

UCH-FC
Biotecnología
A 543
C.1



Universidad de Chile-Facultad de Ciencias-Escuela de pregrado



Los miRNAs de exosomas de cáncer de próstata modifican los fibroblastos y osteoblastos normales favoreciendo la progresión tumoral y la metástasis.

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular

Eliana Isabel Andahur Orellana

Directora de tesis: Catherine Sánchez Núñez

Co-Director: Enrique Castellón Vera.

Profesora Patrocinante: Verónica Palma Alvarado

Abril, 2016.

Santiago-Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por la Srta Eliana Isabel Andahur Orellana.

“Los miRNAs de exosomas de cáncer de próstata modifican los fibroblastos y osteoblastos normales favoreciendo la progresión tumoral y la metástasis”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniera en Biotecnología Molecular.

Directora Seminario de Título: Catherine Sánchez Núñez

Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión: _____

Evaluador: _____



Santiago de Chile, Sept. 15, 2016.

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a la vida, que me dio un momento de paz y armonía para poder terminar esta etapa de mi vida con tranquilidad.

Muy contenta de realizar mi seminario de título en el laboratorio de Oncología y genética molecular de Clínica Las Condes. He conocido gente muy linda y quiero agradecer especialmente a Cynthia Villarroel, gracias por ayudarme en todo lo que necesité, por las recomendaciones, los retos, por ser muy solidaria siempre con tus conocimientos y, por sobre todo, escucharme y aconsejarme. Valeria Zenteno, gracias por ser una gran amiga, por quererme, por reír conmigo, por ser la mejor compañera que pude encontrar, te quiero mucho y gracias por el lindo regalo que me diste, siempre voy a estar para acompañarte.

Gracias a mi tutora Catherine Sánchez por ser una excelente guía, me atrevería a decir que la mejor. Son muchas las cosas que tendría que agradecerte, pero creo que lo más importante es que me devolviste el amor por la biología celular. Encarnas todos los valores de lo que a mi parecer debe ser un gran investigador y persona: rigurosidad, disciplina, respeto, compañerismo, solidaridad, exigencia, tranquilidad, inteligencia, prolijidad, empatía, cercanía, dedicación y amor por lo que haces. Sé que el futuro se viene aún mejor para ti.

Gracias a mi familia hermosa que siempre está conmigo, a mis padres y a mi hermanita linda que es uno de los mejores regalos que me dio la vida. La que siempre me escucha, incluso cuando le hablo de ciencia, la que me dice que ropa combina y cual no, la que me ayuda siempre en todo, no alcanzaría papel para todo eso. Mis papás han sido muy buenos,

los amo, gracias por todo, he tratado de ser buena hija, trataré de darles lo mejor y que se sientan orgullosos de mí.

Gracias a mis células hFOB 1.19 y WPMY-1, creo que mi cariño y cuidados fueron bien retribuidos, crecieron lindas y no me dieron muchos problemas. No como las RWPE-1 que tuvieron que ser excluidas de este trabajo por conflictivas y amantes del micoplasma, pero el tiempo me ha hecho perdonarlas.

Ser científico es como jugar cuando eras niño, explorar cosas nuevas cada día y dejarse sorprender. Todos los niños tienen alma de científicos o ¿todos los científicos tienen alma de niños? No lo sé, pero espero que los científicos no se alejen de la pureza que tienen los niños al explorar. Tenemos que contribuir a un mundo mejor y no a su destrucción.

Los límites no existen en un universo infinito, hay que volar y decidir hasta dónde quieres llegar. Gracias a todos los que contribuyeron a la realización de este trabajo con una palabra, una sonrisa, un aliento, un abrazo o una acción como Giannina, Graciela y Dominique.

Gracias al Profesor Sergio Muñoz que, en el peor momento de mi vida hasta ahora, me apoyó y ayudó, como pocos profesores lo hacen. Gracias por su confianza y empatía, le estaré agradecida siempre.

Quiero concluir agradeciendo a toda la gente maravillosa que conocí por estudiar esta carrera. No pude estudiar en un lugar mejor, donde se mezclan todas las realidades sociales, donde están los mejores carretes y donde la gente es hermosa. A mis amigas biotec Andre y Cata, fueron las mejores compañeras de trabajo y grandes amigas. Una

mención especial a Francisco Corvalán, estando o no cerca, siempre siento tu apoyo y cariño incondicional, para mí siempre serás el mejor. A todos mis amigos de la u y de la vida, en especial a Cami, Pollo, César, JC, Dieguito, Beto, Nata, Andre. Los quiero mucho a todos muchas gracias por su apoyo.

Índice de contenidos

1. Introducción.....	1
Generalidades del CaP.....	1
1. Heterogeneidad tumoral.....	2
2. Progresión del cáncer: rol de las CSC.....	3
3. Exosomas: comunicadores intercelulares.....	4
4. miRNAs: biogénesis y acción en el cáncer.....	6
5. Estroma reactivo y transición epitelio mesénquima.....	7
6. Remodelación ósea y metástasis de CaP.....	10
7. NGS de miRNAs de exosomas de pacientes con CaP.....	12
8. Hipótesis, objetivo general y específicos.....	15
2. Materiales y métodos.....	17
1. Cultivos celulares.....	17
2. Transfección de miRNAs mimics con lipofectamina.....	18
3. Extracción de RNA y proteínas.....	19
4. RT-PCR.....	20
5. PCR cuantitativo.....	20
6. Western Blot.....	21
7. Ensayo de migración Transwell.....	22
8. Ensayo de migración cierre de herida.....	23
9. Estadística.....	24
3. Resultados.....	25
1. Evaluación de la eficiencia de la transfección de miRNAs mimics en células WPMY-1 y hFOB 1.19.....	25
2. Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en células WPMY-1 con respecto a la expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral.	
2.1 Efecto en la expresión de MMPs.....	28

2.2 Efecto en la expresión de RANKL y OPG.....	31
2.3 Efecto en la expresión de otras proteínas relacionadas con la progresión tumoral.....	33
3. Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en células hFOB 1.19 con respecto a la expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral.	
3.1 Efecto en la expresión de MMPs.....	38
3.2 Efecto en la expresión de RANKL y OPG.....	40
3.3 Efecto en la expresión de otras proteínas relacionadas con la progresión tumoral.....	42
4. Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en la migración de células WPMY-1 mediante cierre de herida.....	46
5. Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en la capacidad de migración de células WPMY-1 mediante Transwell.....	48
4. Discusión.....	51
5. Conclusiones.....	61
6. Bibliografía.....	62
7. Anexos.....	68

Índice de tablas

Tabla 1: Targets blanco de inhibición de cada miRNA, utilizados para la eficiencia de la transfección de los miRNAs mimics en las células WPMY-1 y hFOB 1.19.....25

Tabla suplementaria 1: Primers de los targets evaluados en PCR cuantitativo...68

Tabla suplementaria 2: Listado de anticuerpos primarios y diluciones de uso...68

Tabla suplementaria 3: Eficiencia de amplificación de los partidores de cada target evaluados en los tratamientos.....69

Índice de figuras

Figura 1: Eficiencia de la transfección en células WPMY-1 con relación a la expresión relativa de RNAm target.....	26
Figura 2: Eficiencia de la transfección en células hFOB 1.19 con relación a la expresión relativa de RNAm target.....	27
Figura 3: Efecto de la transfección de miRNA mimics en la expresión de RNAm de MMPs en células WPMY-1.....	29
Figura 4: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de proteínas MMPs en células WPMY-1.....	30
Figura 5: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de RNAm de RANKL y OPG en células WPMY-1.....	32
Figura 6: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de proteínas RANKL y OPG en células WPMY-1.....	33
Figura 7: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de RNAm de CatB, IL-8 y TGF-B1 en células WPMY-1.....	35
Figura 8: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de RNAm de AR, BMPR2 y CatL en células WPMY-1.....	36
Figura 9: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de proteínas IL-8, Col III y CatK en células WPMY-1.....	37
Figura 10: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de RNAm de MMPs en células hFOB 1.19.....	38
Figura 11: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de proteínas MMPs en células hFOB 1.19.....	39
Figura 12: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de RNAm de RANKL y OPG en células hFOB 1.19.....	41
Figura 13: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de proteínas RANKL y OPG en células hFOB 1.19.....	42
Figura 14: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de RNAm de Catepsinas y TGF-B1 en células hFOB 1.19.....	44
Figura 15: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de RNAm de AR, BMPR-2 e IL-8 en células hFOB 1.19.....	45
Figura 16: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la expresión de proteínas IL-8 y CatK en células hFOB 1.19.....	46

Figura 17: Efecto de la transfección de miRNA mimics en la invasividad de las células WPMY-1.....	48
Figura 18: Efecto de la transfección de miRNAs mimics en la capacidad de migración de las células WPMY-1.....	50

Listado de Abreviaturas

Concepto	Abreviatura
Receptor de andrógeno	AR
Receptor II de la proteína morfogenética ósea.	BMPR2
Fibroblastos activados asociados a cáncer	CaF
Cáncer de próstata	CAP
Cáncer stem cell	CSC
Catepsina B	CatB
Catepsina K	CatK
Catepsina L	CatL
Colágeno III	Col III
Deoxinucleótidos	DNTPS
Transición epitelio mesénquima	EMT
Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa	GAPDH
Interleuquina 8	IL-8
Metaloproteinasa de matriz 2	MMP-2
Metaloproteinasa de matriz 9	MMP-9
Metaloproteinasa de matriz 13	MMP-13
Secuenciación de próxima generación	NGS
Osteopogerina	OPG
Tampón salino fosfato	PBS
Antígeno de cáncer de próstata 3	PCA3
Ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa beta	RANKL
Suero fetal bovino	SFB
Tampón salino tris	TBS

Gen de fusión proteasa transmembrana serina 2 y ERG	TMPRSS2-ERG
Factor de crecimiento transformante beta 1	TGF- β 1

RESUMEN

Los exosomas liberados por las células tumorales epiteliales (Bulk) y las Células Cáncer Stem Cells (CSC), modifican el nicho tumoral y pre-metastásico. Anteriormente, se identificaron miRNAs expresados diferencialmente entre estas dos poblaciones en el cáncer de próstata (CaP), y por análisis bioinformático se describió su efecto sobre el microambiente tumoral. El objetivo fue validar funcionalmente el efecto de los miRNAs de estos exosomas en targets relacionados con la modificación del microambiente primario y pre-metastásico.

Las líneas celulares de osteoblastos humanos normales no diferenciados (hFOB1.19) y fibroblastos de próstata (WPMY-1) fueron transfectadas con miRNAs expresados diferencialmente en los exosomas: miR-100-5p (ambos tipos de células), miR-21-5p (bulk), miR-139-5p (CSC) y let7c. Después de 48 horas, se evaluaron los cambios en la expresión de MMP-2, MMP-9, MMP-13, RANKL, OPG, CatL, CatB, CatK, BMP2, TGF- β 1, IL-8 y AR mediante qRT-PCR y/o western blot y también, ensayos funcionales de migración e invasividad de células WPMY-1. En los fibroblastos transfectados con miRNAs aumentó RANKL y la expresión de todas las MMPs, principalmente MMP-9. En los osteoblastos transfectados, aumentó la expresión de RANKL y disminuyó la expresión de OPG. El cambio de mayor magnitud se observó con miR-21.

A través de los exosomas, células de CaP reclutan células normales para favorecer su crecimiento y extensión. Sus miRNAs aumentan la expresión de proteínas que crean un microambiente favorable para la progresión tumoral y la metástasis. MiRNA-21 tiene el mayor efecto en la modificación del microambiente, es un posible blanco terapéutico.

ABSTRACT

Exosomes released by bulk and cancer stem cells (CSCs) modify the tumoral and pre-metastatic niche. Previously, we identified miRNAs differentially expressed among these two populations in prostate cancer (PCa) and by bioinformatics we described its effect on tumoral microenvironment. The goal was to validate functionally the effect of miRNAs from these exosomes on targets related with primary and pre-metastatic microenvironment modification.

Normal human undifferentiated osteoblasts (hFOB1.19) and prostate fibroblasts (WPMY-1) cell lines were transfected with differentially expressed miRNAs in exosomes: miR-100-5p (both cell types), miR-21-5p (bulk), miR-139-5p (CSCs) and let7c. After 48 hours, changes in the expression of MMP-2, MMP-9, MMP-13, RANKL, OPG, CatL, CatB, CatK, BMPR2, TGF- β 1, IL-8 and AR were evaluated by western blot and qPCR, and functional assays.

In fibroblasts the miRNAs increased RANKL and all MMPs expression, mainly MMP9. In osteoblasts, the miRNAs increased RANKL and diminished OPG expression. The greater magnitude change was observed with miR-21.

