 100.000 células A2780 en las distintas condiciones son sembradas dentro del inserto en medio de cultivo sin SFB, luego los insertos fueron depositados en una placa de 24 pocillos la cual contenía 500 μ L de medio 5% SFB, el cual es utilizado como atrayente. Después de 8 h de incubación a 37°C, se retiran los insertos y son teñidos con cristal violeta 1:5 en NaCl 2.5 M por 40 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los insertos son lavados con agua destilada y se dejaron secar a 37°C por 1 h, para finalmente raspar las

células que no migraron en el interior del inserto con un hisopo humedecido. Las células con capacidad migratoria fueron contadas bajo microscopio. Los datos se graficaron como la Media \pm Error Estándar.

III.5. Ensayo de invasión

Los insertos *transwell* se encuentran recubiertos con matrigel, esta membrana constituye una barrera adicional para que las células puedan traspasar el inserto, de este modo, solo podrán traspasar la membrana aquellas células que logren degradar esta membrana, es decir, células que posean capacidad invasiva.

Se utilizaron los insertos comerciales Matrigel (BD 354480). 2 h antes de comenzar el ensayo los insertos son hidratados con medio sin suero. Se retiran los insertos del medio y se siembran 70.000 células A2780 en medio sin suero dentro del inserto, los insertos fueron depositados en una placa de 24 pocillos la cual contenía 500 μ L de medio 10% SFB, el cual es utilizado como atrayente. Transcurridas 24 h de incubación a 37°C, se retira el inserto y las células que no lograron invadir fueron raspadas con un hisopo humedecido. Luego las células en el inserto fueron fijadas con metanol 100% por 2 minutos y lavadas 3 veces con PBS 1X, posteriormente las células son teñidas con azul de toluidina 0.5% por 10 minutos. Finalmente, los insertos se lavan con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente por 15 minutos. Las células con capacidad invasiva fueron contadas bajo microscopio. Los datos se graficaron como la Media \pm Error Estándar.

III.6. Inmunocitoquímica (ICQ)

Para los ensayos de ICQ, las células A2780 y HOSE se cultivaron en placas de 24 pocillos, como se indicó anteriormente. Se sembraron 50,000 células en cubreobjetos redondos de 12 mm con medio de cultivo 10% SFB. Pasadas 24 h, fueron estimuladas con las condiciones anteriormente descritas por 48 h. Luego, las células fueron fijadas con para-formaldehído (PFA) al 2% en PBS 1X durante 2 min y posteriormente en PFA al 4% durante 15 min a temperatura ambiente. La permeabilización se logró incubando las células en solución Triton X-100 (Winkler BM-2020) al 0,3% en PBS 1X durante 15 min seguido de 3 lavados con PBS 1X.

La peroxidasa endógena se bloqueó al incubar las células en peróxido de Hidrógeno al 3% (Merck K46809910526) durante 15 min. Las placas fueron lavadas 3 veces con PBS 1X. Para inhibir la unión no específica de anticuerpos, las muestras se incubaron en solución de bloqueo PBS-BSA 2% por 30 minutos. Las células se incubaron con anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 2% overnight en cámara húmeda a 4-8°C. El control negativo contenía solamente PBS-BSA 2% y se incubó en las mismas condiciones del anticuerpo primario. En la Tabla 1 se describen las características de los anticuerpos primarios utilizados. Después de la incubación, se realizaron 3 lavados con PBS 1X y se incubaron todas las muestras, con anticuerpo secundario biotinilado unido a la enzima HRP y el sistema estreptavidina-peroxidasa diluido en PBS-BSA 2% durante 1 hora a 37°C. En la Tabla 1 se describen las características de los anticuerpos secundarios utilizados.

El anticuerpo secundario fue eliminado por aspiración seguido de 3 lavados con PBS 1X. La señal producto de la unión antígeno-anticuerpo se obtuvo usando un sistema de detección colorimétrico, mediante la incubación con el sustrato cromogénico DAB (DAKO K34-68) durante 1 minuto, el cual forma un

precipitado que corresponde a un compuesto color café que significa una señal inmuno-positiva. Posteriormente se sumergieron las muestras en agua destilada y se realizó la contra-tinción con hematoxilina diluida 1:5 en agua destilada, durante 1 minuto para identificar los núcleos. Las muestras fueron deshidratadas incubándolas en soluciones con concentraciones crecientes de alcohol: 70%, 95%, 100% durante 5 minutos cada vez, con posterior incubación en HistoClear (National Diagnostics HS-200) por 5 y 10 minutos. Finalmente se agregó solución de montaje Entellan (Millipore HX54866861) para su posterior visualización.

La visualización se realizó utilizando un microscopio óptico (Olympus BX51TF) conectado a una cámara fotográfica (Q-Imaging). Para la evaluación semi-cuantitativa de las muestras, se tomaron aproximadamente 10 fotografías de cada condición; y utilizando el programa Image Pro Plus 6.0 se midió la intensidad de los píxeles en un área seleccionada, lo que representa la tinción correspondiente a la marca inmuno-positiva a través de la herramienta IOD. Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias (UA) y se graficaron como la Media \pm Error Estándar.

III.7. Western Blot

Las proteínas totales se obtuvieron a partir de placas con 500,000 células por pocillo que fueron cultivadas en medio suplementado hasta obtener un 80% de confluencia. Posteriormente el medio suplementado fue sustituido por cada uno de los estímulos descritos anteriormente durante 48 h. Al finalizar la incubación se removió el medio y se realizó un lavado con PBS 1X. La extracción de proteínas se realizó utilizando tampón de homogenización, preparado a partir de buffer RIPA y un cóctel anti-proteasas y fosfatasas 1X (Thermo Scientific 1861284). Las células fueron dissociadas de la superficie de la placa por

homogenización mecánica utilizando un *scraper* y fueron transferidas a un tubo ependorff. Para complementar la lisis celular total, las muestras se sonicaron al 25% con 3 pulsos de 5 segundos en hielo. Los tubos se centrifugaron a 15,000 RPM por 15 min a 4°C y el sobrenadante con las proteínas totales fue transferido a un nuevo tubo.

Las proteínas extraídas fueron cuantificadas mediante ensayo BCA (Thermo Scientific 23227), el producto colorimétrico se cuantificó por espectrofotometría a través de una lectura a 562 nm de longitud de onda y las absorbancias obtenidas se interpolaron en una curva estándar de 2 ng/mL de BSA para obtener los microgramos (μg) de proteínas totales presentes en cada muestra. Las proteínas, fueron separadas por migración de acuerdo con su peso molecular una Electroforesis SDS-PAGE en condiciones denaturantes. Para ello, un volumen que correspondía a 40 μg de proteínas totales de cada una de las muestras se dispensaron tubos que contenían igual cantidad de buffer de carga 1X para la Electroforesis SDS-PAGE. Posteriormente se realizó la denaturación de las proteínas incubándolas a 95°C durante 5 min. Se agregaron las muestras denaturadas en un gel de poliacrilamida al 10%. Se utilizó un marcador de peso molecular de proteínas (AccuRuler RGB PLUS, MaestroGen 02102-250) en el primer pocillo de cada gel como referencia. La electroforesis se realizó en tampón de corrida 1 X a 60 voltios durante 40 min para el paso de las proteínas a través del gel concentrador y a 100 voltios durante 90 min para el paso de las proteínas a través del gel separador.

Las proteínas separadas mediante electroforesis fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 μm (Protran Perkin NBA0858001EA) mediante electro-transferencia húmeda en tampón de transferencia 1X a 400 mA durante 90 min.

Para confirmar la transferencia, las bandas de las proteínas transferidas se visualizaron con tinción de las membranas con Rojo Ponceau. Las membranas se bloquearon en leche descremada al 5% en TTBS 1X durante 1 h a temperatura ambiente. Las membranas bloqueadas se incubaron durante toda la noche a 4°C con anticuerpo primario (Tabla 1) diluido en leche; luego, las membranas se incubaron durante 1 hora con anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP en una dilución de 1:5.000 en leche.

Para el revelado se utilizó el sistema de detección por quimioluminiscencia. Para esto, las membranas se sumergieron durante 1 minuto con el sustrato luminol diluido en peróxido de Hidrógeno (1:1) (Westar Sun Chemiluminescent Substrate; Cyanagen XL5063,0250). Posteriormente la señal quimioluminiscente se visualizó con el equipo Image Quant LAS 500 (General Electric). Las bandas presentes en las fotografías obtenidas se analizaron semi-cuantitativamente con el programa Image J (National Institutes of Health) mediante el análisis densitométrico de la intensidad de cada banda; los datos obtenidos corresponden a unidades arbitrarias (UA). Las UA de cada banda de las diferentes proteínas fueron normalizadas con las UA de la proteína constitutiva para cada muestra, que en este trabajo fue β -Actina. Los datos se graficaron como la Media.

PROTEÍNA	ANTICUERPO	FABRICANTE	CONCENTRACIÓN	CÓDIGO
c-Myc	Monoclonal de conejo.	Cell Signaling	ICQ: 1:500 WB: 1:500	D84C12
KI-67	Monoclonal de ratón	Santa Cruz Biotechnology	ICQ: 1:250	SC-23900
β-Actina	Monoclonal de ratón	Sigma-Aldrich	WB: 1:10.000	A5441
Anti-Rabbit	Secundario Acoplado a HRP	Jackson Immunoresearch	ICQ: 1:300 WB: 1:5.000	115-035- 003
Anti-Mouse	Secundario Acoplado a HRP	Jackson Immunoresearch	ICQ: 1:300 WB: 1:5.000	111-035- 003

Tabla 1. Descripción de los anticuerpos primarios y secundarios y la concentración utilizada para ICQ/WB.

III.8. ELISA de VEGF

Los niveles de VEGF secretados se evaluaron en los medios de cultivo mediante inmunoensayo. La detección de VEGF se realizó con el kit Quantikine Human VEGF Immunoassay (R&D Systems DVE00). El inmunoensayo se realizó según las instrucciones entregadas por el fabricante y la medición de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de ELISA (BIOTEK EL800). Los datos se graficaron como la Media \pm Error Estándar.

III.9. Extracción de RNA y retrotranscripción

Las muestras de RNA total se obtuvieron a partir de los cultivos celulares usando el kit comercial Trizol (Ambion, #15596018). Para ello, se sembraron 500,000 células en placas de 6 pocillos y se incubaron y estimularon en las mismas condiciones descritas en la anteriormente. Al finalizar los tratamientos, se aspiró el medio y las células se lavaron una vez con PBS 1X frío. Para la extracción de RNA total, las células se lisaron agregando 1 mL de Trizol y se realizó homogenización mecánica utilizando un *scraper*. El homogenizado obtenido se transfirió a un tubo estéril y se agregó 200 μ L de cloroformo, el tubo se incubó 10 min a temperatura ambiente.