Through exosomes, PCa cells recruit normal cells to favor their growth and spread. Their miRNAs increase expression of proteins that create a favorable microenvironment for tumor progression and metastases. MiRNA-21 has the higher effect in modify microenvironment, being a potential therapeutic target.

INTRODUCCIÓN

El Cáncer de Próstata (CaP) se desarrolla en la glándula prostática, tejido del tamaño de una nuez, que rodea la uretra en la base de la vejiga de los hombres, y su función es producir componentes del fluido seminal. La próstata deriva del tejido endodérmico, que surge durante la embriogénesis tardía, como un evento inductivo que se genera gracias a interacciones recíprocas entre el mesénquima y el epitelio del seno urogenital, este proceso es dependiente del estímulo de andrógenos testiculares (Cunha, 2008).

El CaP es el segundo cáncer más común en hombres en los países desarrollados. La Sociedad Americana del cáncer, realizó una estimación de 220.800 casos nuevos que serían diagnosticados en Estados Unidos el año 2015 y ocurrirían 27.540 muertes (American Cancer Society, 2015 a). La probabilidad de que un hombre desarrolle CaP a lo largo de su vida, es de aproximadamente 1:7. A nivel nacional Globocan estima la incidencia del cáncer de próstata en 27,9 y la mortalidad en 15,6 por 100.000 habitantes (Globocan, 2012). Se desarrolla principalmente en hombres de edad avanzada. Aproximadamente, seis de cada 10 casos se diagnostican en hombres de 65 años o más. A pesar de ello, un porcentaje pequeño de hombres, presenta CaP con menos de 35 años. La edad promedio al momento de realizarse el diagnóstico es de 66 años (American Cancer Society, 2015 b).

En la búsqueda de biomarcadores óptimos ha incrementado el análisis de moléculas desreguladas en el cáncer, con la finalidad de aportar indicios en la detección y pronóstico.

Además, nuevas moléculas y complejos moleculares se han identificado como factores clave en el desarrollo del cáncer. Este campo abarca vesículas de tamaño pequeño, RNAs no codificantes, miRNAs, genes mutados y componentes del sistema inmune.

1.1 Heterogeneidad y microambiente tumoral.

Los tratamientos actuales para combatir el CaP deben enfrentar la heterogeneidad intra tumoral, que es una variable clave para entender la historia del tumor y el potencial de respuesta a la terapia. Los cánceres humanos con frecuencia manifiestan heterogeneidad intra-tumoral en características como la morfología celular, expresión de genes, el metabolismo, la motilidad, capacidad proliferativa, inmunogénica, angiogénica, y el potencial metastásico (Heppner et al., 1998). En un estudio transcriptómico realizado a 25 tumores de CaP, se encontraron genes de fusión atípicos y expresión de vías moleculares diferentes, dejando de manifiesto la diversidad tumoral, a pesar que los tumores eran del mismo estadio clínico (Wyatt et al., 2014). Cada tumor desarrolla heterogeneidad dentro de él, hay pocos eventos altamente recurrentes, y el paisaje molecular parece ser uno de gran heterogeneidad biológica, donde cada tumor desarrolla una combinación única de cambios somáticos, algunos de los cuales impulsan el desarrollo del tumor (Gay et al., 2016). La heterogeneidad tumoral se desarrolla en conjunto con los cambios en el ambiente que rodea al tumor, por lo cual el microambiente tumoral es un predominante modificador del comportamiento celular.

El microambiente tumoral se estructura con todos los componentes externos que contribuyen al desarrollo de la célula cancerosa. Los principales son: vasos linfáticos del tumor y matriz extracelular, células endoteliales y pericitos, células inmunes infiltrantes

y células estromales (Hannahan et al, 2012). Los efectos del microambiente tumoral en las células cancerosas se relacionan con la regulación de la proliferación, apoptosis, migración e invasión. Su efecto es pleiotrópico y determinado por interacciones recíprocas directas e indirectas de las células cancerosas con componentes de su microambiente (Panagiotou O et al., 2015). La heterogeneidad tumoral se favorece por su microambiente, permitiendo la aparición de distintas poblaciones celulares en la masa tumoral. Dentro de estas, hay una pequeña población de células (cerca al 1%) con capacidad de auto-renovación, que serían las células iniciadoras de la progresión tumoral. Estas células se denominan Cancer Stem Cells (CSC) o células madre del cáncer, y su mecanismo de acción se basa en la interacción con el microambiente tumoral (Valent et al., 2012 a).

1.2 Progresión del cáncer: Rol de las CSC

La Heterogeneidad se desarrolla por componentes intrínsecos y extrínsecos del tumor. La heterogeneidad intrínseca está determinada por la genética, epigenética y propiedades biológicas de las células cancerosas que contribuyen a su actividad oncogénica, mientras que los componentes extrínsecos se relacionan con el microambiente que rodea al tumor, el cual interactúa recíprocamente con las células cancerosas, permitiendo el desarrollo y la progresión de la enfermedad neoplásica (Neelakantan et al, 2015). Las CSC tienen un rol predominante en este escenario, presentan resistencia innata a las terapias farmacológicas, que a su vez se asocia con la persistencia y recurrencia de la enfermedad (Valent et al 2012 b). Tienen la capacidad de extender la población de sus células, repoblando el tumor primario y cuando se establecen en el sitio de metástasis, se diferenciarían en otros tipos de células de cáncer que constituyen la masa del tumor

secundario (Kreso et al, 2014). A pesar de que estas células poseen las propiedades de latencia, auto-renovación y pluripotencia, que son las mismas que tienen las células madre de la próstata, el origen de ellas aún no está claro. Se ha logrado aislar CSC, a partir de células madre de tumores de próstata primarios, utilizando los mismos marcadores que se utiliza para designar a las células madre epiteliales de la próstata. Estas CSC mostraron una alta capacidad de auto-renovación y diferenciación AR + (Collins et al, 2005).

La principal diferencia entre CSC y las células madre epiteliales de próstata, es su frecuencia de aparición. Las células madre prostáticas están presentes en los tejidos en una cantidad muy pequeña, por su parte, las CSC puede ser una población importante de la masa tumoral, sobre todo en el momento inicial de la metástasis (Jiang et al, 2012). La proporción de CSC en toda la masa del tumor puede ser diferente dependiendo del tipo de cáncer, y se ha propuesto una relación entre la cantidad de CSC y el pronóstico de la enfermedad (Korski et al, 2014).

1.3 Exosomas: comunicadores intercelulares.

Los exosomas derivados de CSC podrían ser un elemento integral del modelo continuo de la biología de las células madre, influyendo en la diferenciación de células que es condicionada por señales del tránsito del ciclo celular y, posiblemente, por estímulos ambientales (Quesenberry et al.,2010). Los exosomas de CSC podrían inducir cambios fenotípicos en las células receptoras, a través de intercambio genético y de moléculas que generan un vínculo funcional entre las células madre y el tejido residente en diversas condiciones fisiológicas y patológicas (Camussi et al, 2010).

Los exosomas presentan un diámetro entre 30-100 nm y se asemejan a las vesículas internas de los endosomas multivesiculares (Simons et al., 2009). Estas vesículas contienen RNA (principalmente miRNAs y RNAs no codificantes), DNA y proteínas, todo el contenido es propio de la célula secretora. (Lin J et al., 2015).

La formación de exosomas surgiría por invaginación de la membrana de endosomas tardíos (Raiborg et al., 2003). Se acumulan en los cuerpos multivesiculares citosólicos, desde donde son liberados por la fusión con la membrana plasmática. La liberación de la vesícula es particularmente activa en células proliferantes, como es el caso de las células cancerosas, donde estas vesículas pueden liberarse de forma continua (Yeh et al., 2015).

Los exosomas transfieren información, desde la célula secretora a la receptora por interacción receptor-ligando, fusión con la membrana plasmática y fagocitosis (Baietti et al, 2012). La información contenida en los exosomas de células cancerosas, se ha asociado a la tumorigénesis (Elmageed et al., 2014), crecimiento del tumor (Soldevilla et al., 2014), angiogénesis tumoral (Zhou et al., 2014), resistencia a drogas (Wei et al., 2014), interacción estroma-tumor (Webber et al., 2015) y metástasis tumoral (Costa-Silva et al., 2015). Estas vesículas contienen una gran cantidad de miRNAs, que serían influyentes en los procesos fisiológicos asociados al cáncer, que tienen un potencial de uso como biomarcadores diagnóstico y pronóstico (Azmi et al., 2013).

Los exosomas son vesículas secretadas por células normales y tumorales (Keller et al., 2006). Además, se han identificado en fluidos como sangre, orina, saliva, leche materna y líquido cefalorraquídeo (Vlassov et al., 2012). La identificación de biomarcadores del cáncer como PCA3 y el gen de fusión TMPRSS2-ERG en los exosomas, plantea el

importante rol que cumplirían en el desarrollo y metástasis del cáncer (Mitchell et al., 2009). Los exosomas podrían ser identificados en una prueba no-invasiva, para el diagnóstico y control de la enfermedad (Zhang et al., 2015). Los miRNAs de los exosomas regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional, a través de la vía de interferencia de RNAm (Hannafon et al., 2013). Es por esto, que se ha generado un especial interés por caracterizar a los miRNAs presentes en los exosomas y definir su rol en la progresión de CaP.

1.4 miRNAs: Biogénesis y acción en el cáncer.

Los miRNAs son moléculas de 22 a 24 nucleótidos, que desempeñan una función reguladora de los RNA mensajeros (RNAm). La biogénesis de los miRNAs es un proceso que comienza en el núcleo, donde los genes de miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II, para formar miRNA primario (pri-miRNAs). Luego, la endonucleasa RNasa III Droscha junto a la proteína DGCR8, (una proteína de unión a RNA de doble hebra, que estabiliza Droscha, a través de la interacción con su dominio C-terminal) corta el pri-miRNA, para liberar una horquilla denominada pre-miARN, que se transporta activamente al citoplasma por Ran-GTP y exportina-5 (Han et al, 2004). Aquí ocurre su maduración, donde Dicer escinde la molécula de pre-miRNA en un miRNA monocatenario maduro y, luego el miRNA maduro se une a las proteínas de la familia argonauta (argonauta 2) y se ensambla formando el complejo de silenciamiento inducido (RISC) con el fin de ejercer su función fisiológica (Cai et al., 2004). Después de ser incorporado en el RISC, el miRNA maduro induce silenciamiento génico post-transcripcional. Hay al menos 3 posibles mecanismos por los que los miRNA median la

inhibición de la expresión génica: la hibridación y la degradación de RNAm diana, inhibición de la traducción durante las fases de iniciación o elongación (Eulalio et al., 2008) y degradación del RNAm, a través del reclutamiento de cuerpos P (Liu et al., 2005).

Se ha identificado que un solo miRNA puede reprimir más de 100 mRNAs, en promedio, y más del 60% de los genes que codifican proteínas humanas son objetivo de los miRNAs (Urgese et al., 2016). La expresión de los microRNAs está con frecuencia desregulada en los tejidos cancerosos, y muchos miRNAs se encuentran en sitios genómicos que son comúnmente eliminados o amplificados en varios tipos de cáncer (Lu et al., 2005).

Los miRNAs liberados de forma pasiva de las células normales o tumorales, pueden ser preferentemente empaquetados en los exosomas, que proporcionan un efecto protector otorgándole estabilidad a los miRNAs extracelulares (Cheng et al., 2014). Estos miRNAs tendrían un efecto en el microambiente tumoral, promoviendo la activación de los fibroblastos y contribuyendo a la angiogénesis, la degradación de la matriz extracelular y la remodelación del estroma, procesos fundamentales para la progresión tumoral y la metástasis (Su et al., 2014; Chang et al., 2008).

1.5 Estroma reactivo y transición epitelio-mesénquima

Los miRNAs promueven la generación del estroma reactivo, una adaptación característica de los CaP con progresión tumoral. El estroma normal se compone principalmente de fibroblastos, células musculares lisas, y una matriz extracelular rica en fibras de colágeno. Otras células constituyentes en el compartimiento del estroma incluyen células endoteliales, las fibras nerviosas autónomas junto a sus ganglios asociados, y células

inmunes. Durante el desarrollo de los tumores, hay una modificación del estroma que los rodea, caracterizada por una desorganización estructural, con una alteración en la composición de la matriz extracelular y la aparición de los fibroblastos activados asociados a cáncer (CAF). (Clark et al, 2013 a).

En el tumor se observa una acumulación de CAF que influyen en la iniciación, la progresión y la respuesta al tratamiento de la enfermedad (Yamashita et al., 2012). Estos CAF se originarían por cambios en los fibroblastos que conforman normalmente el estroma y esta modificación se favorecería por la acción de exosomas (Li M et al., 2016). En un estudio se identifica a los exosomas de CaP como un factor potente para controlar la diferenciación funcional de BM-MSC (células madre mesenquimales de la médula ósea) hacia un CAF pro-angiogénicos y pro-invasivos (Chowdhury et al, 2015 a).