La separación de fases se realizó centrifugando las muestras a 13.000 rpm durante 15 min a 4°C. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo estéril. El RNA fue precipitado agregando isopropanol frío (1:1) y se mezcló invirtiendo cuidadosamente los tubos por 15 s. Los tubos se incubaron toda la noche a -20°C para la formación de un precipitado correspondiente al RNA total (*pellet*). Las muestras se centrifugaron a 13,000-15,000 rpm a 4°C y se eliminó el sobrenadante. El RNA total extraído y dispuesto en un *pellet* fue lavado 2 veces agregando 1 mL de etanol al 75% y centrifugando a 7,500 rpm a 4°C durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet a temperatura ambiente por 10 min. El RNA total fue resuspendido en 10 µL de agua libre de RNasa y fue cuantificado con el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) verificando la razón 260 / 280 nm para evaluar la pureza de la muestra (>1,8 pureza aceptable) y la razón 260 / 230 nm para evaluar la contaminación con sales, carbohidratos y fenoles (>1,5 óptimo). Las muestras fueron almacenadas a -80°C.

Para la retrotranscripción (RT), se utilizó la enzima transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen Cat. Nº 18064-014). A partir de un volumen correspondiente a 1 µg de RNA de cada muestra, se realizó la reacción de RT según las indicaciones del fabricante, utilizando Random Primers (Promega C118A) y dNTPs 10 mM (Promega U120-123 A). Las muestras de cDNA obtenidas se guardaron a -30°C para su posterior uso.

III.10. PCR convencional para VEGF

El cDNA fue amplificado en una mezcla de reacción de 25 µL, utilizando Buffer 5X, MgCl₂ 50 mM, dNTPs 10 mM, DNA GoTaq polimerasa 5 U/µL (Promega M829B), partidores sense y antisense (10 µM c/u) y un volumen de agua estéril necesario para completar 15 µL de reacción, agregando 5 µL de cDNA. Como

gen constitutivo se usó β -actina. La reacción se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG), con su respectivo programa de PCR (Tabla 2) y los partidores específicos para cada gen (Tabla 4). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, utilizando un estándar de peso molecular (Thermo Scientific 15628019) para validar el tamaño predicho de las bandas del amplificado. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta, fotografiados y analizados con el programa de densitometría UV Transilluminator UVP with Doc-it Software Image Acquisition and 1D Analysis (UVP, Inc. Laboratory Products). Como control negativo de la reacción, en vez de cDNA, se agregó agua estéril a la reacción.

Programa	Tiempo	Temperatura
Activación	5 minutos	95°C
Denaturación	30 segundos	94°C
Alineamiento	30 segundos	62°C
Extensión	1 minuto	72°C
Ciclos	30	-

Tabla 2. Programa de PCR usado para amplificar VEGF y β -actina.

III.11. qRT-PCR para c-Myc

Para el qRT-PCR se utilizó una mezcla con 6 μ L de SYBR Green (QIAGEN 218073), 1,2 μ L de los partidores (Tabla 4), 1,6 μ L de H₂O bi-destilada y 2 μ L de cDNA diluido 1:5 en agua bi-destilada estéril (volumen final de reacción: 12 μ L). Además, se utilizó como referencia pasiva el fluoróforo ROX en cada reacción incluido en el Master Mix de Qiagen.

Los qPCRs se realizaron en el termociclador Step One™ Real-Time PCR System Thermal Cycling Block (Applied Biosystems) usando el programa descrito en la Tabla 3. El análisis de los datos se realizó mediante una cuantificación relativa con el método matemático del $2^{\Delta\Delta CT}$.

Previo a esto, se determinó la eficiencia de cada par de partidores, mediante una curva estándar usando distintas diluciones de una mezcla de cDNAs de las muestras usadas en este estudio. La eficiencia ambos pares de partidores fue dentro del rango aceptado (90 y 110% de eficiencia), lo que permite la utilización del método matemático para la cuantificación relativa. Los datos se graficaron

Programa	Tiempo	Temperatura
Activación	15 minutos	95°C
Denaturación	15 segundos	94°C
Alineamiento	30 segundos	55°C
Extensión	30 segundos	70°C
Ciclos	40	-
Curva de melting	-	60°C a 95°C

Tabla 3. Programa de PCR usado para amplificar c-Myc y GAPDH.

Mrna	Secuencia
c-Myc	5'-TAC AAC ACC CGA GCA AGG ACG-3' 5'-CGG GAG GCT GCT GGT TTT C-3'
VEGF	5'-AGG CCA GCA CAT AGG AGA GA-3' 5'-ACC GCC TCG GCT TGT CAC AT-3'
GAPDH	5'-GCG AGA TCC CTC CAA AAT CA-3' 5'-ATG GTT CAC ACC CAT GAC GA-3'
β -actina	5'-TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA-3' 5'-CTA GAA GCA TGG CGG TGG ACG ATG GAG GG-3'

Tabla 4. Partidores de los genes amplificados por PCR

III.12. Análisis Estadístico

Para el cálculo del n muestral para los ensayos *in vitro*, se utilizó la fórmula de comparación de medias: $n = [2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S^2 / d^2]$, considerando α de 0,05 y β de 0,2 una diferencia entre las medias de un 25% (d) y una desviación estándar igual a 0,16 (S). El resultado del tamaño muestral obtenido fue de n=4 por grupo.

Los resultados obtenidos se expresaron como el promedio \pm error estándar. Todos los grupos fueron comparados con el grupo Control.

Considerando que la distribución de los datos obtenidos es no paramétrica, los análisis estadísticos realizados para los estudios se analizaron mediante la prueba de ANOVA no paramétrica Kruskal Wallis, con análisis de comparaciones múltiples mediante el post-test de Dunn, algunos análisis se realizaron mediante el test de Mann Whitney. Para todos los datos obtenidos, un valor de valor $p < 0,05$ fue considerado estadísticamente significativo. Estos análisis se realizaron utilizando el programa Graph Pad 6.0.

IV. RESULTADOS

IV. 1. Objetivo Específico 1

Evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b en la proliferación, migración e invasión en líneas celulares de epitelio ovárico.

Para evaluar el efecto de la sobreexpresión de miR-23b sobre la proliferación se realizó el ensayo de MTS, el cual mide la actividad metabólica de las células. Además, se realizó ICQ para el marcador Ki-67, el cual es un marcador de ciclo celular. En conjunto ambos ensayos, nos llevan a inferir el estado proliferativo de las células.

En la figura 2 se observan los resultados de la ICQ de Ki-67 en las células A2780, la marca de color café, correspondiente a la inmunodetección de Ki-67, se observa de manera nuclear, siendo más intensa en los nucleolos. En azul se observa la contra tinción con hematoxilina para observar los núcleos. Al realizar el conteo de los núcleos con marca positiva para Ki-67 se observa una disminución de los núcleos positivos en la línea celular A2780 al sobreexpresar miR-23b, esta disminución es de un 60% aproximadamente al comparar los tres grupos.

Al analizar la situación de la sobreexpresión del miR-23b en la línea celular HOSE, que se observa en la figura 3, podemos notar que la sobreexpresión del miR tiene un efecto similar en ambas líneas celulares, ya que también se aprecia una disminución de los núcleos positivos para Ki-67, comparado con las otras condiciones control. En esta línea celular la disminución fue de un 30% comparado con el control.

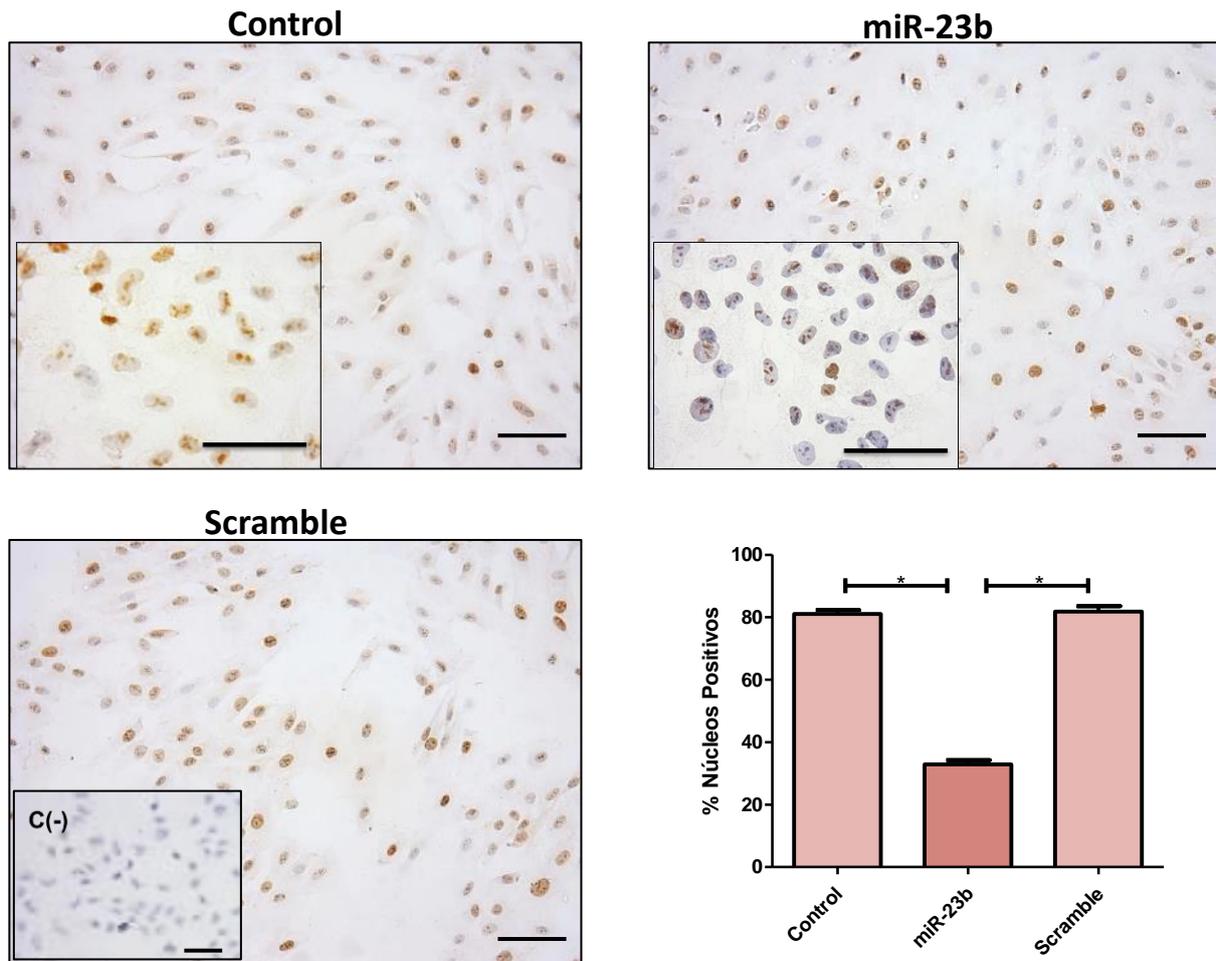


Figura 2. Inmunocitoquímica de Ki-67 en células A2780. Microfotografías representativas de la inmunodetección de Ki-67 en la línea celular A2780. Los paneles representan los distintos estímulos. Las barras corresponden a 50µm. El grafico corresponde a la semicuantificación del número de células positivas para Ki-67. Las barras corresponden al promedio ± error estándar medio (n=4 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de * $p < 0.05$

Al comparar la disminución de los núcleos positivos para Ki-67 en ambas líneas celulares, podemos notar que la disminución en las células A2780 es el doble de la disminución observada en las células HOSE, por lo que, si bien hay un efecto significativo en ambas líneas celulares, el mayor efecto se alcanza al sobreexpresar el miR-23b en la línea tumoral.