El estroma reactivo posee la capacidad de revertir el fenotipo de células diferenciadas, por lo que se presume que podría estar implicado en la generación de CSC (Hannahan et al., 2011). El estroma prostático normal se compone principalmente de miofibroblastos, mientras el estroma reactivo está compuesto principalmente por CAF con una disminución significativa de miofibroblastos (Clark et al, 2013 b: Tuxhorn et al., 2011). Los CAF consisten en una colección heterogénea de células que expresan diferentes marcadores, como, proteína activadora de fibroblastos, proteína específica de fibroblastos, alfa actina de músculo liso, y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas. Subpoblaciones de CAF aisladas de pacientes con CaP, tienen características bioquímicas específicas, posiblemente como resultado de las influencias localizadas de poblaciones

heterogéneas adyacentes de las células epiteliales tumorales, y se ha observado, que algunos subtipos CAF son más tumorigénicos que otros (Hägglöf C & Bergh A, 2012).

A diferencia de lo que ocurre en otras patologías prostáticas, como la hiperplasia benigna, en el CaP ocurre una remodelación de la matriz extracelular y la invasión de las células tumorales en el estroma. El estroma tumoral se desarrolla de forma simultánea, por cambios a nivel celular y del ambiente local, junto con los cambios que causan la inmortalización de células epiteliales. Existe una evolución gradual del microambiente del tumor, que incluye cambios en el estroma normal por acción de la progresión de las células del tumor primario, modificando el nicho primario por la remodelación de la matriz extracelular. Induciendo la migración de células de cáncer local a la metástasis (Camarota & Laukkanen, 2016).

En el CaP, los CAF contribuyen a mejorar el potencial de crecimiento de CSC al aumentar el índice de proliferación de células cancerosas, a través de señales paracrinas (Adisetiyo et al., 2014). El estroma reactivo secreta factores de crecimiento y proteínas de remodelación de la matriz extracelular, principalmente metaloproteinasas de matriz (MMPs) y catepsinas, promotoras de la progresión y metástasis tumoral (Barve et al., 2014). Las más estudiadas son las MMPs, estas proteínas están implicadas en la degradación de los componentes de la matriz extracelular del estroma, tales como colágeno y fibronectina (Lu P et al, 2011).

Varios estudios han demostrado que los exosomas derivados de células estromales, también pueden interactuar con las células cancerosas e intercambiar factores pro-oncogénicos, presentes en el estroma reactivo (Luga et al, 2012), favoreciendo un proceso

denominado transición epitelio-mesénquima (EMT). Mediante este proceso, las células epiteliales cambian su fenotipo y comportamiento, de epiteliales a uno similar a las células mesenquimales. Lo que se traduce en un aumento de la motilidad, invasividad y cambios en los componentes de la matriz extracelular que sintetizan. EMT confiere a las células cancerosas la capacidad de invadir la membrana basal y migrar hacia sitios distantes generando la metástasis (Kalluri et al., 2009). Se ha demostrado la capacidad de los CAF derivado del tumor o los exosomas de estas células, para inducir el fenotipo EMT en las células cancerosas (Yu et al., 2014). CAF secretaría quimioquinas que convierten a las células epiteliales cancerosas en células mesenquimales, ejerciendo una reprogramación metabólica de las células cancerosas, mediante la inducción de un cambio fenotípico (Fiaschi et al., 2012).

1.6 Remodelación ósea y metástasis de CaP

Los cambios que generan el estroma reactivo y la EMT fomentan el avance del tumor fuera de la próstata, proceso que se desarrolla predominantemente en el hueso. En condiciones normales, el hueso presenta una constante remodelación caracterizada por un regulado equilibrio entre la resorción ósea mediada por los osteoclastos y la formación de hueso nuevo por parte de los osteoblastos (Florencio-Silva et al., 2015). La desregulación en este equilibrio, no es un evento exclusivo del cáncer, sino común a muchos trastornos óseos, como artritis y artrosis. El CaP metastásico, generalmente es considerado como una lesión de tipo osteoblástica, la que también es acompañada por actividad osteoclástica anormal (Guise, 2010). Los osteoclastos y osteoblastos ayudarían a la formación de un nicho fértil, para el establecimiento de células cancerosas. Se realizan interacciones con

las células del CaP, que fomentarían un aumento de quimioquinas en el onco-nicho, promoviendo el desarrollo de la metástasis ósea. Los factores secretados por el tumor promueven el homing órgano-específico (Jacob et al., 1999). Se identifica una abundancia de TGF- β , en el entorno del hueso, que podría actuar como un quimio-atrayente de células de CaP al hueso (Suzman et al., 2014).

La supervivencia de las células malignas que forman micrometástasis en el órgano receptor no está garantizada, ya que pueden existir diferencias entre el microambiente del tumor primario y el sitio de metástasis. Para que se produzca la adaptación del nicho pre-metastásico, se despliegan mecanismos para modificar el microambiente. Para ello, junto con células estromales, establecen una red de señalización para promover su crecimiento, satisfacer las demandas metabólicas para la síntesis de proteínas pro-angiogénicas, con el fin de formar nuevas redes vasculares y facilitar su supervivencia inicial en el nuevo ambiente (Arvelo et al., 2016 a).

La metástasis es un proceso en gran medida ineficaz, en modelos animales sólo el 0,01% de las células tumorales que entran en el torrente sanguíneo, generan con éxito un tumor secundario (Fidler, 1970). El comienzo de la metástasis se desarrolla con la difusión de las células de cáncer, desde su sitio de origen hacia un órgano distante (Lugassy & Escande, 1997). La mayor complicación que manifiesta el CaP es la metástasis ósea, desarrollada en más de un 80% de los pacientes que mueren a causa de esta enfermedad (Ziaee S et al, 2015). En pacientes con metástasis ósea prostática, se observa un aumento en la resorción ósea y la osteoclastogénesis espontánea (Roato et al, 2008). La regulación de las células óseas esta mediada por la activación o inhibición de factores fundamentales

para la diferenciación de ellas, entre las que se incluyen las proteínas RANKL y OPG. RANKL es una proteína unida a la membrana celular expresada principalmente en la superficie de los osteoblastos y las células estromales de la médula ósea, se une a su receptor RANK en la superficie de los precursores de osteoclastos, estimulando su diferenciación a osteoclastos maduros. OPG es un receptor señuelo de RANKL, que también es producido por osteoblastos y células estromales óseas y puede prevenir la destrucción ósea mediante el bloqueo de la unión entre RANKL y RANK, inhibiendo de este modo la diferenciación y activación de osteoclastos (Boyce et al., 2008). La desregulación del sistema RANK /RANKL / OPG se ha detectado en CaP (Chen G et al, 2006).

La metástasis se conforma por un proceso multicelular, donde los agentes primarios de la generación del nicho son múltiples y provienen de distintos orígenes. El establecimiento de las CSC en el nicho pre-metastásico se presume como un hito determinante en la generación de la lesión ósea.

1.7 NGS de miRNAs de exosomas de pacientes con CaP

Con el fin de caracterizar el efecto de los miRNAs de exosomas en la progresión tumoral y el establecimiento del nicho pre-metastásico, se ha establecido un modelo que permitió estudiar las CSC del CaP, mediante un método de enriquecimiento de cultivos primarios. En un estudio preliminar, se reclutaron 5 pacientes con CaP localizado, en el hospital clínico de la Universidad de Chile. Se obtuvieron muestras de sus próstatas, tras ser sometidos a Prostatectomía radical, las que después del análisis histológico se clasificaron en tumores con estadios intermedios (con estadio Gleason 6-7). De estas muestras, se

obtuvo 5 cultivos primarios, tras el siguiente procedimiento: las células epiteliales de CaP fueron disgregadas mecánicamente, luego se realizó una digestión enzimática del tejido, seguido de la formación del cultivo de células adherentes en su medio específico. A este cultivo inicial compuesto principalmente por las células epiteliales constituyentes de la masa tumoral, se le denominó “bulk”. A partir de estos cultivos, se realizó el aislamiento y el enriquecimiento de células CSC, mediante la técnica de Magnetic-associated a cell sorting (MACS) en base a anticuerpos acoplados a los microbeads magnéticos. Luego de 21 días, se obtuvo prostatosferas enriquecidas en torno a un 95% de CSC obtenidas por medio de una selección con los marcadores CD44 + / CD133 + / ALDH + / ABCG2 + / CD24- , tal como se describe anteriormente (Castellón et al., 2012).

De los 5 cultivos de células bulk y 5 de CSCs se extrajeron exosomas, de los cuales se obtuvieron los miRNAs. La caracterización de estos miRNAs fue realizada mediante secuenciación masiva (NGS), a través de la plataforma Illumina HiSeq2000. El fin de este estudio, es establecer las diferencias de expresión de los miRNAs que modificarían el nicho primario (a través de los exosomas de células bulk) y el nicho pre-metastásico (por acción de los exosomas de CSC).

En primera instancia, se evaluó la calidad e integridad del material genético por bioanalyzer mediante Small RNA Chip. El análisis de las células tumorales bulk y CSCs, demostró una abundancia y pureza de los RNAs de tamaño pequeño suficiente para una obtención adecuada de los perfiles de miRNAs pertenecientes a las muestras.

Los datos obtenidos por NGS se analizaron en distintos niveles (Sistemas genómicos, 2014): Se identificaron un total de 1839 especies de miRNAs, de las cuales 990 fueron



especies de miRNAs conocidos. Del total de miRNAs, 223 presentaron expresión diferencial, comparando las muestras de exosomas bulk y CSCs. (127 fueron miRNAs conocidos y 98 potencialmente nuevos miRNAs). De estas 223 especies diferencialmente expresadas, sólo 26 presentaron una diferencia estadísticamente significativa: 19 especies conocidas y 7 nuevas. Se desprende del análisis de estas 19 especies, que el contenido de miR-100 es el más abundante, seguido por miR-21, siendo este el que se encuentra con una alta expresión en exosomas de células bulk y miR-139 altamente expresado en exosomas de CSC (Sánchez et al, 2016 a). Se ha demostrado que estos miRNAs tienen acción en el cáncer. El miRNA más abundante, miR-100 estaría implicado en la inducción de la EMT (Cheng D et al., 2014 a). Aunque se conoce como un supresor tumoral en varias investigaciones, su papel sería más bien dependiente del contexto (Zhang et al., 2009). En CaP una alta expresión actuaría como un oncomiR, alterando el control del ciclo celular y promoviendo la inestabilidad genómica (Leite K et al., 2013). Mir-21 es uno de los miRNAs más estudiados en cáncer y se encuentra relacionado con la mayoría de los eventos cancerosos, siendo reconocido como un oncomiR en la mayoría de los tipos de cáncer (Nouraree N et al., 2013; Dey N et al., 2012; Zhang B et al., 2012). Mir-139 se presenta como un importante modificador de la vía de diferenciación ósea (fundamental para la metástasis ósea osteoblástica) y se encuentra desregulado en los tipos de cáncer que generan tumores óseos, como cáncer de mama u osteosarcoma (Li H et al., 2015; Peña-Chilet M et al., 2014).

Hipótesis

Con los antecedentes previamente descritos, se planteó la siguiente hipótesis: “Los miRNAs sobreexpresados de exosomas de CaP liberados en el nicho tumoral primario y pre-metastásico, modificarían el microambiente de las células que normalmente habitan ese nicho, favoreciendo la remodelación de la matriz extracelular, modificación de fibroblastos y maduración de osteoblastos”.

Con el fin de demostrar la hipótesis, se planteó como objetivo general del trabajo: Caracterizar el efecto de microRNAs presentes en los exosomas de Cáncer Prostático en células que normalmente habitan el nicho prostático (células estromales prostáticas) y pre-metastásico (osteoblastos). Para cumplir el objetivo general fueron planteados los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar el efecto de miRNAs sobreexpresados en exosomas de CaP sobre los niveles de expresión de RNAm y proteínas relacionadas con la producción de matriz ósea y remodelación en los fibroblastos de próstata.
2. Evaluar el efecto de miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP sobre los niveles de expresión de RNAm y proteínas relacionadas con la maduración de osteoblastos.
3. Evaluar el efecto de la transfección de miRNAs sobreexpresados en exosomas de CaP en la capacidad de invasión y migración de los fibroblastos de próstata.

Con el fin de dar cumplimiento a estos objetivos, se seleccionó 4 miRNAs sobreexpresados en exosomas de CaP, de acuerdo al análisis por NGS, para transfectar

osteoblastos y células estromales prostáticas humanas, y medir el efecto a nivel de RNAm, proteínas y ensayos funcionales. En el CaP avanzado, aumentan los CAF, que fomentan la progresión tumoral y la EMT. Los osteoblastos maduros, aumentan el reclutamiento de osteoclastos, fomentando la actividad osteoblástica y osteoclástica, fenómeno que se incrementa en el CaP. En el presente estudio, se mide el efecto de los miRNAs en la remodelación de fibroblastos y generación de osteoblastos maduros, células que fomentarían la progresión tumoral y el establecimiento del nicho pre-metastásico. Los miRNAs seleccionados son miR-100-5p (el miRNA más abundante en los exosomas), miR-21-5p (el segundo miRNA más abundante y el que presenta mayor diferencia de expresión), miR139-5p (que presenta un alto efecto en la diferenciación de osteoblastos) y Let7c (control positivo del efecto generado por la transfección de miRNAs).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivos celulares

Las líneas celulares fueron adquiridas en ATCC, hFOB 1.19 (ATCC ® CRL-11372™: osteoblastos humanos) y WPMY-1 (ATCC® CRL-2854™: fibroblastos humanos), fueron seleccionadas para medir el efecto de los miRNAs.

hFOB 1.19: Las células cultivadas a una temperatura de 33,5°C exhiben una rápida división celular (36 horas) y su estado de diferenciación es inmaduro, mientras que a una temperatura de 39,5°C ocurre una baja tasa de división celular (96 hrs) y los osteoblastos completan su proceso de maduración. Esta línea celular fue establecida por la transfección de tejido con el vector de expresión sensible a la temperatura pUCSVtsA58 y el vector de expresión resistente a la neomicina pSV2-neo. Se seleccionaron los clones en presencia de 0,6 mg / ml de G418. El medio base para esta línea celular es una mezcla 1:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco Ham F12, con 2.5 mM L-glutamina (sin rojo fenol). Para el medio de crecimiento completo, se agrega al medio base: 0,3 mg / ml de G418 y SFB 10% de concentración en base al volumen final. Para los experimentos realizados, las células se cultivaron a 33°C y el recambio de medio fue cada 2-3 días.

WPMY-1: Las células estromales de miofibroblastos, derivan de la zona periférica de la próstata de un adulto normal (54 años, caucásico). Poseen un gen del antígeno SV40-T en un plásmido pRSTV. Pertenecen a la familia de células derivadas de la próstata. El medio base de estas células es Eagle modificado por Dulbecco. Para el medio completo se agrega

SFB a una concentración final de 5%. Las células se cultivaron a 37 °C y el recambio de medio se realizó cada 48 horas.

Transfección de miRNAs imitadores con lipofectamina

Los miRNAs seleccionados para la transfección fueron: hsa-miR-139-5p (478312_mir), hsa-miR-100-5p (478224_mir), hsa-miR-21-5p (477975_mir) y let-7c (4464081_mir). La determinación de miRNAs candidatos fue basada en el análisis de NGS realizada a las muestras de exosomas de CaP. Let7c se utilizó como control positivo de la transfección. Además, se transfectó las células con un FAM miR-negativo (AM17012), con el fin de corroborar que los resultados fueran generados por el efecto de los miRNAs y no debido a la técnica. Los miRNAs imitadores (mirVANA, Lifetechnologies) se transfectaron a una concentración de 25 nM.

Las células hFOB 1.19 y WPMY-1, fueron cultivadas bajo condiciones descritas previamente, en 6 placas de 100 mm, hasta obtener una confluencia de 50-60% al momento de la transfección. Al momento de la transfección se preparó un mix compuesto por opti-MeM (2 mL, Lifetechnologies), lipofectamina RNAimax (20µL, Lifetechnologies) y uno de los miRNA imitadores (60µL, Lifetechnologies) por placa: miR-139, miR-100, miR-21, Let7c y miR-negativo. Se dejó una placa como control, que fue tratada de igual manera, omitiendo algún miRNA imitador. Cada mix se dejó 20 minutos a temperatura ambiente, antes de la transfección. Las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y, posteriormente se agregó la mezcla a cada placa. Las células hFOB 1.19 se cultivaron a 33°C y WPMY-1 a 37°C. Luego de 6 horas post-transfección, se agregó 2

mL del medio de cultivo suplementado para cada línea celular, 48 horas después se recogieron las células, para extraer el RNA y proteínas totales de cada tratamiento.

Extracción de RNA y proteínas

Dos días después de la transfección, las células se tripsinizaron y se centrifugaron a 2000g por 5 minutos a temperatura ambiente (2 veces, agregando PBS para lavarlas), finalmente fueron resuspendidas en 1 mL de PBS 1X frío.

La extracción de proteínas y RNA se realizó con el Kit Paris (Lifetechnologies). Se siguieron las indicaciones del protocolo, dividiendo el volumen total de lisado en 2 para la extracción de RNA y proteínas.

El lisado del cual se obtuvo las proteínas, se colocó en hielo 10 minutos, se agregó 200 o 400 μ L de Tampón Ripa (dependiendo de la concentración del lisado) y se pasó por aguja varias veces para asegurar la ruptura celular. Posteriormente, se centrifugó a 16.000g y se agregó coctel de inhibidor de proteasas (miniEDTA, Roche). Se guardaron las proteínas a -20°C .

El lisado del cual se realizó la extracción de RNA, se mezcló con igual volumen de tampón de Lisis y se agregó un volumen igual de etanol 100%. Luego, se cargó la muestra en un filtro y se centrifugó a 10.000 g por 1 minuto. La solución que atravesó el filtro fue descartada y el filtro fue lavado con 700 μ L de solución de lavado 1, se centrifugó a 10.000g y se descartó el filtrado. Se lavó nuevamente la columna, 2 veces, con 500 μ L de solución de lavado 2/3. Finalmente, se eluyó el RNA con 50 μ L de solución de elución precalentada a 95°C .

Transcripción reversa

Se realizó la reacción de transcripción reversa (RT) con 1,5 µg de RNA (medido por Nanodrop). La reacción de RT-PCR fue realizada con un tratamiento previo con DNasa, con el fin de eliminar el DNA genómico. De cada lisado celular se generó una mezcla de reacción general, con 1 µL DnasaI (Promega), 1µL tampón Dnasa I 10X (Promega), un volumen de lisado con una concentración de 1,5 µg (volumen variable) y agua ultrapura (el volumen final del lisado y agua es 8 µL). Cada reacción de 10 µL, se incubó 30 minutos a 37°C y luego, se agregó 1 µL de solución de detención de la Dnasa. Después se incubó cada muestra a 65°C por 10 minutos y transcurrido ese tiempo se agregó 1µL de partidores aleatorios (Promega), para la síntesis de cDNA. Se incubó a 70°C por 5 minutos, transcurrido este tiempo, las muestras se dejaron inmediatamente en hielo. Finalmente, se agregó: 4µL de tampón MMLV (Promega), 4µL DNTPS (2.5 mM) y 1µL de MMLV transcriptasa reversa (Promega). Se mezcló con la muestra tratada con Dnasa y se incubó 60 minutos a 37°C, 10 minutos a 72°C y se conservó a 4°C. Los cDNAs obtenidos se mantienen a -20°C.

PCR cuantitativo (qPCR)

La reacción de qPCR general, se realizó con 10 µL del reactivo master mix I SYBR Green, 1µL de partidador adelantado (10 mM), 1µL de partidador reverso (10 mM), agua y 1 µL de cDNA . En el caso de GAPDH se utilizó 0,3µL de partidador adelantado (10mM) y 0,3µL de partidador reverso (10mM). La lista de los partidores, se adjunta en la tabla suplementaria 1. La reacción se realizó en un termociclador Light Cycler 480 (Roche) utilizando el siguiente programa: Pre-incubación (95°C, 10 minutos), Amplificación de 45 ciclos (95°C

10 segundos, 60°C 15 segundos y 72°C 20 segundos), Curva de calentamiento (95°C 5 segundos, 65°C 1 minuto y 97°C continuo) y enfriamiento (40°C 10 segundos).

El nivel de expresión de cada RNAm estudiado, se obtuvo mediante el análisis de los resultados obtenidos con los Ct en el qPCR. Cada muestra fue normalizada por GAPDH.

La fórmula utilizada fue:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Donde 2 corresponde a la eficiencia de amplificación de los partidores (en el caso de genes con eficiencia muy cercana o igual a 2) y $\Delta\Delta Ct$: (Ct objetivo- Ct constitutivo) tratamiento- (Ct objetivo-Ct constitutivo) control. En genes con eficiencias no aproximables a 2, se utilizó la siguiente fórmula: $E^{\Delta Ct \text{ tratamiento}} / E^{\Delta Ct \text{ control}}$. Donde E es la eficiencia de cada partidador.

Western Blot

Se realizaron geles de acrilamida con una concentración de 10% o 12%. Se cargaron 20 µg de proteínas, extraídas de cada experimento de transfección. Se agregó a las muestras tampón de carga al 20% con respecto al volumen final. Las muestras se calentaron a 95°C por 5 minutos, tras cargar las muestras en el gel, la corrida de los geles se realizó en 2 condiciones: a 75 Volts (gel concentrador, aproximadamente 30 minutos) y luego, 150 volts (gel, separador, aproximadamente 1 hora). Se incluyó un peso molecular (Page ruler plus, thermofisher), para identificar el tamaño de las proteínas de interés. Luego de la separación, por electroforesis, los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se realizó una transferencia húmeda a 100V (voltaje constante) por 1 hora. Transcurrida la

transferencia, se verificó la eficiencia, tificando las membranas con rojo ponceau. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo primario toda la noche o 1 hora a temperatura ambiente (sólo para el caso de B-actina). El listado de anticuerpos y las diluciones se anexa en la tabla suplementaria 2. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos en agitación suave, a temperatura ambiente con tampón TBS-T. Luego, se incubó 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario indicado para cada anticuerpo primario en dilución 1: 10.000. Se realizaron 3 lavados de 10 minutos a temperatura ambiente con TBS-T y 2 lavados de 5 minutos con TBS 1X, ambos en agitación suave. El revelado se realizó con sustrato de peroxidasa para la quimioluminiscencia (Ecl, thermofisher), se agregó a la membrana igual volumen de solución 1 y solución 2 de ECL y se dejó la membrana con los reactivos en oscuridad por 5 minutos. Se evaluó la intensidad de la quimioluminiscencia, mediante el scanner c-digit (Li-Cor Biosciences). La normalización del western blot se realizó con respecto a los niveles de expresión de la proteína B-actina y se calculó una relación entre Proteína analizada/proteína b-actina para cada tratamiento.

Ensayo de migración Transwell

El ensayo de migración se realizó mediante la transfección con miRNAs imitadores, bajo las mismas condiciones descritas anteriormente. A las 24 horas post transfección, las células se recogieron y se sembraron en pocillos con membrana microporosa (Transwell, Corning) con una membrana de 6.5 mm de poro, que permite a las células migrar hacia la parte inferior del pocillo. Se sembraron en la parte superior del pocillo con membrana microporosa, 5.000 células en un volumen de 100 μ L de medio de cultivo suplementado con 0,1% SFB. El medio de cultivo debajo del pocillo, tenía una concentración de 10% de

SFB, favoreciendo la migración hacia la parte inferior. Transcurridas 20 horas de la siembra, se removieron mecánicamente las células alojadas en la parte superior del pocillo microporoso, esto con el fin de observar exclusivamente las células de la parte inferior y analizar el desplazamiento por microscopía. Las células fueron fijadas 10 minutos con etanol y teñidas 5 minutos con cristal violeta 1% p/v. Luego, las células fueron observadas al microscopio de campo claro y con un aumento 10X, se tomaron fotos de 7 campos al azar por cada ensayo y se contaron las células presentes.

Ensayo de migración cierre de herida

Este ensayo fue realizado en las células WPMY-1 para medir su desplazamiento, luego de realizar una herida. Estas células tienen una tasa de división celular de 48 horas, por lo que todos los experimentos se realizaron a las veinte horas post herida. Se transfectaron las células como se describió anteriormente y 24 horas después, fueron sembradas 75.000 células en pocillos de 2 cm² (placa de 24 pocillos). Veinticuatro horas después, se realizó la herida con una punta de pipeta de 200µL, y tras veinte horas, se analizó el desplazamiento de estas células hacia la zona de la herida. Las células fueron fijadas 10 minutos con etanol y teñidas 5 minutos con cristal-violeta 1% p/v. Las células se observaron en un microscopio de campo claro y un aumento de 10X, se tomaron fotografías al minuto 0 y luego a las 20 horas y se evaluó el desplazamiento del frente de herida en todas las transfecciones.

Estadística

Las transfecciones con miRNAs de las células WPMY-1 y hFOB 1.19, se hicieron en triplicado. Cada experimento de qPCR fue realizado en triplicado para cada transfección (n=9 en total) y de cada western blot n=3 en total. Los ensayos de migración e invasividad, también fueron realizados con n=3.