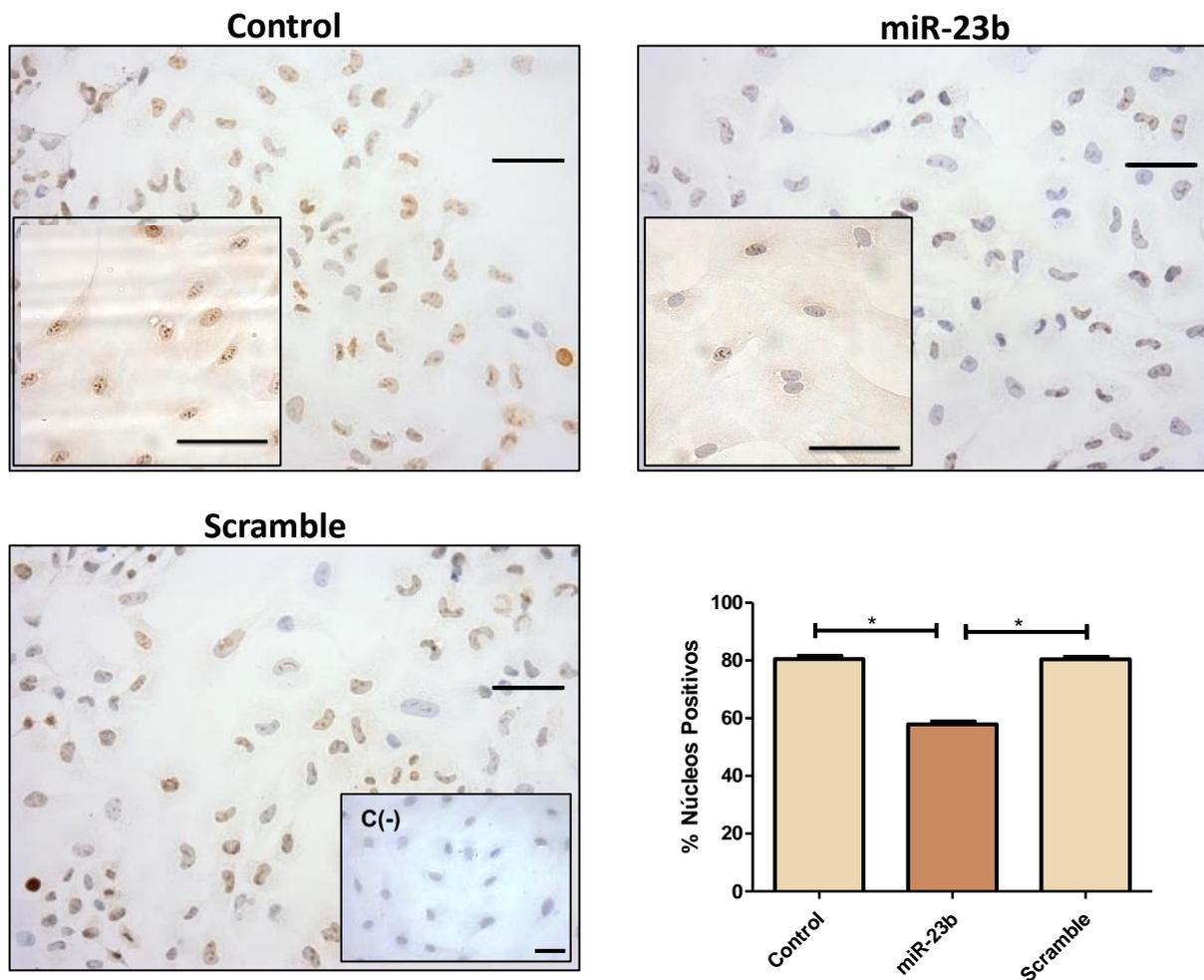


Figura 3. Inmunocitoquímica de Ki-67 en células HOSE. Microfotografías representativas de la inmunodetección de Ki-67 en la línea celular HOSE. Los paneles representan los distintos estímulos. Las barras corresponden a 50µm. El gráfico corresponde a la semicuantificación del número de células positivas para Ki-67. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=4 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de *p<0.05

En la figura 4 observamos el porcentaje de actividad metabólica de ambas líneas celulares, el cual está relacionado con el porcentaje de proliferación celular. Se puede observar que al sobreexpresar el miR-23b hay una disminución en la proliferación celular en ambas líneas celulares, pero al observar el efecto que produce el control scramble en la línea HOSE, no podemos descartar que la disminución sea en parte por el hecho de agregar un RNA de manera exógena. La disminución fue de un 24% en A2780 y de un 25% en HOSE en relación con el control.

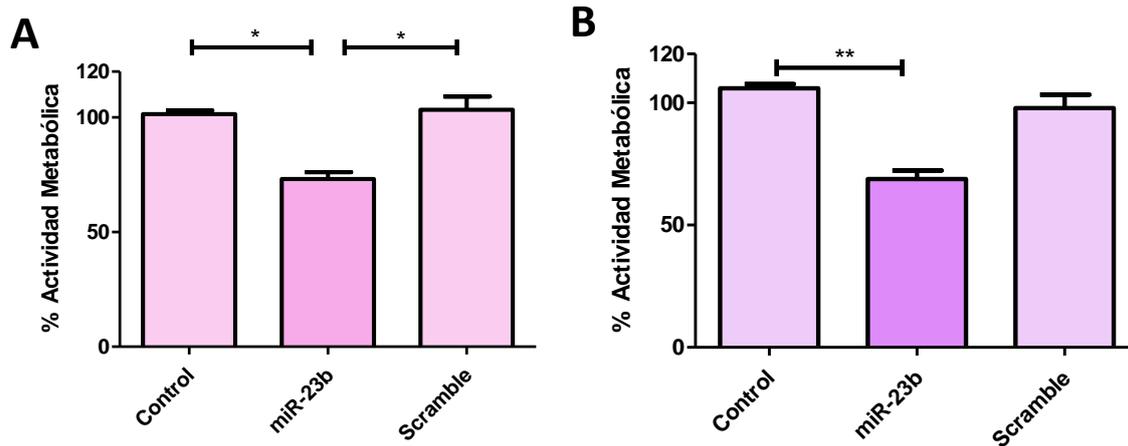


Figura 4. Porcentaje de células metabólicamente activas (A2780 y HOSE). A: A2780, B: HOSE. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=4 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$

Para evaluar el efecto del miR-23b sobre la proliferación y la migración se usaron insertos comerciales transwell con un poro de 8 μm , el cual es menor al diámetro de las células A2780, que ronda los 12 μm . El inserto utilizado para el ensayo de migración fue recubierto por fibronectina en la superficie exterior, para lograr la adhesión de las células que migraron. Mientras que para el inserto usado para la invasión, tiene una capa de matrigel en la parte interior que las células tienen que degradar para lograr realizar el proceso de invasión.

En la figura 5 observamos el efecto que tiene el sobreexpresar el miR-23b sobre la migración, en donde hay una disminución significativa en el número de células que logro migrar luego de este tratamiento al compararlas con los controles.

En la figura 6 observamos el efecto que tiene en la invasión el sobreexpresar el miR-23b, en donde hay una disminución significativa en el número de células que logro invadir luego de este tratamiento al compararlas con los controles. En donde la reducción de células que lograron invadir se reduce en más de un 50% en las células transfectadas con el miR-23b en relación con ambos grupos controles.

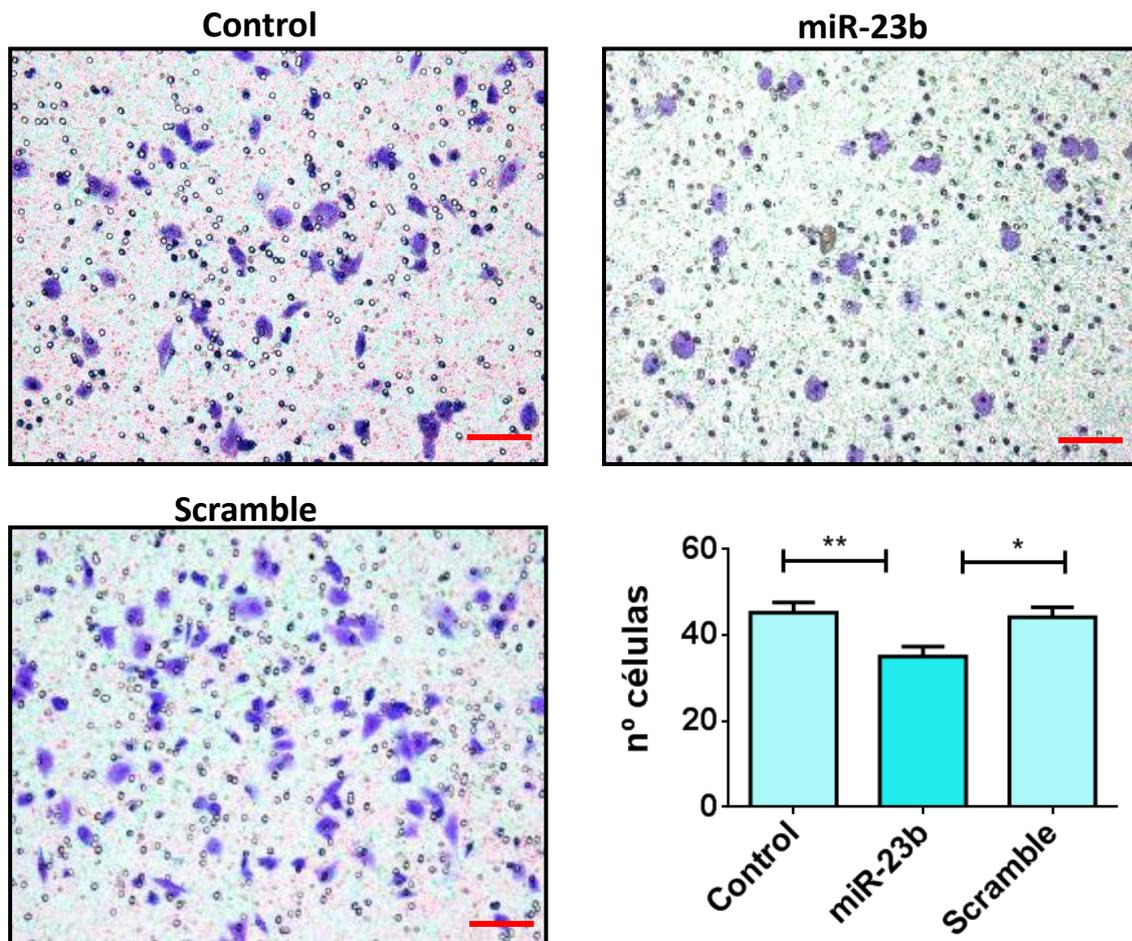


Figura 5. Migración de células A2780. Microfotografías representativas de la migración de células A2780. Los paneles representan los distintos estímulos. Las barras corresponden a 50 μ m. El grafico corresponde al número de células que migró. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=3). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de ** p<0.01 y *p<0.05.