La normalización del qPCR se realizó con respecto al gen constitutivo GAPDH y la cuantificación relativa de la expresión de los objetivos, fue calculada por el método $\Delta\Delta Ct$ descrito anteriormente. La normalización del western blot, se realizó respecto a B-actina.

Se utilizó la prueba no paramétrica U Mann Whitney, que permitió comparar el efecto de las condiciones de tratamiento en muestras aleatorias independientes.

RESULTADOS

1) Evaluación de la eficiencia de la transfección de miRNAs imitadores en células WPMY-1 y hFOB 1.19.

Se evaluó la efectividad de la transfección de cada miRNA en estudio, evaluando la inhibición de la expresión de RNAm de blancos comprobados en literatura (Tabla 1), para las células WPMY-1 (Figura 1) y hFOB 1.19 (Figura 2). Los blancos seleccionados son directos en la inhibición de los miRNAs estudiados. La eficiencia de amplificación de los partidores se especifica en los anexos (tabla suplementaria 3). En ambas líneas celulares tratadas con miRNAs imitadores, se observó una disminución en los niveles de expresión del RNAm blanco con respecto a los niveles de RNAm basales. Una disminución mayor al 60% se considera producto de una inhibición de la expresión del RNAm, debido a una transfección eficiente.

Tabla 1: Blancos de inhibición de cada miRNA, utilizados para la eficiencia de la transfección de los miRNAs imitadores en las células WPMY-1 y hFOB 1.19.

miRNA imitadores	Blanco
miR-100-5p	BMPR2
miR-21-5p	P63
miR-139-5p	OPG
Let7c	AR

La transfección con los miRNAs en los fibroblastos WPMY-1 (Figura 1) disminuyó su expresión con respecto a la expresión relativa de las células control, por sobre el 77% en

todos los experimentos: 97,3% en BMPR2, 77,3% en P63, 86% en OPG y 94,8% en AR. La transfección con miRNA negativo produce un leve aumento no significativo respecto de la expresión basal. Estos resultados nos indican, que la inhibición se atribuye al efecto de los miRNAs y no a la técnica.

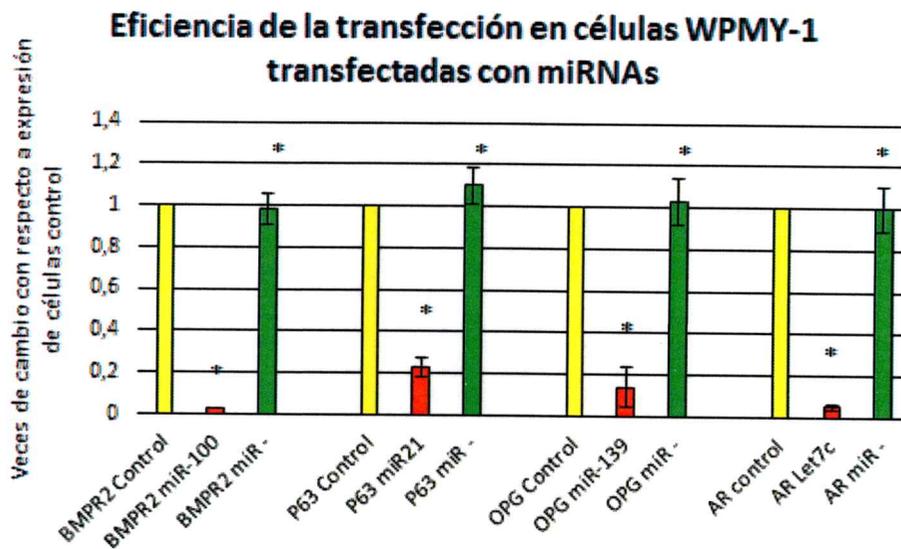


Figura 1: Eficiencia de la transfección en células WPMY-1 con relación a la expresión relativa de RNAm blanco. La condición control son las células no transfectadas y su expresión se utilizó como nivel basal de expresión, y se normalizó en base al método $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las columnas en amarillo representan la expresión de RNAm basal de cada blanco, las columnas rojas representan la expresión de RNAm blanco de las células transfectadas con miRNAs y las columnas verdes la expresión de RNAm blanco de las células transfectadas con miRNA negativo. Las barras negras indican la desviación estándar (N = 9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

En osteoblastos, se midió la expresión de los RNAm blanco tras la transfección respecto de la condición control (Figura 2). En las células transfectadas, se observó una disminución mayor al 72% en todos los casos: 92,2% en BMPR2, 73% en P63 y 90,1% en OPG. No se midió la eficiencia de Let7c en hFOB 1.19, ya que no se expresa el blanco (AR). Let7c se utilizó como control positivo, su efecto en la transfección se encuentra comprobado en literatura, por lo que no se buscó un nuevo blanco de Let7c para las células hFOB 1.19.

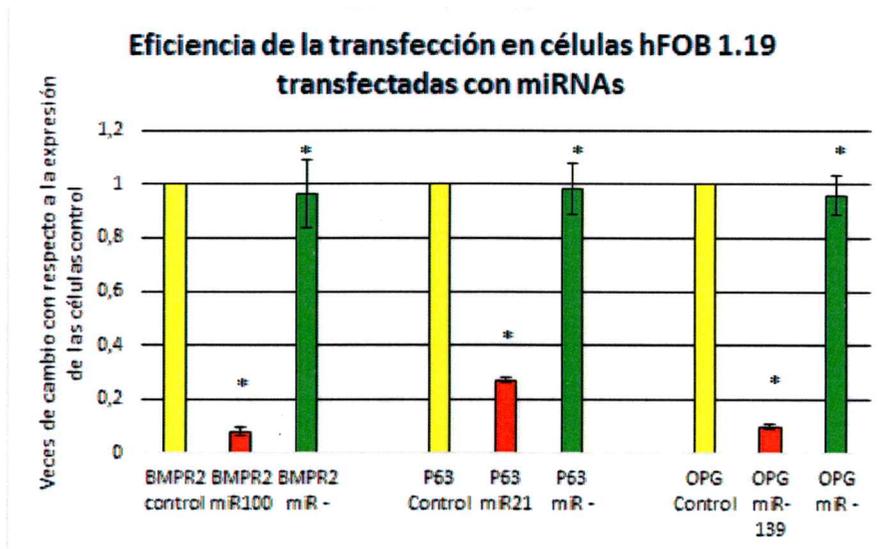


Figura 2: Eficiencia de la transfección en células hFOB 1.19 con relación a la expresión relativa de RNAm blanco. La condición control son las células no transfectadas y su expresión se utilizó como nivel basal de expresión, y se normalizó en base a $\Delta\Delta Ct$ GAPDH. Las columnas en amarillo representan la expresión de RNAm basal de cada blanco, las columnas rojas representan la expresión de RNAm blanco de las células transfectadas con miRNAs y las columnas verdes la expresión de RNAm blanco de las células transfectadas con miRNA negativo. Las barras negras indican la desviación estándar (N = 9). *p < 0,05 comparado con las células control.

Una vez que se verificó la eficiencia de la transfección, se evaluaron los cambios en los niveles de expresión de RNAm objetivos: MMP-2, MMP-9, MMP-13, CatL, CatB, OPG, RANKL, TGFB-1, AR, IL-8 y BMP2. Moléculas que se encuentran desreguladas en el CaP, que se encontrarían río abajo del blanco de inhibición.

2) Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en células WPMY-1 con respecto a la expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral.

Se evaluó el efecto de la transfección de miRNAs imitadores en las células WPMY-1, a nivel de RNAm mediante qRT-PCR y proteínas por western blot. Los RNAm candidatos fueron elegidos considerando su rol en la progresión tumoral (MMPs, catepsinas y TGF- β 1, principalmente). El objetivo de este experimento fue evaluar si la sobreexpresión de estos miRNAs en las células WPMY-1, producen una disminución o aumento de la expresión de los RNAm candidatos. El aumento o disminución de la expresión de RNAm se midió con respecto a las células control que se normalizó en 1. Para evitar la dispersión de las diferencias de expresión, se calculó el Log base 2 de cada resultado, donde la expresión de las células control se normaliza en cero, la disminución de la expresión es negativa y el aumento positivo.

2.1 Efecto en la expresión de MMPs

La expresión de MMPs a nivel de RNAm en células WPMY-1 aumentó en todas las células transfectadas (Figura 3). En el caso de MMP-2 por cada transfección con respecto a las células control fue de: 0,49 en let7c, 0,67 en miR-100, 2,54 en miR-21 y 1,13 en

miR-139. En MMP-9 fue: 1,02 en let7c, 1,06 en miR-100, 3,51 en miR-21 y 2,29 en miR-139. En el caso de MMP-13 fue de: 0,91 en let7c, 1,5 en miR-100, 2,31 en miR-21 y 1,65 en miR-139. Se observó un aumento significativo en la expresión de RNAm al transfectar las células con miR-21 para las 3 MMPs. El RNAm de MMP-9 presentó el mayor aumento en la expresión. Las transfecciones con miR-negativo tuvieron un cambio estadísticamente no significativo -0,05 en MMP-2, 0,35 en MMP-9 y 0,27 en MMP-13.

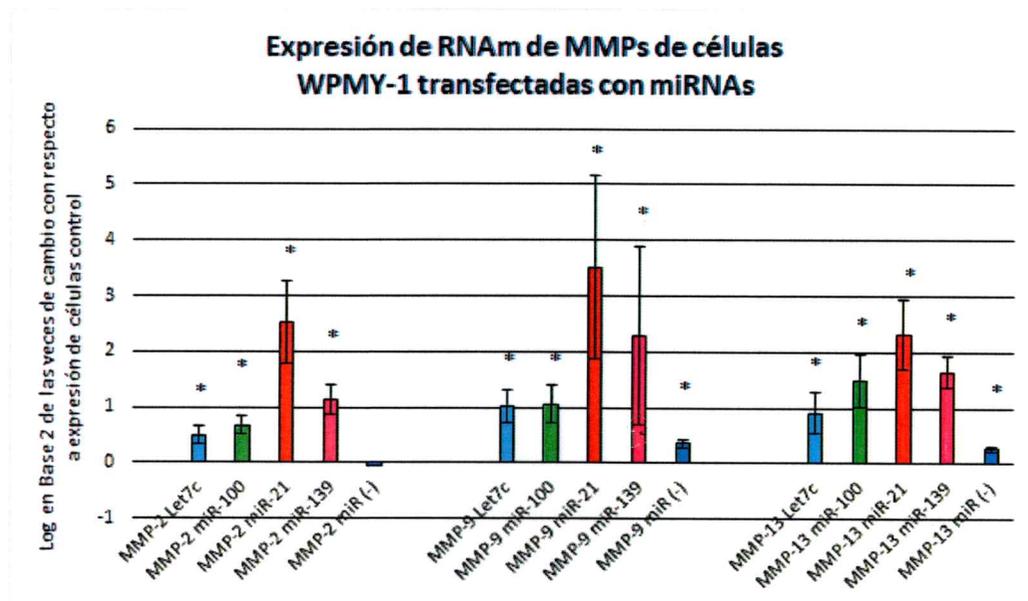


Figura 3: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de RNAm de MMPs en células WPMY-1. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

Por otra parte, a nivel de proteínas, las MMPs también aumentaron su expresión relativa con respecto a células control. La normalización se realizó con respecto a la expresión de la proteína B-actina. El aumento de la proteína MMP-2 en cada transfección fue de: 2,24 en Let7c, 2,76 en miR-100, 4,17 en miR-21 y 2,89 en miR-139. En MMP-9 fue de: 3,92 en Let7c, 2,38 en miR-100, 8,24 en miR-21 y 6,61 en miR-139. Finalmente, el aumento de MMP-13 fue de: 3,91 en Let7c, 3,16 en miR-100, 7,15 en miR-21 y 2,21 en miR-139.