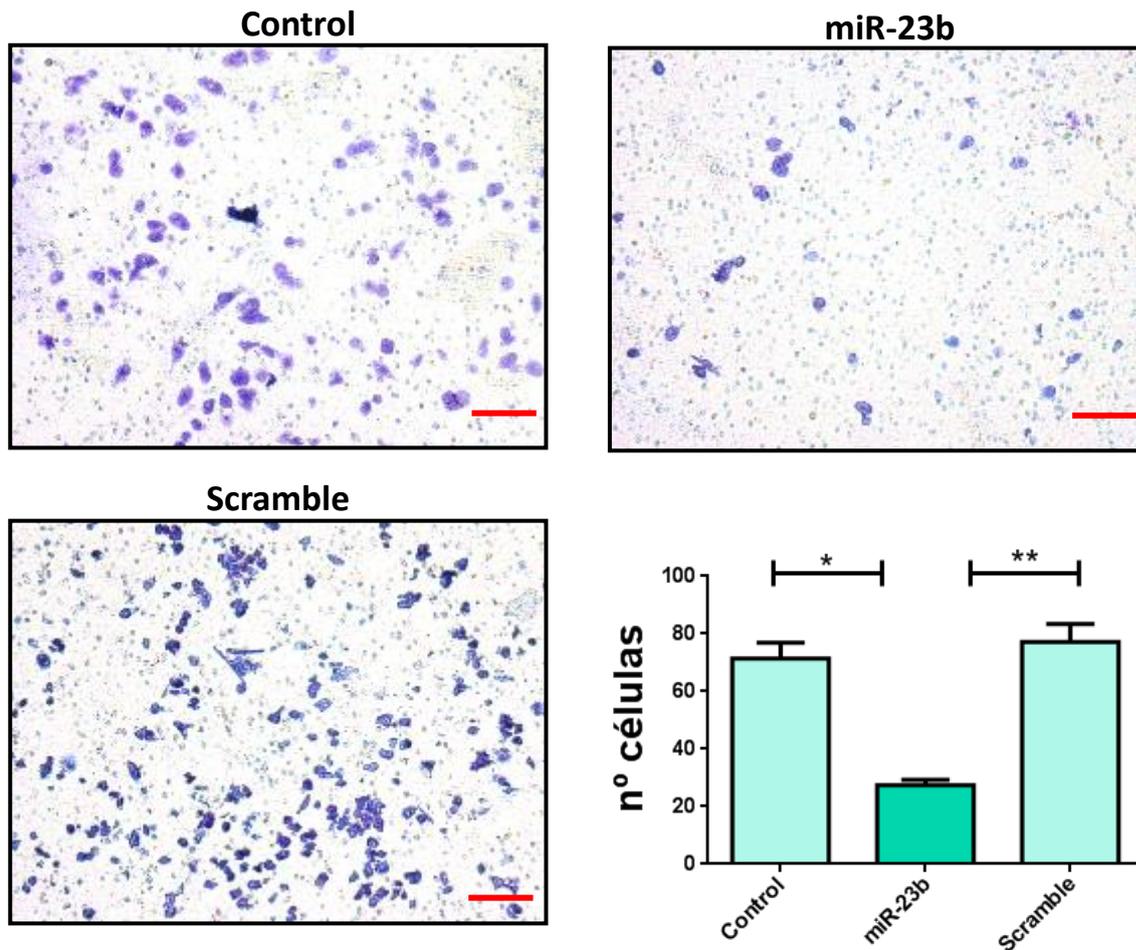


Figura 6. Invasión de células A2780. Microfotografías representativas de la invasión de células A2780. Los paneles representan los distintos estímulos. Las barras corresponden a 50µm. El gráfico corresponde al número de células que invadió. Las barras corresponden al promedio ± error estándar medio (n=3). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de ** $p < 0.01$ y * $p < 0.05$.

Los resultados de este objetivo nos dan cuenta de una disminución de los procesos de proliferación, migración e invasión al aumentar los niveles del miR-23b, los mecanismos por los que ocurren estos cambios no se conocen.

IV. 2. Objetivo Específico 2

Determinar los niveles de mRNA de c-Myc y VEGF en la línea celular de cáncer ovárico epitelial al sobreexpresar el miR-23b.

Para realizar la determinación de los mRNAs, se lisaron las células estimuladas con trizol, para obtener el RNA total, una vez obtenido el RNA, este fue mantenido en hielo para evitar su degradación, luego se realiza la retrotranscripción para obtener el cDNA que se amplificará por PCR.

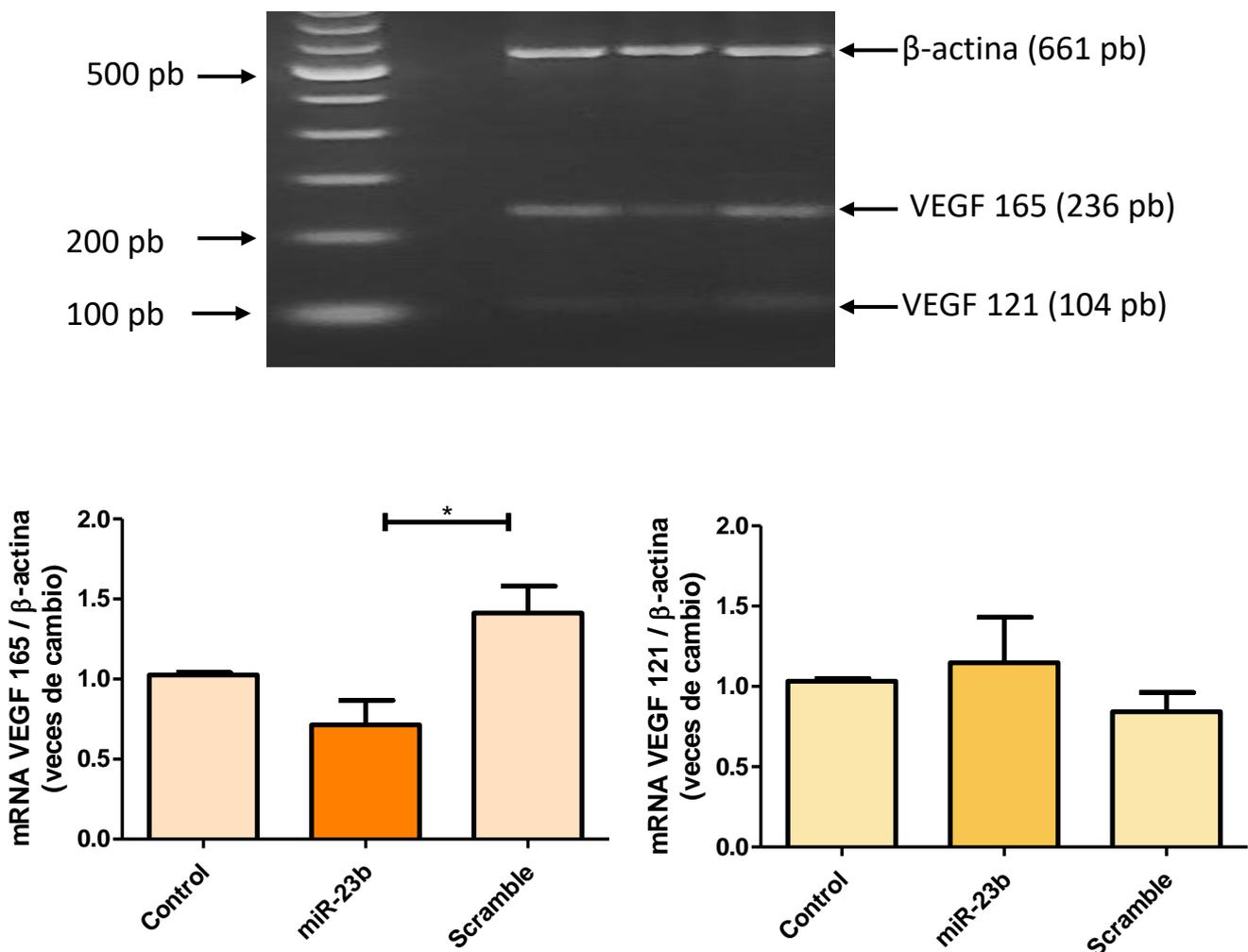


Figura 7. mRNA de VEGF en células A2780. PCR convencional de VEGF. Gel representativo de la amplificación de VEGF en las células A2780. Se graficaron y semicuantificaron las isoformas de VEGF 165 y 121. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=4 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de * $p < 0.05$.

En la figura 7 observamos el gel del mRNA de VEGF, como gen constitutivo se utilizó β -actina. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2% para visualizar los cambios. Se realizó un análisis densitométrico de las bandas para semicuantificar el cambio. En el gel se observan tres bandas claramente, La de mayor peso es la β -actina, luego las isoformas 165 y 121 de VEGF. El cambio observado en los niveles del mRNA de VEGF se da solo para la isoforma 165, comparada con el grupo scramble.

En la figura 8 observamos los niveles del mRNA de c-Myc, el gen constitutivo utilizado para normalizar los valores fue GAPDH. No hubo cambios en los niveles del mRNA de c-Myc al aumentar los niveles del miR-23b de manera exógena.

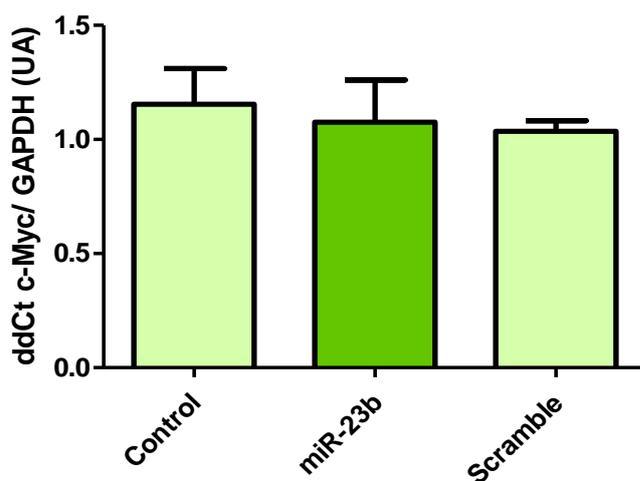


Figura 8. mRNA de c-Myc en células A2780. RT-PCR de c-Myc en células A2780. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=3 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn.

IV. 3. Objetivo Específico 3

Estudiar los niveles proteicos de c-Myc y VEGF en las líneas celulares de epitelio ovárico al sobreexpresar el miR-23b.

Los niveles proteicos de c-Myc fueron evaluados por ICQ y WB, figura 9 y 11A en las células A2780. En la ICQ se observa una disminución de un 35% en la expresión de c-Myc, Además se aprecia que la marca para c-Myc se encuentra casi exclusivamente en el núcleo. Mientras que para el WB la disminución de c-Myc al sobreexpresar el miR-23b es de aproximadamente un 20%.