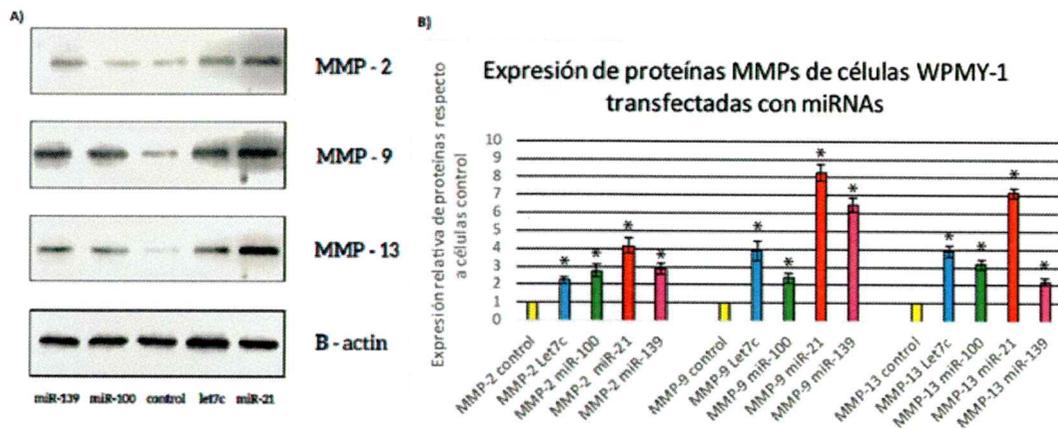


Figura 4: Efecto de la transfección de miRNAs imitadores en la expresión de proteínas MMPs en células WPMY-1. A) Imagen representativa de un ensayo de western blot con las proteínas de células WPMY-1 transfectadas con miRNAs. En la parte inferior de la figura, se identifica el tratamiento realizado en las proteínas de cada carril. B) Las columnas en amarillo representan la expresión basal de proteínas, y las demás columnas la expresión de MMPs de células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar (N =3). * = $p < 0, 05$ comparado con las células control.

2.2 Efecto en la expresión de RANKL y OPG

Se evaluó la expresión de RNAm de RANKL y OPG en células WPMY-1 transfectadas con miRNAs imitadores (Figura 5). La acción biológica de estas proteínas es opuesta, lo mismo ocurre con sus niveles de expresión en las células. Esto fue corroborado por el experimento de transfección, en el cual la expresión de RNAm de RANKL aumentó en las células transfectadas, mientras que el RNAm de OPG disminuyó. El aumento de la expresión de RNAm de RANKL fue de: 0,44 en let7c, 0,25 en miR-100, 2,46 en miR-21 y 0,77 en miR-139. La disminución de la expresión del RNAm de OPG de células transfectadas fue de: -1,0 en let7c, -1,24 en miR-100, -2,44 en miR-21, -2,84 en miR-139. En el caso de la transfección con miR-negativo, el cambio de expresión fue: -0,06 en RANKL y 0,15 en OPG. El aumento más significativo de la expresión de RNAm de RANKL fue en la transfección con miR-21 y la disminución más significativa de la expresión de RNAm de OPG en las transfecciones con miR-139 y miR-21.

A nivel de proteínas RANKL y OPG mostraron un cambio de expresión similar al observado a nivel de RNAm por transfección de miRNAs en las células WPMY-1 (Figura 6). RANKL aumentó su expresión proteica, mientras OPG disminuyó su expresión con respecto a las células no transfectadas. El aumento de RANKL fue de: 2,37 en Let7c, 3,68 en miR-100, 3,89 en miR-21, 1,78 en miR-139. La disminución de OPG fue de: 0,48 en Let7c, 0,69 en miR-100, 0,32 en miR-21 y 0,53 en miR-139.

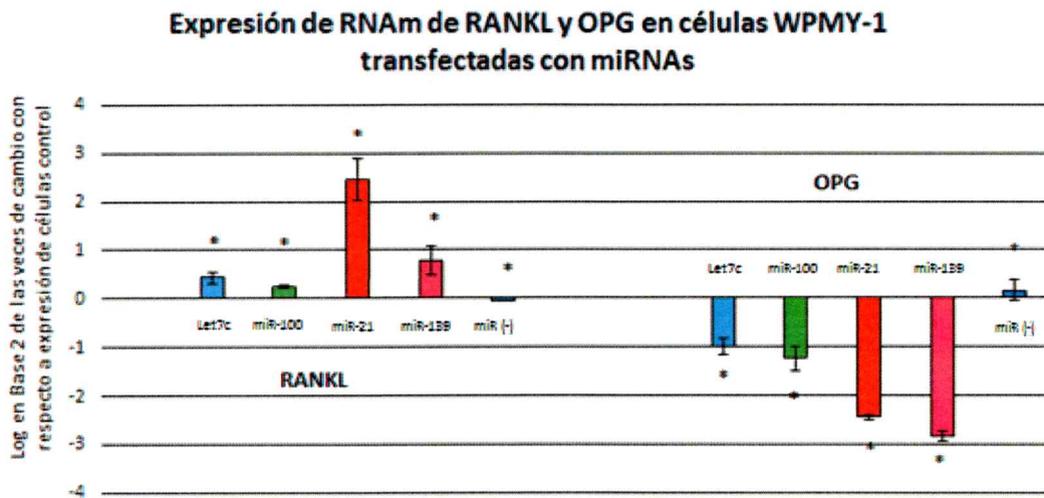


Figura 5: Efecto de la transfección de miRNAs imitadores en la expresión de RNAm de RANKL y OPG en células WPMY-1. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta\text{Ct}$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

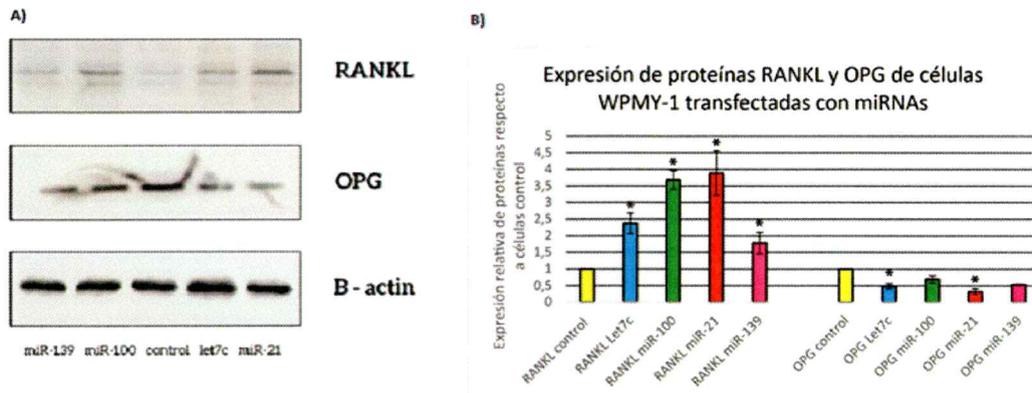


Figura 6: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de proteínas RANKL y OPG en células WPMY-1. A) Imagen representativa de un ensayo de western blot con las proteínas de células WPMY-1 transfectadas con miRNAs. En la parte inferior de la figura, se identifica el tratamiento realizado en las proteínas de cada carril. B) Las columnas en amarillo representan la expresión basal de proteínas, y las demás columnas la expresión de MMPs de células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar. (N =3). * = $p < 0, 05$ comparado con las células control.

2.3 Efecto en la expresión de otras proteínas relacionadas con la progresión tumoral

Se evaluó el efecto en la transfección de proteínas con un rol activo en la progresión tumoral y la generación de cambios en el nicho óseo. CatL, CatB, CatK son proteínas que ejercen acción en la remodelación de la matriz extracelular, de manera predominante en las células óseas. BMPR2, permite a las proteínas morfogenéticas óseas ejercer su acción, para el mantenimiento del recambio óseo. Col III es un componente estructural de la

matriz extracelular. IL-8, TGF- β 1 y AR cumplen un rol en la EMT y la generación del estroma reactivo.

Se evaluó el efecto en la transfección con miRNAs de la expresión del RNAm de CatB, IL-8 y TGF- β 1 (Figura 7) y AR, BMPR2 y CatL (Figura 8).

CatB, IL-8 y TGF- β 1 aumentaron su expresión a nivel de RNAm con respecto a las células control. En CatB se observó un aumento en la expresión de: 2,39 en let7c, 1,74 en miR-100, 3,94 en miR-21 y 3,31 en miR-139. IL-8 aumentó su expresión en: 3,08 en let7c, 0,57 en miR-100, 0,71 en miR-21 y 4,62 en miR139. TGF- β 1 aumentó su expresión de RNAm: 4,25 en let7c, 1,92 en miR-100, 4,23 en miR-21 y 2,63 en miR-139.

En el caso de AR, BMPR2 y CatL se observó una disminución de la expresión de RNAm con respecto a las células no transfectadas (Figura 8). AR: -3,06 en let7c, -2,02 en miR-100, -2,81 en miR-21 y -2,65 en miR-139. BMPR2: -4,27 en let7c, -2,88 en miR-100, -5,16 en miR-21 y -4,88 en miR-139. CatL: -1,0 en let7c, -2,29 en miR-100, -2,09 en miR-21 y -3,86 en miR-139.

La transfección con miRNA negativo, tuvo una diferencia de expresión no significativa con respecto a las células control: 0,38 en CatB, 0,36 en IL-8, 0,25 en TGFB-1, -0,08 en AR, 0,11 en BMPR2, -0,07 en CatL.

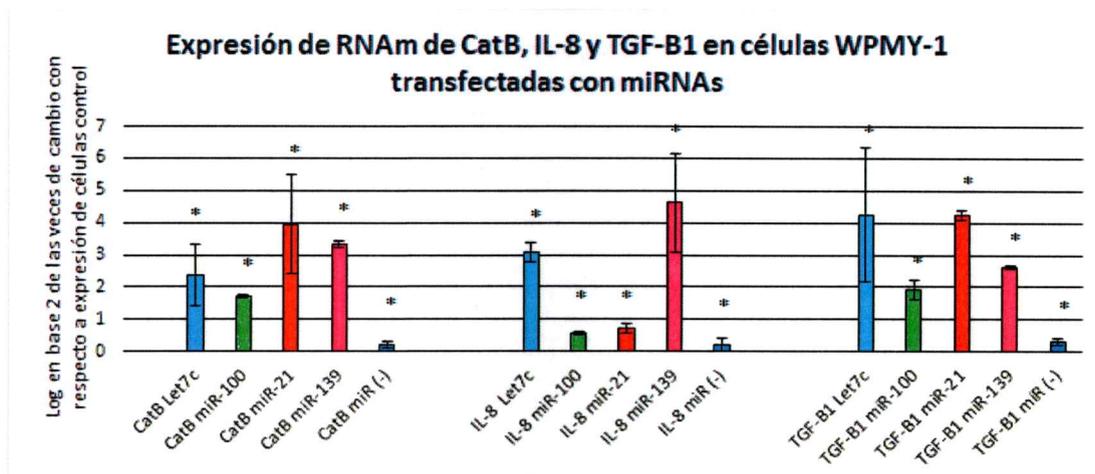


Figura 7: Efecto de la transfección de miRNAs imitadores en la expresión de RNAm de CatB, IL-8 y TGF-β1 en células WPMY-1. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

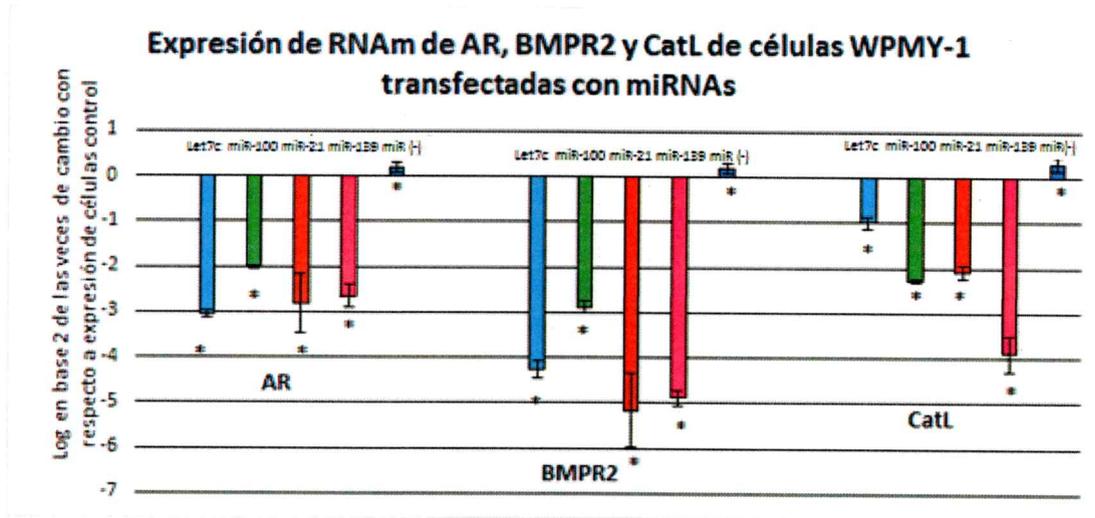


Figura 8: Efecto de la transfección de miRNAs imitadores en la expresión de RNAm de AR, BMPR2 y CatL en células WPMY-1. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

A nivel proteico se evaluó IL-8, Col III y CatK, proteínas implicadas en la progresión tumoral. Estas proteínas aumentaron su expresión con respecto a células no transfectadas. IL-8 fue de: 3,8 en Let7c, 1,23 en miR-100, 2,93 en miR-21 y 3,21 en miR-139. En el caso de Col III fue de: 1,14 en Let7c, 1,43 en miR-100, 5,62 en miR-21 y 2,17 en miR-139. Finalmente, en CatK fue de: 2,13 en Let7c, 1,47 en miR-100, 6,57 en miR-21 y 1,55 en miR-139. El aumento de la expresión proteica más significativo fue en la transfección con miR-21 en los 3 casos.