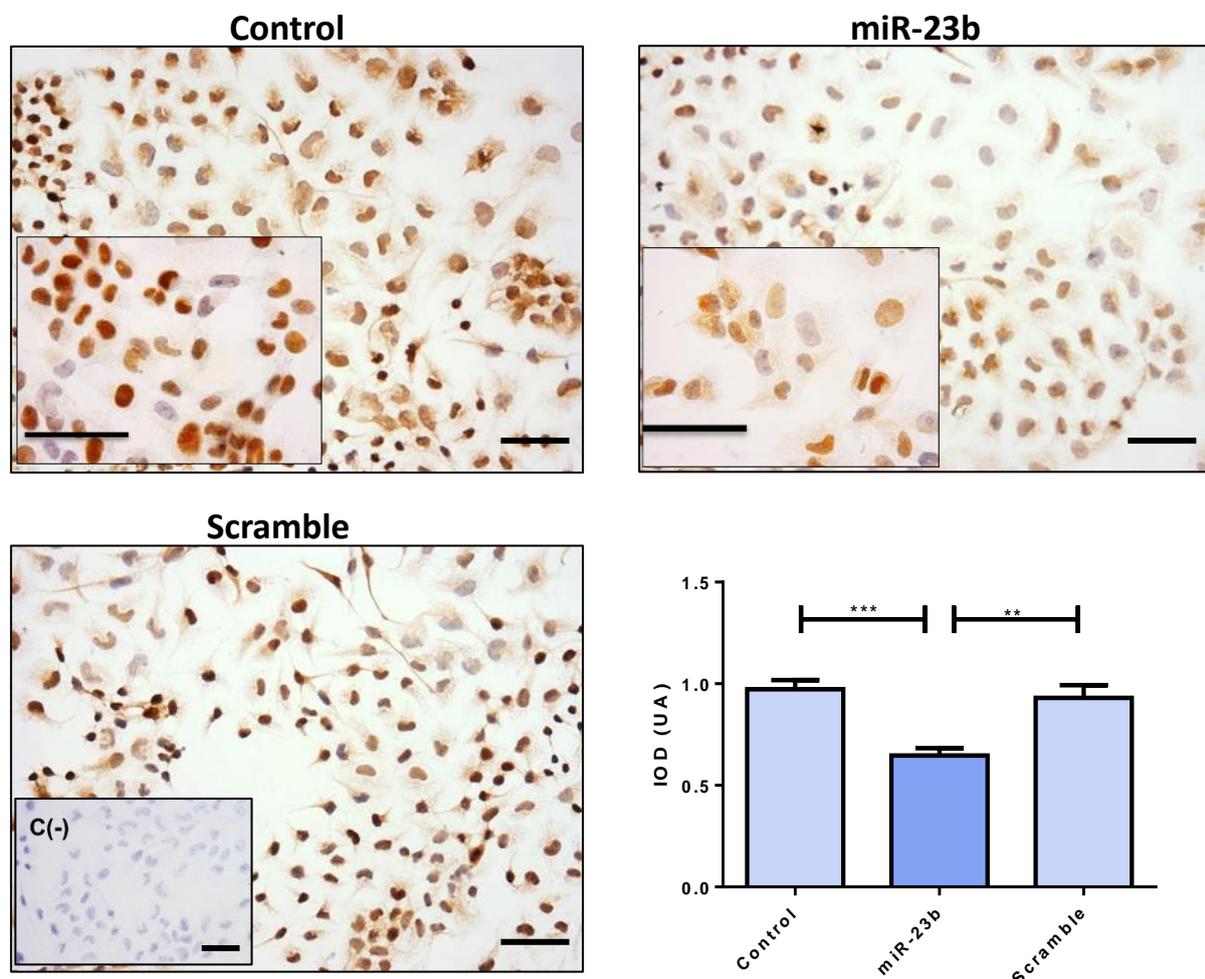


Figura 9. Inmunocitoquímica de c-Myc en células A2780. Microfotografías representativas de la inmunodetección de c-Myc en la línea celular A2780. Los paneles representan los distintos estímulos. Las barras corresponden a 50µm. El grafico corresponde a la semicuantificación de la densidad óptica. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=4 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

En la línea celular HOSE, figura 10 y 11B, en la ICQ advertimos una disminución de un 40% en los niveles de c-Myc al sobreexpresar el miR-23b, pero es importante destacar que la disminución en esta línea celular se debe mayormente a la disminución de la marca a nivel citoplasmático, como se puede observar en la figura 10.

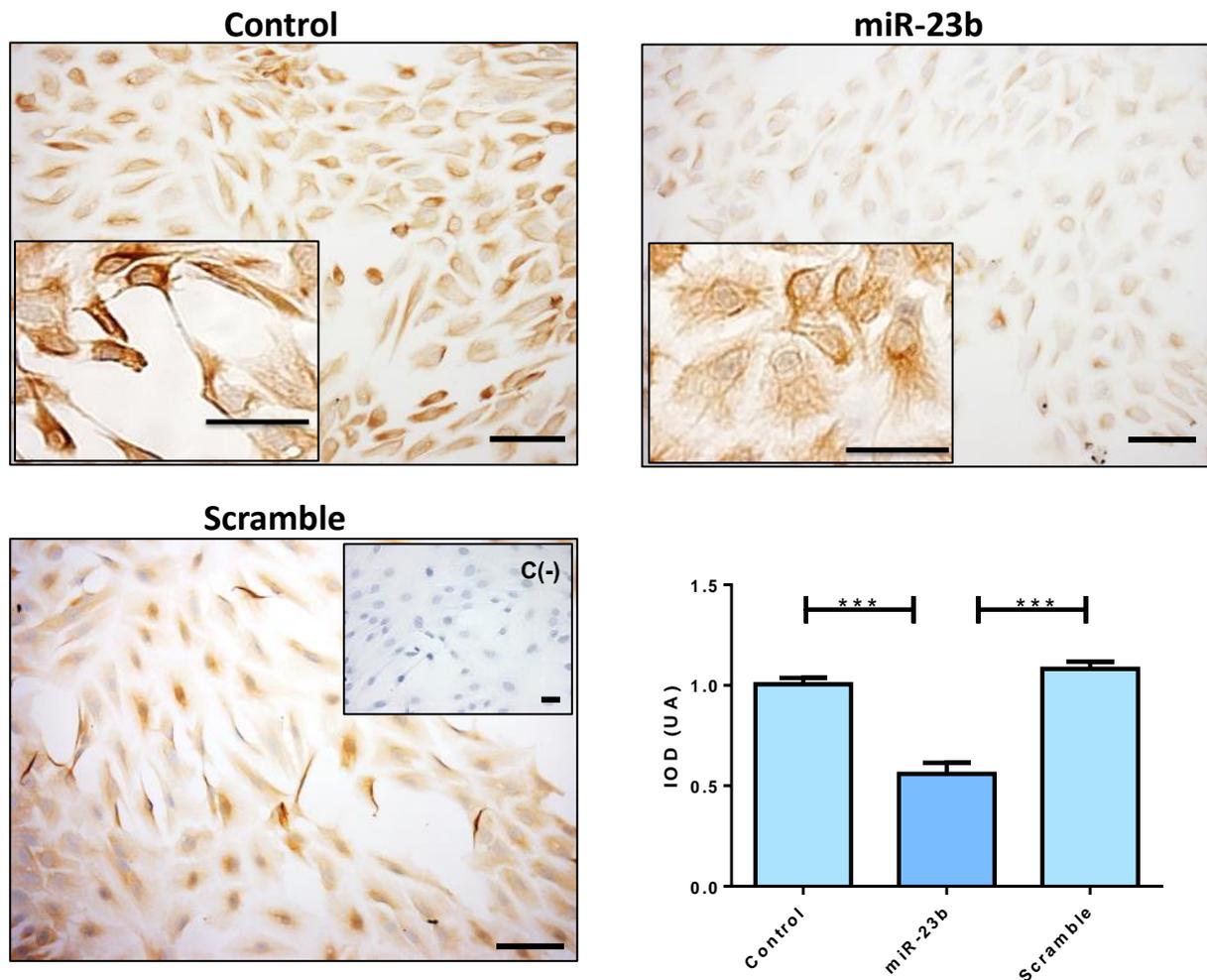


Figura 10. Inmunocitoquímica de c-Myc en células HOSE. Microfotografías representativas de la inmunodetección de c-Myc en la línea celular HOSE. Los paneles representan los distintos estímulos. Las barras corresponden a 50 μ m. El grafico corresponde a la semicuantificación de la densidad óptica. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=4 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de *** p<0.001.

En el western blot realizado para c-Myc, figura 11B, no se observan cambios significativos entre los estímulos, pero el grupo scramble tiene una dispersión un poco mayor a la de los otros grupos. El gen constitutivo utilizado para normalizar los valores fue β -actina.

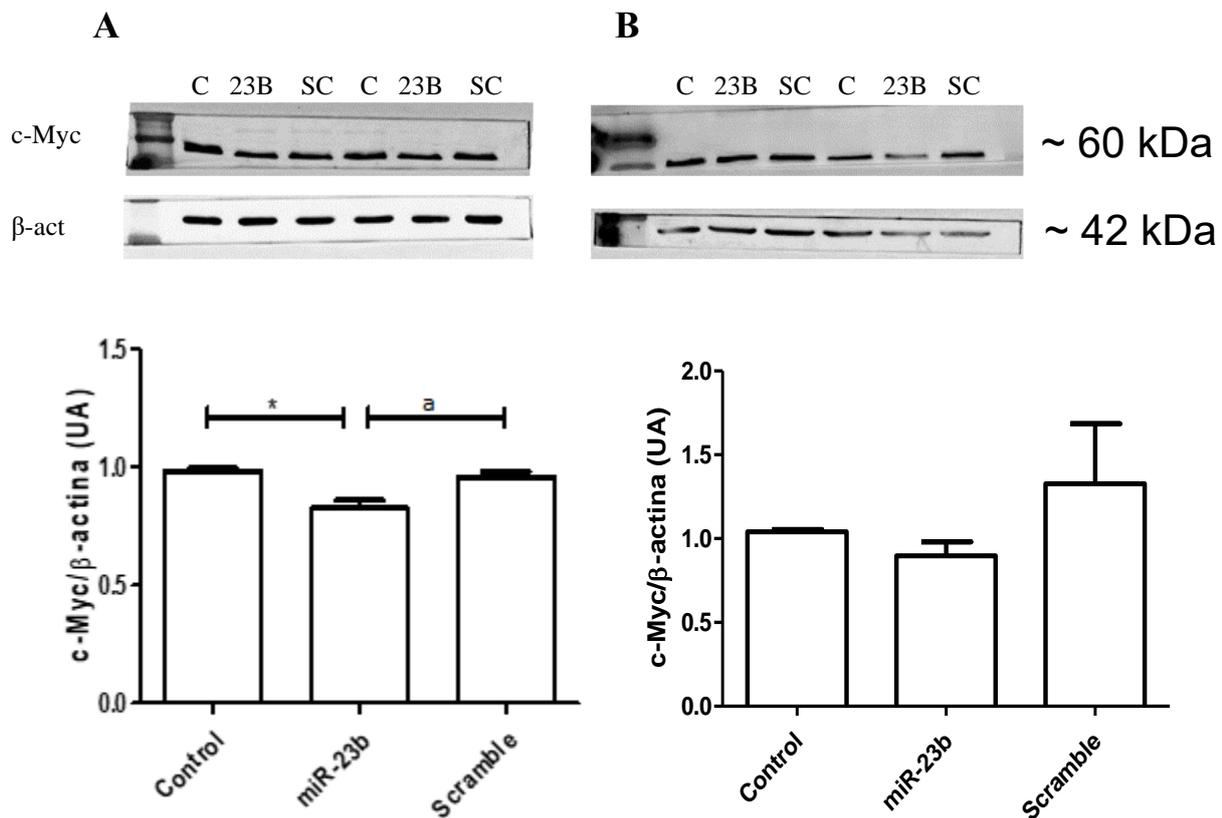


Figura 11. Western Blot de c-Myc en células A2780 y HOSE. A: Células A2780, B: Células HOSE. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (A2780: n=4; HOSE: n=3). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de * $p < 0.05$. Se analizó por separado miR-23b y Scramble en A2780, obteniéndose con un test de Mann Whitney una significancia de a $p < 0.05$.

Por lo tanto, los niveles de c-Myc disminuirían por causa de miR-23b en ambas líneas celulares, esto complementado con los resultados de la figura 8 de los niveles del mRNA de c-Myc nos indican que no hay una degradación del mRNA, pero quizás una represión traduccional del mRNA.

Finalmente, en la figura 12 se observan los niveles de VEGF liberados al medio de cultivo, en donde se observa que los niveles de VEGF solo se ven disminuidos en la línea A2780 con respecto al grupo control. La disminución observada en las A2780 es de un 35% en relación con el control, al analizar los datos, no se encontró una diferencia significativa entre el grupo miR-23b y el control scramble.

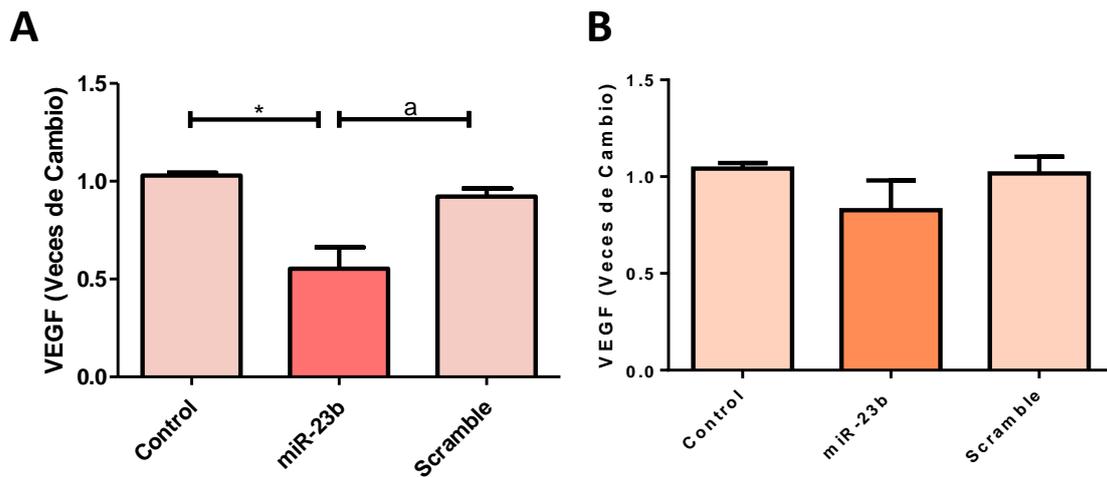


Figura 12. Niveles de VEGF liberado al medio de cultivo por células A2780 y HOSE. A: Células A2780, B: Células HOSE Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=3 en duplicado). Los datos fueron analizados con un test de Kruskal Wallis y un post test de Dunn con una significancia de * $p < 0.05$. Se analizó por separado miR-23b y Scramble en A2780, obteniéndose con un test de Mann Whitney una significancia de a $p < 0.05$.

V. DISCUSIÓN

El cáncer ovárico epitelial se caracteriza por su alta tasa de mortalidad, esto es explicado por el hecho de no presentar sintomatología específica, la falta de un buen método de screening en etapas iniciales y la ineficacia de las terapias (Torre et al., 2015). A lo anterior se suma la ausencia de marcadores tempranos (Sölétormos et al., 2016) y la falta de un entendimiento más completo de los mecanismos de génesis y desarrollo de esta patología, lo que hace necesario un mayor estudio de este cáncer buscando nuevas formas de diagnosticarlo tempranamente y mejorar las terapias, o bien lograr nuevas y mejores terapias. Nuestro grupo ha descrito el aumento del factor de crecimiento nervioso (NGF), su receptor de alta afinidad TRKA, así como también las proteínas VEGF y c-Myc en cáncer ovárico epitelial (Vera et al., 2014). A su vez, se encontró que el aumento de NGF, provoca un aumento en los niveles de VEGF y c-Myc en explantes de ovario (Urzua et al., 2012). Este aumento de NGF también produce un aumento en la proliferación, migración, invasión y en la angiogénesis, tanto de manera directa como indirecta (Vera et al., 2014).

Por otro lado, nuestro grupo también ha descrito la disminución del miR-145 y del miR-23b tanto en tejidos de cáncer ovárico epitelial como en líneas celulares de COE. Además, encontramos que al estimular las líneas celulares HOSE y A2780 con NGF era capaz de causar una disminución en los niveles del miR-23b. (Retamales et al., 2017).

Los miRs son RNAs pequeños, de una hebra de entre 18 y 25 nucleótidos, los cuales tienen un rol importante en la regulación post transcripcional. En donde su función es reprimir la traducción de los mRNA a través de la complementariedad de los nucleótidos (Kinose et al., 2014). Se ha descrito que los miRs están desregulados en diferentes patologías, entre ellas el cáncer. Es por esto que los miRs podrían tener un rol tanto en la detección temprana como

en un posible tratamiento (Kim et al., 2019; Banno et al., 2014). Actualmente se pueden detectar miRs en distintos tejidos y fluidos biológicos y se está planteando su uso como biomarcadores, mejorando la sensibilidad y especificidad de marcadores tumorales al realizar la determinación en conjunto como un panel de exámenes (Vychytilova-Faltejskova et al., 2016).

En los últimos años han surgido publicaciones describiendo la disminución del miR-23b en distintos cánceres, como lo son el cáncer de próstata (Majid et al., 2012), cáncer cérvico uterino (Campos-Viguri et al., 2015) y cáncer colorectal (Zhang et al., 2011), entre varios otros. Por lo que, podemos argumentar que miR-23b tiene mayormente un rol como miR supresor de tumores, a pesar de que se han descrito casos en los que actúa como un oncomiR (Grossi et al., 2018).

En el caso del cáncer ovárico epitelial se ha descrito que miR-23b se encuentra disminuido y que sus niveles pueden ser predictores de la supervivencia de las pacientes, ya que las pacientes que tenían niveles más altos de este miR poseían una mayor supervivencia después de la cirugía (Li et al., 2014).

El modelo de estudio de nuestro laboratorio y el utilizado en esta tesis consta de la línea celular HOSE (epitelio de la superficie ovárica no tumoral) y la línea celular A2780 (cáncer ovárico epitelial), ambas líneas celulares se han mostrado como un buen modelo de estudio ya que los estudios realizados muestran que las respuestas obtenidas son comparables a lo que sucede en tejidos.

Además, cabe destacar que la línea celular A2780 tienen una tasa de proliferación y migración mayor y que presenta valores menores del miR-23b en comparación con la línea celular HOSE (Tesis para optar al título de Bioquímica de Andrea Hernández).

Habiendo encontrado un aumento de c-Myc y VEGF y la disminución del miR-23b por efecto de NGF, nos planteamos la posibilidad de encontrar una relación

entre estos cambios y, por lo tanto, si la disminución del miR-23b podría dar cuenta en parte del aumento de c-Myc y VEGF.

Esto es lo que nos llevó a sobreexpresar el miR-23b y buscar su efecto sobre los procesos de proliferación, migración e invasión. Y adicionalmente, buscar algún blanco que pudiera estar siendo disminuido por la acción del miR-23b en estos procesos. Para tal efecto las células de epitelio ovárico tumorales y no tumorales fueron transfectadas por 48 h con una concentración final de 30 nM de miR-23b.

Los resultados obtenidos en términos de proliferación nos dan cuenta de una disminución significativa de esta al sobreexpresar el miR-23b, tanto en la línea celular A2780, como la línea celular HOSE. Efecto encontrado por ensayos de MTS e ICQ de Ki-67, ambos asociados a proliferación y que en conjunto se complementan para darnos información del estado de la proliferación celular.

El resultado esperado para este objetivo era que la sobreexpresión del miR-23b solo afectara a la línea celular tumoral y no tuviera efectos significativos en la proliferación de las células no tumorales; por lo tanto, en el futuro sería necesario evaluar la proliferación con una menor concentración del miR-23b en la transfección.

En cuanto a los ensayos de migración e invasión, solo fueron realizados en la línea celular A2780 ya que la línea celular HOSE al ser no tumoral no debería presentar niveles importantes de migración e invasión en los tiempos en los que se realizaron los ensayos. Al sobreexpresar el miR-23b se observa una disminución significativa del número de células que migran en relación con la condición control, disminuyendo aproximadamente un 30%.

Además, la sobreexpresión del miR-23b logra disminuir de manera importante la invasión celular, en donde la disminución es casi de un 60%. Es posible que este cambio este relacionado con la transformación epitelio-mesénquima ya que

se ha observado que miR-23b puede disminuir los niveles de Zeb1 y aumentar los niveles de E-cadherina (Majid et al., 2013; Ishteiwy et al., 2012).

En cuanto a los resultados de la sobreexpresión del miR-23b sobre los niveles de c-Myc observamos que no hay un cambio significativo en los niveles del mRNA por efecto de la sobreexpresión del miR-23b, pero se encontró una disminución a nivel proteico, en ambas líneas celulares, teniendo en cuenta que la disminución observada en las células HOSE podría ser más bien a nivel citoplasmático que nuclear, por lo que esta disminución en las células HOSE podría no ser funcional, ya que para que c-Myc tenga su función como factor transcripcional, éste debería estar en el núcleo.

Los resultados encontrados de c-Myc, sugieren que el miR-23b no está degradando el mRNA, pero sí estaría ocurriendo una represión traduccional, lo que impide la traducción del mRNA a proteína. Por otro lado, también es importante recordar que el miR-23b y c-Myc estarían formando un loop regulatorio (Fulciniti et al., 2016). Además, se describió que c-Myc tendría sitios de unión en la región promotora del miR-23b (Gao et al., 2009). Por lo que sería interesante evaluar a futuro la sobreexpresión de c-Myc sobre los niveles de miR-23b.