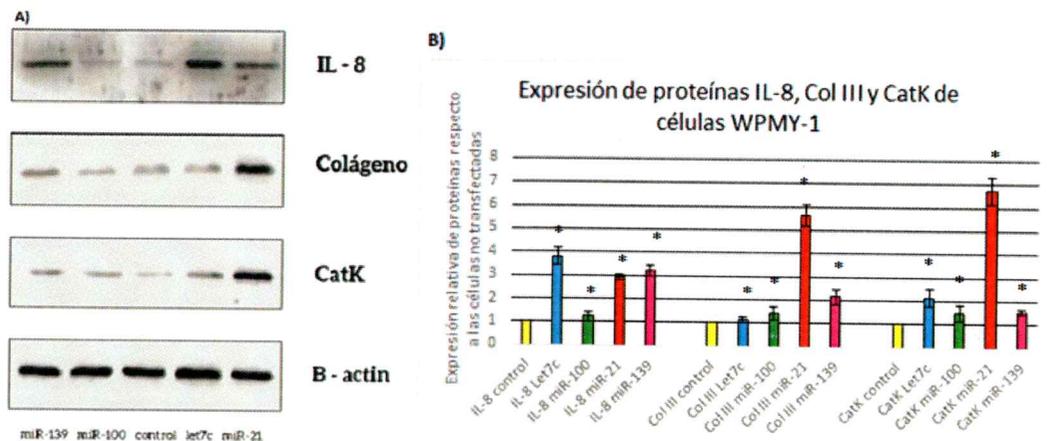


Figura 9: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de proteínas IL-8, Col III y CatK en células WPMY-1. A) Imagen representativa de un ensayo de western blot con las proteínas de células WPMY-1 transfectadas con miRNAs. En la parte inferior de la figura, se identifica el tratamiento realizado en las proteínas de cada carril. B) Las columnas en amarillo representan la expresión basal de proteínas, y las demás columnas la expresión de MMPs de células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar. (N=3). * = p < 0,05 comparado con las células control.

3) Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en células hFOB 1.19 con respecto a la expresión de proteínas relacionadas con la progresión tumoral.

Se evaluó el efecto de la transfección de miRNAs en las células hFOB 1.19, de expresión de moléculas vinculadas con la modificación del nicho óseo, a nivel de RNAm y proteínas.

3.1 Efecto de miRNAs en MMPs

Se evaluó el efecto de los miRNAs en osteoblastos a nivel de RNAm de MMPs de células hFOB 1.19 (Figura 10). Todas las MMPs aumentaron su expresión. En el caso de MMP-2 fue de: 1,61 en let7c, 2,7 en miR-100, 4,05 en miR-21 y 2,73 en miR-139. En MMP-9 fue de: 2,6 en let7c, 1,86 en miR-100, 4,65 en miR-21 y 2,03 en miR-139. En el caso de MMP-13 fue de: 1,98 en let7c, 2,63 en miR-100, 3,45 en miR-21 y 1,84 en miR-139. La transfección con miR-negativo fue: 0,24 en MMP-2, 0,25 en MMP-9 y 0,35 en MMP-13.

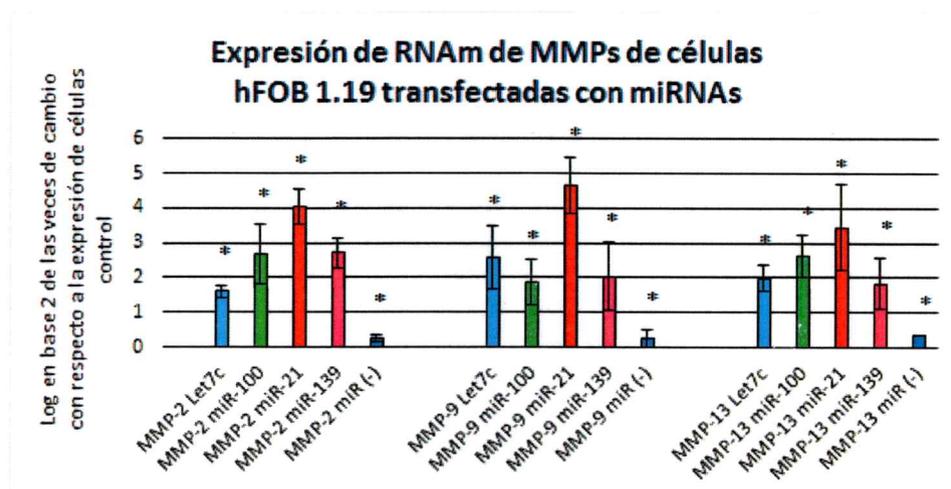


Figura 10: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de RNAm de MMPs en células hFOB 1.19. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta\text{Ct}$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

La transfección de miRNAs en células hFOB 1.19 provocó un aumento en la expresión proteica de MMPs con respecto a la expresión de células no transfectadas. En MMP-2 fue de: 2,13 en Let7c, 2,31 en miR-100, 10,86 en miR-21 y 1,76 en miR-139. En MMP-9 fue de: 4,87 en Let7c, 2,36 en miR-100, 16,89 en miR-21 y 8,81 en miR-139. En MMP-13 fue de: 2,11 en Let7c, 1,16 en miR-100, 5,39 en miR-21 y 4,31 en miR-139. El aumento más significativo fue en la proteína MMP-9 para todos los miRNAs en estudio. MiR-21 fue el que presentó un aumento más significativo en todas las MMPs analizadas.

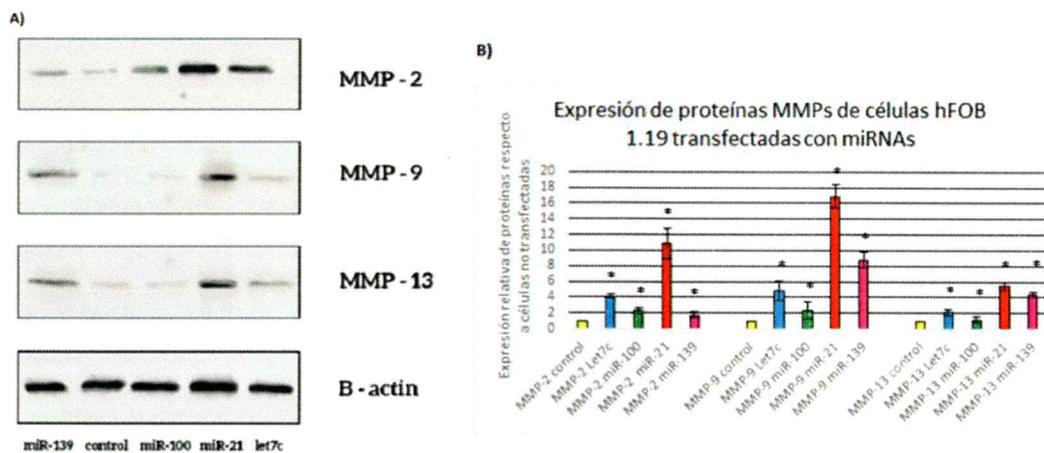


Figura 11: Efecto de la transfección de miRNAs imitadores en la expresión de RNAm de proteínas MMPs en células hFOB 1.19. A) Imagen representativa de un ensayo de western blot con las proteínas de células hFOB 1.19 transfectadas con miRNAs. En la parte inferior de la figura, se identifica el tratamiento realizado en las proteínas de cada carril. B) Las columnas en amarillo representan la expresión basal de proteínas, y las demás columnas la expresión de MMPs de células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar (N =3). * = p < 0, 05 comparado con las células control.

3.2 Efecto en la expresión de RANKL y OPG

Se evaluó la expresión de RNAm de RANKL y OPG en células hFOB 1.19 transfectadas con miRNAs (Figura 12). La transfección tiene un efecto biológico opuesto sobre la expresión de estas proteínas, similar a lo observado en las células WPMY-1. La expresión de RNAm de RANKL aumentó en las células transfectadas, mientras la expresión del RNAm de OPG disminuyó. El aumento de la expresión de RNAm de RANKL fue de: 0,52 en *let7c*, 0,89 en miR-100, 3,19 en miR-21, 2,29 en miR-139 y 0,29 en miR-negativo. La disminución de la expresión del RNAm de OPG fue de: 1,89 en *let7c* (observo un aumento de expresión), -1,76 en miR-100, -3,61 en miR-21, -3,32 en miR-139 y 0,12 en miR-negativo. El aumento más significativo de la expresión de RNAm de RANKL fue el la transfección con miR-21 y la disminución más significativa de la expresión de RNAm de OPG en las transfecciones con miR-139 y miR-21.

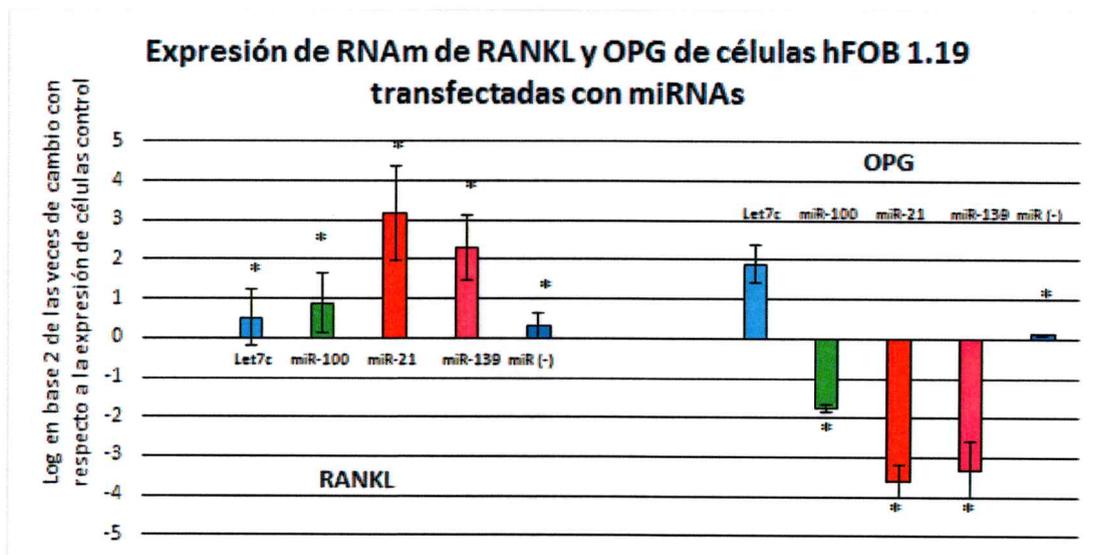


Figura 12: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de RNAm de RANKL y OPG en células hFOB 1.19. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

A nivel de proteínas RANKL y OPG mostraron un cambio de expresión similar al originado con la transfección de miRNAs en las células WPMY-1. RANKL aumentó su expresión proteica, mientras OPG disminuyó su expresión con respecto a las células no transfectadas. El aumento de RANKL fue de: 8,13 en Let7c, 7,81 en miR-100, 21,34 en miR-21 y 6,23 en miR-139. La disminución de OPG fue de: 0,22 en Let7c, 0,18 en miR-100, 0,14 en miR-21 y 0,48 en miR-139.

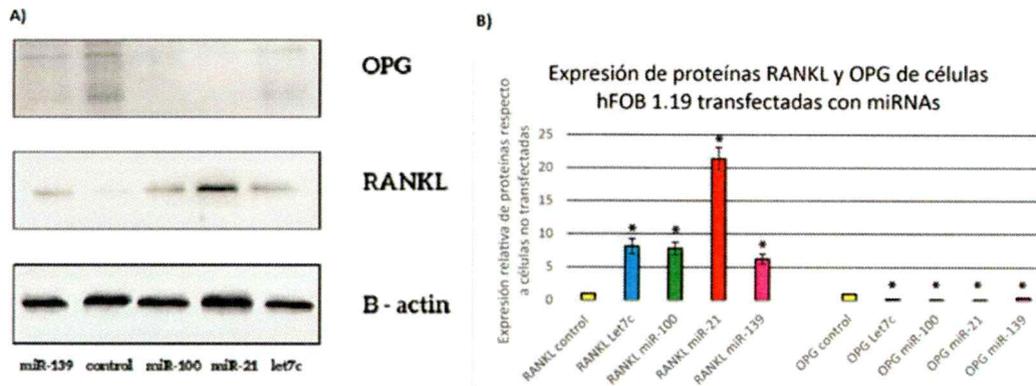


Figura 13: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de proteínas RANKL y OPG en células hFOB 1.19. A) Imagen representativa de un ensayo de western blot con las proteínas de células hFOB 1.19 transfectadas con miRNAs. En la parte inferior de la figura, se identifica el tratamiento realizado en las proteínas de cada carril. B) Las columnas en amarillo representan la expresión basal de proteínas, y las demás columnas la expresión de MMPs de células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar. N = 3 * = p < 0, 05 comparado con las células control.