Otro aspecto interesante de analizar es que la proliferación también se ve disminuida en ambas líneas celulares, al igual que c-Myc, por lo que nos podemos plantear que c-Myc estaría jugando un rol importante en la disminución de la proliferación.

Por otro lado, el efecto de la sobreexpresión del miR-23b en las células A2780 sobre VEGF se puede evidenciar en la disminución de la isoforma VEGF-165 del mRNA, como en los niveles de VEGF liberados al medio de cultivo. Comúnmente, VEGF tiene tres isoformas, VEGF-189, VEGF-165 y VEGF-121, siendo estas dos últimas secretadas al medio de cultivo, siendo VEGF-165 su isoforma

mayoritaria (Ferrara 2004). Al encontrar disminuida la isoforma VEGF-165 que es la isoforma mayoritaria, nos indicaría que miR-23b estaría degradando el mRNA de esta isoforma y por esto evidenciamos un cambio a nivel proteico. Interesantemente la sobreexpresión del miR-23b no evidencia un efecto en los niveles de VEGF en la línea celular no tumoral.

En relación con la concentración de miR-23b utilizada, sería conveniente evaluar una menor concentración y determinar si al tener una menor concentración, no hay efecto en la línea celular no tumoral.

Por lo tanto, al sobreexpresar el miR-23b en la línea celular A2780 encontramos cambios en la proliferación, migración e invasión; además de cambios en c-Myc, solo a nivel proteico y cambios en VEGF tanto en el mRNA como en los niveles proteicos liberados al medio.

El o los mecanismos involucrados en los cambios vistos durante esta tesis no están claros, pero sería interesante estudiarlos a futuro para tener un mejor entendimiento del efecto de miR-23b.

Finalmente, es importante seguir estudiando el rol del miR-23b tanto en el inicio como en la progresión y metástasis del cáncer ovárico epitelial, ya que hay antecedentes que este miR tiene relación con la transición epitelio mesénquima. Además, sería interesante evaluar la posibilidad de medir el miR-23b en sueros de las pacientes y crear un panel de miRs para aumentar la detección temprana de este cáncer, lo cual es muy importante, debido a que la alta tasa de mortalidad está dada por la detección tardía.

VI. CONCLUSIONES

Al sobreexpresar el miR-23b en la línea celulares de cáncer ovárico epitelial A2780, se encontró una disminución en la proliferación, migración e invasión por efecto del aumento en los niveles de este miR.

Por otro lado, al evaluar las proteínas de interés, c-Myc y VEGF por efecto de la sobreexpresión del miR-23b, se encontró que sólo los niveles proteicos de c-Myc disminuyen, mientras que los niveles del mRNA no varían. Estos resultados sugieren que el miR-23b estaría impidiendo la traducción del mRNA de c-Myc, pero no su degradación. Adicionalmente, la sobreexpresión del miR-23b produce una disminución tanto en sus niveles proteicos, como del mRNA en su isoforma principal VEGF 165.

Todo lo anterior, nos lleva a sugerir que el miR-23b tiene efectos supresores de tumores en cáncer ovárico epitelial.

VI. PROYECCIONES

En este trabajo se encontró que el efecto de la sobreexpresión del miR-23b produce una disminución en la proliferación, migración e invasión, así como también una disminución de dos proteínas de importancia para nuestro modelo, como lo son c-Myc y VEGF en la línea celular de cáncer ovárico epitelias A2780. Esto nos lleva a nuevas preguntas acerca del miR-23b, como lo es descubrir si la disminución del miR-23b lleva al aumento de NGF o si el aumento de NGF es lo que provoca la disminución de este miR, como ya sabemos que esto último sí ocurre. Por lo tanto, si se encuentra que la disminución del miR-23b produce un aumento de NGF, significaría que existe un loop entre estas dos proteínas, siendo semejante a lo descrito para c-Myc y miR-23b. Para evaluar esto se requeriría usar líneas celulares de epitelio ovárico no tumorales, donde el miR-23b este en concentraciones normales y las concentraciones de NGF son menores que en COE, transfectando un antagomiR de miR-23b.

Adicionalmente, sería interesante evaluar la vasculogénesis luego de la transfección con el miR-23b, para poder asociarlo con los niveles de VEGF obtenidos.

Importantemente, se hace necesario un estudio in vivo del efecto del aumento miR-23b y como entregar eficientemente este miR a células cancerosas, planteándose como una opción a futuro para complementar las terapias ya existentes.

Finalmente, se plantea la interrogante de si este miR, pudiera servir como biomarcador en suero, tanto para el diagnóstico temprano esta patología como de seguimiento de la terapia.

VII. REFERENCIAS

- Amodio, N., Bandi, R., Prabhala, R. H., Adamia, S., Calimeri, T., Biamonte, L., Nikhil, M. C. (2013). Mir-23b Plays a Critical Role As a Tumor Suppressor miRNA In Multiple Myeloma. *Blood*, 122(21). Retrieved from <http://www.bloodjournal.org/content/122/21/122.short>
- Bast, R. C., Hennessy, B., Mills, G. B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews. Cancer*, 9(6), 415–428. <https://doi.org/10.1038/nrc2644>
- Banno, K., Iida, M., Yanokura, M., Kisu, I., Iwata, T., Tominaga, E., & Aoki, D. (2014). MicroRNA in cervical cancer: OncomiRs and tumor suppressor miRs in diagnosis and treatment. *The Scientific World Journal*, 2014.
- Campos-Viguri, G. E., Jiménez-Wences, H., Peralta-Zaragoza, O., Torres-Altamirano, G., Soto-Flores, D. G., Hernández-Sotelo, D., ... Fernández-Tilapa, G. (2015). miR-23b as a potential tumor suppressor and its regulation by DNA methylation in cervical cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 10, 42. <https://doi.org/10.1186/s13027-015-0037-6>
- Campos, X., Muñoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., Lara, H., Romero, C. (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 104(1), 168–175. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2006.07.007>
- Chen, Q., Zhang, F., Wang, Y., Liu, Z., Sun, A., Zen, K., Zhang, Q. (2015). The Transcription Factor C-Myc Suppresses MiR-23b and MiR-27b Transcription during Fetal Distress and Increases the Sensitivity of Neurons to Hypoxia-Induced Apoptosis. *PLOS ONE*, 10(3), e0120217. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120217>
- Chen, V. W., Ruiz, B., Killeen, J. L., Cot, T. R., Wu, X. C., Correa, C. N., & Howe, H. L. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, 97(S10), 2631–2642. <https://doi.org/10.1002/cncr.11345>
- Chou, C.-H., Shrestha, S., Yang, C.-D., Chang, N.-W., Lin, Y.-L., Liao, K.-W., Huang, H.-D. (2018). miRTarBase update 2018: a resource for experimentally validated microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D296–D302. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1067>
- Christopher, A. F., Kaur, R. P., Kaur, G., Kaur, A., Gupta, V., & Bansal, P. (2016). MicroRNA therapeutics: Discovering novel targets and developing specific therapy. *Perspectives in Clinical Research*, 7(2), 68–74. <https://doi.org/10.4103/2229-3485.179431>
- Cuello F, M. (2013). GES en cáncer de ovario epitelial: un avance sanitario necesario pero no exento de riesgos y dificultades futuras. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*, 78(3), 161–166. <https://doi.org/10.4067/S0717-75262013000300001>
- Enokida, H. (2018). microRNA Analysis in Prostate Cancer. In *Hormone Therapy and Castration Resistance of Prostate Cancer* (pp. 267–291). Singapore: Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-7013-6_28
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 6(4), 259–269. <https://doi.org/10.1038/nrc1840>
- Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocrine reviews*, 25(4), 581-611.
- Fleming, J. S., Beaugié, C. R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G., & Tan, O. L. (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 247(1–2), 4–21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.09.014>

- Foessler, I., Kotzbeck, P., & Obermayer-Pietsch, B. (2019). miRNAs as novel biomarkers for bone related diseases. *J Lab Precis Med*, 4(2-2), 2-2.
- Fulciniti, M., Amodio, N., Bandi, R. L., Cagnetta, A., Samur, M. K., Acharya, C., Munshi, N. C. (2016). miR-23b/SP1/c-myc forms a feed-forward loop supporting multiple myeloma cell growth. *Blood Cancer Journal*, 6(1), e380. <https://doi.org/10.1038/bcj.2015.106>
- Gao, Ping, E. Al. (2009). c-Myc suppression of miR-23 enhances mitochondrial glutaminase and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762–765. <https://doi.org/10.1038/nature07823.c-Myc>
- Grossi, I., Salvi, A., Baiocchi, G., Portolani, N., & De Petro, G. (2018). Functional role of microRNA-23b-3p in cancer biology. *MicroRNA*, 7(3), 156-166.
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hennessy, B. T., Coleman, R. L., & Markman, M. (2009a). Ovarian cancer. *The Lancet*, 374(9698), 1371–1382. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61338-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61338-6)
- Hennessy, B. T., Coleman, R. L., & Markman, M. (2009b). Ovarian cancer. *The Lancet*, 374(9698), 1371–1382. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61338-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61338-6)
- Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*, 33(6), 1126–1133. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs140>
- Ishteiwy, R. A., Ward, T. M., Dykxhoorn, D. M., & Burnstein, K. L. (2012). The microRNA-23b/-27b cluster suppresses the metastatic phenotype of castration-resistant prostate cancer cells. *PloS one*, 7(12).
- Kim, S., Choi, M. C., Jeong, J. Y., Hwang, S., Jung, S. G., Joo, W. D., & An, H. J. (2019). Serum exosomal miRNA-145 and miRNA-200c as promising biomarkers for preoperative diagnosis of ovarian carcinomas. *Journal of Cancer*, 10(9), 1958.
- Kinose, Y., Sawada, K., Nakamura, K., & Kimura, T. (2014). The Role of MicroRNAs in Ovarian Cancer, 2014.
- Li, W., Liu, Z., Chen, L., Zhou, L., & Yao, Y. (2014). MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2. *FEBS Letters*, 588(9), 1608–1615. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.02.055>
- Majid, S., Dar, A. A., Saini, S., Arora, S., Shahryari, V., Zaman, M. S., Dahiya, R. (2012). miR-23b Represses Proto-oncogene Src Kinase and Functions as Methylation-Silenced Tumor Suppressor with Diagnostic and Prognostic Significance in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 72(24), 6435–6446. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-2181>
- Majid, S., Dar, A. A., Saini, S., Deng, G., Chang, I., Greene, K., & Yamamura, S. (2013). MicroRNA-23b functions as a tumor suppressor by regulating Zeb1 in bladder cancer. *PloS one*, 8(7).
- Meng, X., Joosse, S. A., Müller, V., Trillsch, F., Milde-Langosch, K., Mahner, S., & Schwarzenbach, H. (2015). Diagnostic and prognostic potential of serum miR-7, miR-16, miR-25, miR-93, miR-182, miR-376a and miR-429 in ovarian cancer patients. *British journal of cancer*, 113(9), 1358-1366.
- Mezzanzanica, D., Bagnoli, M., De Cecco, L., Valeri, B., & Canevari, S. (2010). Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(8), 1262–1272. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2009.12.017>
- MINSAL, Chile, M. D. S. (2013). Guía Clínica AUGÉ Cáncer de Ovario Epitelial. *Serie Guías Clínicas MINSAL*, 2–53.
- MINSAL, Chile (2017). Informe de Evaluación Científica Basada en la Evidencia Disponible. Cáncer de Ovario Epitelial. 1° edición 2017.
- Müller, M., Kuiperij, H. B., Claassen, J. A., Küsters, B., Verbeek, M. M., & Clerici, F.

- (2014). MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging*, 35(1), 152–158. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2013.07.005>
- Olena, A. F., & Patton, J. G. (2009). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, 222(3), n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/jcp.21993>
- Pal, M. K., Rashid, M., & Bisht, M. (2015). Multiplexed magnetic nanoparticle-antibody conjugates (MNPs-ABS) based prognostic detection of ovarian cancer biomarkers, CA-125, β -2M and ApoA1 using fluorescence spectroscopy with comparison of surface plasmon resonance (SPR) analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 73, 146–152.
- Piva, R., Spandidos, D. A., & Gambari, R. (2013). From microRNA functions to microRNA therapeutics : Novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment (Review), 985–994. <https://doi.org/10.3892/ijo.2013.2059>
- Retamales-Ortega, R., Oróstica, L., Vera, C., Cuevas, P., Hernández, A., Hurtado, I., Vega, M., Romero, C. (2017). Role of nerve growth factor (NGF) and miRNAs in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(3). <https://doi.org/10.3390/ijms18030507>
- Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(3), 203–222. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246>
- Sölétormos, G., Duffy, M. J., Hassan, S. O. A., Verheijen, R. H., Tholander, B., Bast, R. C., & Troonen, H. (2016). Clinical use of cancer biomarkers in epithelial ovarian cancer: updated guidelines from the European Group on Tumor Markers. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 26(1), 43-51.
- Tapia, V., Gabler, F., Muñoz, M., Yazigi, R., Paredes, A., Selman, A., Vega, M., Romero, C. (2011). Tyrosine kinase A receptor (trkA): A potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 121(1), 13–23. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2010.12.341>
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108. <https://doi.org/10.3322/caac.21262>
- Urzua, U., Tapia, V., Geraldo, M., Selman, A., Vega, M., & Romero, C. (2012). Nerve Growth Factor Stimulates Cellular Proliferation of Human Epithelial Ovarian Cancer. *Hormone and Metabolic Research*, 44(09), 656–661. <https://doi.org/10.1055/s-0032-1304617>
- Valladares, M., Plaza-Parrochia, F., Lépéz, M., Lópéz, D., Gabler, F., Selman, A., Vega, M., Romero, C. (2017). Effect of estradiol on the expression of angiogenic factors in epithelial ovarian cancer. *Histology and Histopathology*, 11874–11874. Retrieved from <https://www.hh.um.es/Articles-Proofs/11-874-manuscript.pdf>
- Van Gorp, T., Cadron, I., Despierre, E., Daemen, A., Leunen, K., Amant, F., Vergote, I. (2011). HE4 and CA125 as a diagnostic test in ovarian cancer: prospective validation of the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm. *British Journal of Cancer*, 104(5), 863–870. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6606092>
- Vera, C., Tapia, V., Vega, M., & Romero, C. (2014). Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *Journal of Ovarian Research*, 7, 82. <https://doi.org/10.1186/s13048-014-0082-6>
- Visone, R., & Croce, C. M. (2009). MiRNAs and Cancer. *The American Journal of Pathology*, 174(4), 1131–1138. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080794>
- Viswanathan, V., Fields, J., & Boman, B. M. (2014). The miRNA23b-regulated signaling network as a key to cancer development—implications for translational research and therapeutics. *Journal of Molecular Medicine*, 92(11), 1129–1138. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1208-4>

- Vychytilova-Faltejskova, P., Radova, L., Sachlova, M., Kosarova, Z., Slaba, K., Fabian, P., & Kiss, I. (2016). Serum-based microRNA signatures in early diagnosis and prognosis prediction of colon cancer. *Carcinogenesis*, *37*(10), 941-950.
- Wahner Hendrickson, A. E., Bakkum-Gamez, J. N., J. Couch, F., Ghosh, K., & Boughey, J. C. (2017). Management of Breast Cancer Risk in Women with Ovarian Cancer and Deleterious BRCA1 or BRCA2 Mutations. *Annals of Surgical Oncology*, 1-3. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5999-8>
- Wang, J., Chen, J., & Sen, S. (2016). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of Cellular Physiology*, *231*(1), 25-30. <https://doi.org/10.1002/jcp.25056>
- Wang, W., Wang, Y., Liu, W., & van Wijnen, A. J. (2018). Regulation and biological roles of the multifaceted miRNA-23b (MIR23B). *Gene*, *642*, 103-109. <https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.10.085>
- Xu, Q., Liu, L.-Z., Qian, X., Chen, Q., Jiang, Y., Li, D., Jiang, B.-H. (2012). MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis. *Nucleic Acids Research*, *40*(2), 761-774. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr730>
- Xu, Y.-Z., Xi, Q.-H., Ge, W.-L., & Zhang, X.-Q. (2013). Identification of Serum MicroRNA-21 as a Biomarker for Early Detection and Prognosis in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *14*(2), 1057-1060. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2013.14.2.1057>
- Yang, W.-L., Simmons, A., Lu, Z., Baggerly, K., Lu, K., Gentry-Maharaj, A., ... Bast, R. C. (2015). Abstract 2838: TP53 autoantibody can detect CA125 screen negative ovarian cancer cases and can be elevated prior to CA125 in preclinical ovarian cancer. *Cancer Research*, *75*(15 Supplement). Retrieved from http://cancerres.aacrjournals.org/content/75/15_Supplement/2838.short
- Zhang, H., Hao, Y., Yang, J., Zhou, Y., Li, J., Yin, S., Xi, J. J. (2011). Genome-wide functional screening of miR-23b as a pleiotropic modulator suppressing cancer metastasis. *Nature Communications*, *2*(1), 554. <https://doi.org/10.1038/ncomms1555>
- Zhang, W., Wang, Q., Yu, M., Wu, N., & Wang, H. (2014). MicroRNA-145 Function as a Cell Growth Repressor by Directly Targeting c-Myc in Human Ovarian Cancer. *Technology in Cancer Research & Treatment*, *13*(2), 161-168. <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500367>
- Zheng, H., Zhang, L., Zhao, Y., Yang, D., Song, F., Wen, Y., Chen, K. (2013). Plasma miRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers for Ovarian Cancer. *PLoS ONE*, *8*(11), e77853. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077853>

VIII. ANEXO

En la figura 13 se observa la evaluación inicial que se realizó para determinar la eficiencia de la transfección y la dosis a utilizar. Esto fue evaluado tanto visualizando la marca CY5 de la hebra 5' del miR utilizado, como analizando las veces de cambio en los niveles del miR-23b en las líneas celulares.

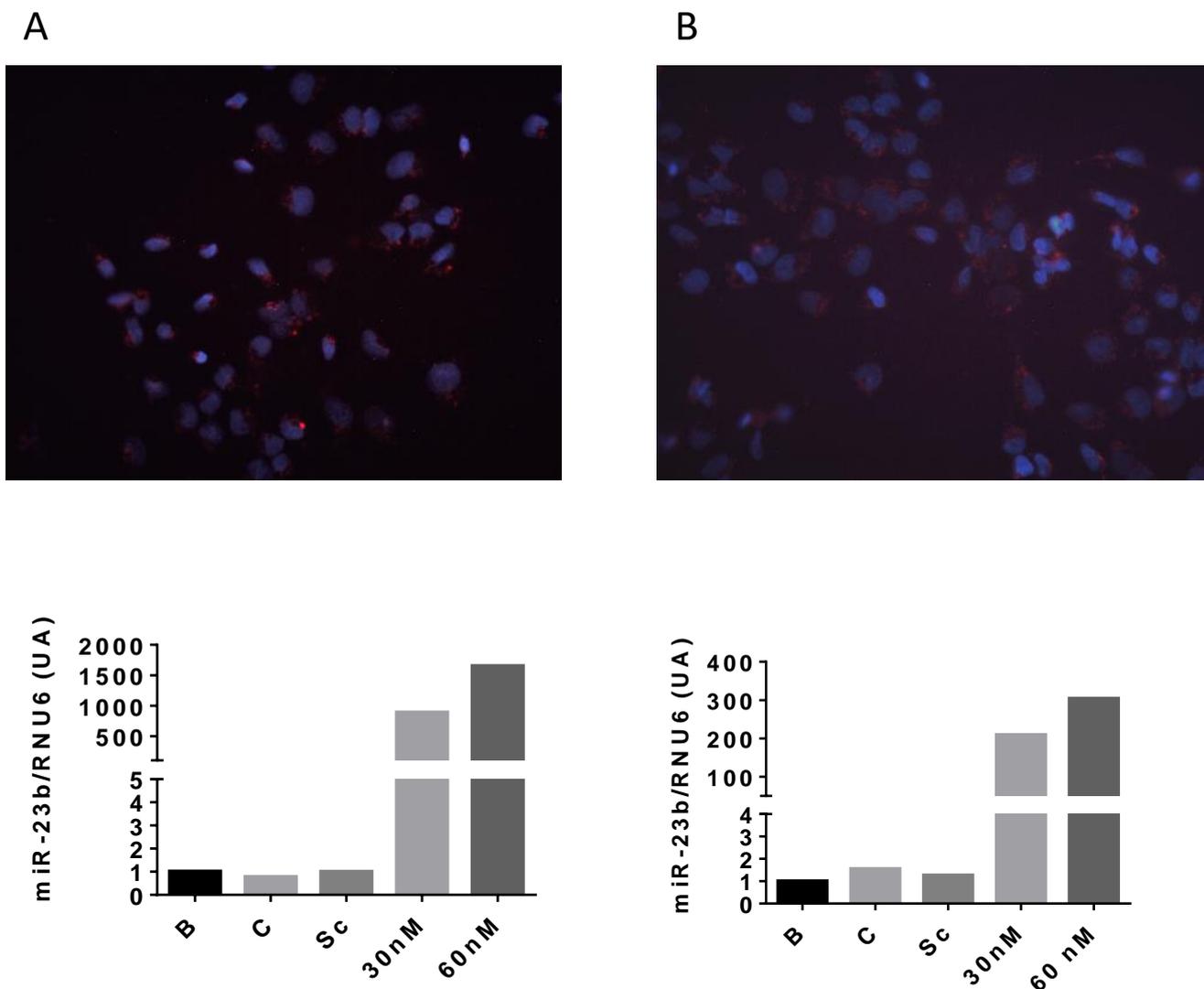


Figura 13. Evaluación de la sobreexpresión del miR-23b. Inmunofluorescencia de A. Células A2780, B. Células HOSE, en color rojo se observa la marca fluorescente del miR-23b y en azul los núcleos teñidos con DAPI. RT-PCR de miR-23b en líneas celulares. Las barras corresponden al promedio \pm error estándar medio (n=1 en duplicado).