3.3 Efecto en la expresión de otras proteínas relacionadas con la progresión tumoral

Se evaluó el efecto en la transfección de proteínas con un rol activo en la progresión tumoral y la generación de cambios en el nicho óseo. CatL, CatB y CatK son proteínas que ejercen acción predominante en las células óseas. BMPR2, permite a las proteínas morfológicas óseas ejercer su acción, para el mantenimiento del recambio óseo.

Se evaluó el efecto en la transfección con miRNAs de la expresión de CatB, CatL y TGF- β 1 (Figura 14) y AR, BMPR2 e IL-8 (Figura 15).

CatB, CatL y TGF- β 1 presentaron cambios en su expresión a nivel de RNAm con respecto a las células control. En CatB se observó una disminución en la expresión de: -2,92 en let7c, -3,52 en miR-100, -4,22 en miR-21 y -0,96 en miR-139. CatL y TGF- β 1 aumentaron su expresión de RNAm en la mayoría de las transfecciones. CatL aumento su expresión: 1,07 en let7c, 4,43 en miR-100, 4,27 en miR-21 y 3,54 en miR139. TGF- β 1 aumentó su expresión (con excepción de Let7c): -1,86 en let7c, 3,85 en miR-100, 4,48 en miR-21 y 2,33 en miR-139.

En el caso de AR, BMPR2 e IL-8 se observó una disminución de la expresión de RNAm con respecto a las células no transfectadas en AR, BMPR2 e IL-8, con la diferencia que en esta última se observó un aumento no significativo de miR-21 (Figura 15). AR disminuyó su expresión de RNAm: -1,23 en let7c, -5,35 en miR-100, -0,48 en miR-21 y -1,92 en miR-139. BMPR2 disminuyó su expresión de RNAm: -1,67 en let7c, -2,54 en miR-100, -4,82 en miR-21 y -6,11 en miR-139. IL-8 disminuyó su expresión de RNAm: -6,06 en let7c, -1,45 en miR-100, 0,098 en miR-21 y -5,24 en miR-139.

La transfección con miRNA negativo, tuvo una diferencia de expresión no significativa: 0,22 en CatB, 0,33 en CatL, 0,4 en TGF- β 1, 0,27 en AR, 0,23 en BMPR2, -0,03 en IL-8.



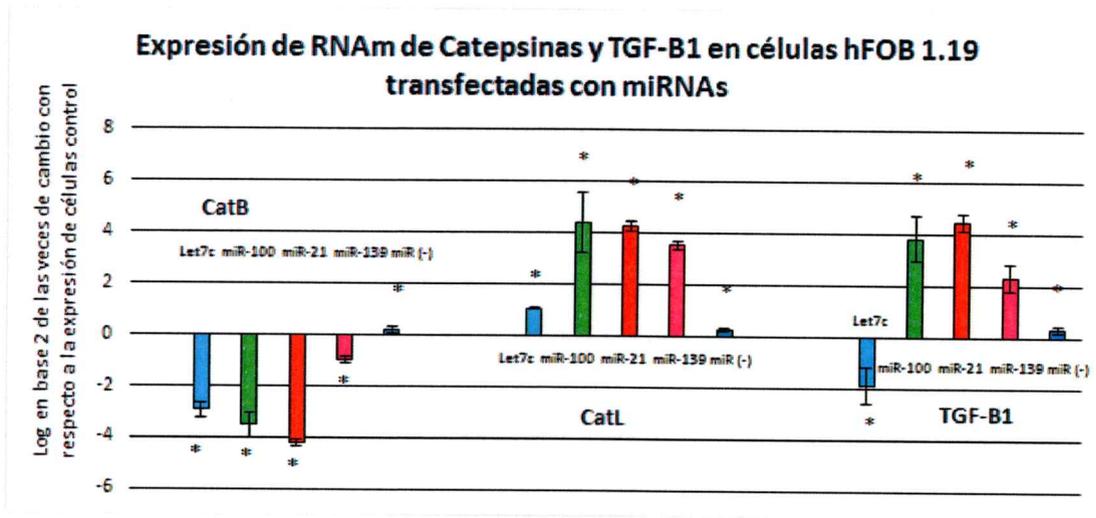


Figura 14: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de RNAm de Catepsinas y TGF-β1 en células hFOB 1.19. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

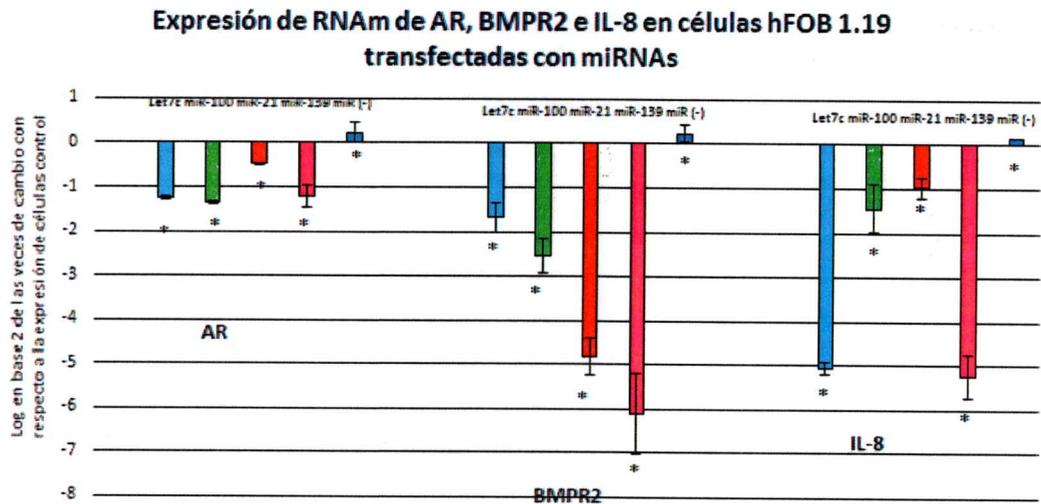


Figura 15: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de RNAm de AR, BMPR-2 e IL-8 en células hFOB 1.19. Las columnas muestran la expresión del RNAm de MMP de las células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo), miR-139 (rosado) y miR-negativo (azul). El tratamiento control son las células no transfectadas, su expresión se utilizó como basal y se normalizó como cero, por el método Log en base 2 del $\Delta\Delta C_t$ GAPDH. Las barras representan la desviación estándar (N =9). * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

A nivel de proteínas se evaluó IL-8 y CatK de células hFOB 1.19 transfectadas con miRNAs imitadores. Estas proteínas aumentaron su expresión con respecto a células no transfectadas. El aumento en la expresión de IL-8 fue de: 1,48 en Let7c, 1,38 en miR-100, 1,56 en miR-21 y 1,66 en miR-139. En el caso de CatK fue de: 1,12 en Let7c, 1,49 en miR-100, 3,41 en miR-21 y 2,83 en miR-139. Se observó un aumento significativo estadísticamente en IL-8 y CatK, para las células transfectadas con miR-21 y miR-139.

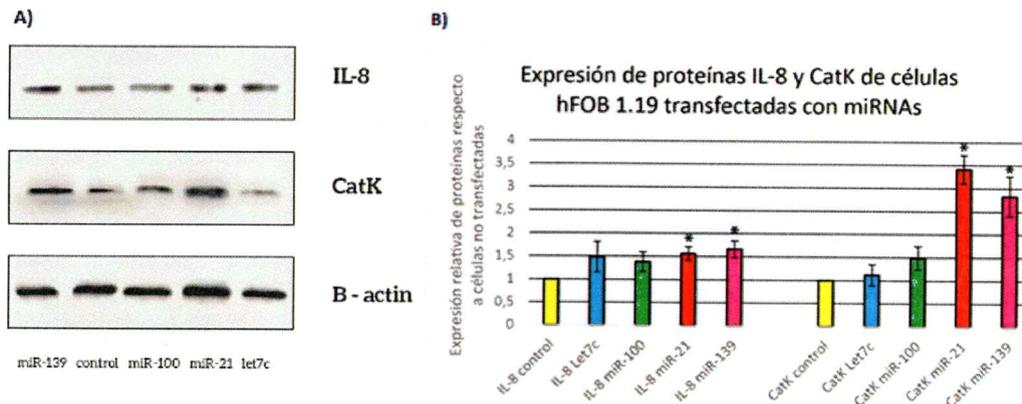


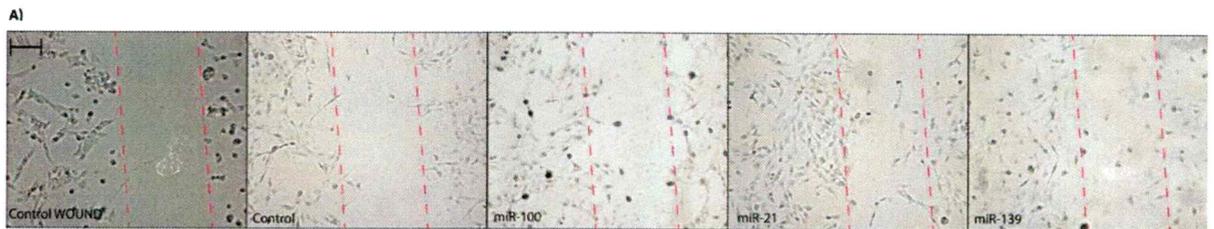
Figura 16: Efecto de la transfección de miRNAs en la expresión de proteínas IL-8 y CatK en células hFOB 1.19. A) Imagen representativa de un ensayo de western blot con las proteínas de células hFOB 1.19 transfectadas con miRNAs. En la parte inferior de la figura, se identifica el tratamiento realizado en las proteínas de cada carril. B) Las columnas en amarillo representan la expresión basal de proteínas, y las demás columnas la expresión de MMPs de células transfectadas con 1 miRNA: Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar. (N =3). * = $p < 0, 05$ comparado con las células control.

4) Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en la migración de células WPMY-1, mediante cierre de herida.

La capacidad de migrar de las células tumorales es necesaria para el establecimiento del tumor en un nuevo nicho metastásico. Las células que componen el estroma reactivo se han sindicado como fundamentales para el desarrollo de la EMT y la generación del nicho pre-metastásico. Es por esto, que medimos el efecto de los miRNAs en la capacidad de migrar de las células estromales de próstata. El ensayo fue realizado con la finalidad de

medir el efecto de los miRNAs en estudio sobre la capacidad migratoria de los fibroblastos de próstata (WPMY-1).

Se realizó el ensayo de cierre de herida con células WPMY-1 transfectadas con miRNAs 24 horas antes. Cinco mil células fueron sembradas en cada pocillo, donde se realizó una herida con una punta p200. Se analizó el desplazamiento celular 24 horas post-herida. La transfección con Let7c, no fue cuantificada en la herida, ya que las células transfectadas con este miRNA han demostrado menor capacidad de adherencia en los cultivos. El aumento en la invasividad de células WPMY-1 transfectadas con miRNAs fue de: 49% en miR-100, 238,56% en miR-21 y 84,75% en miR-139.



B)

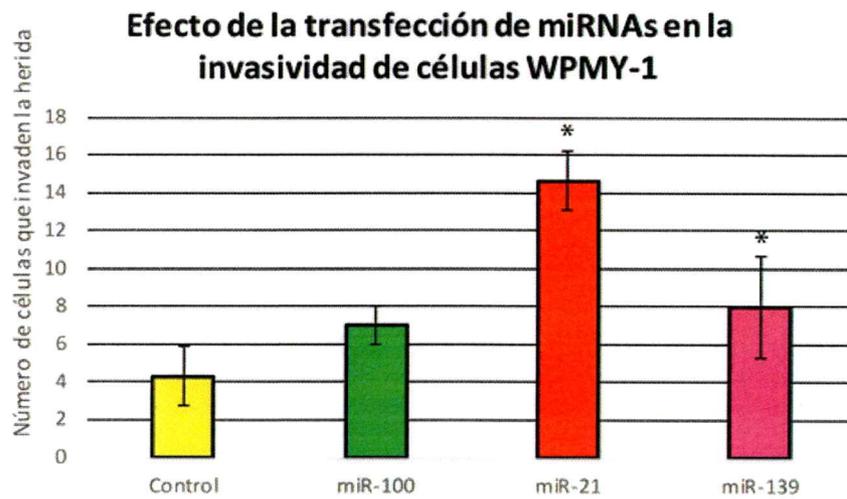
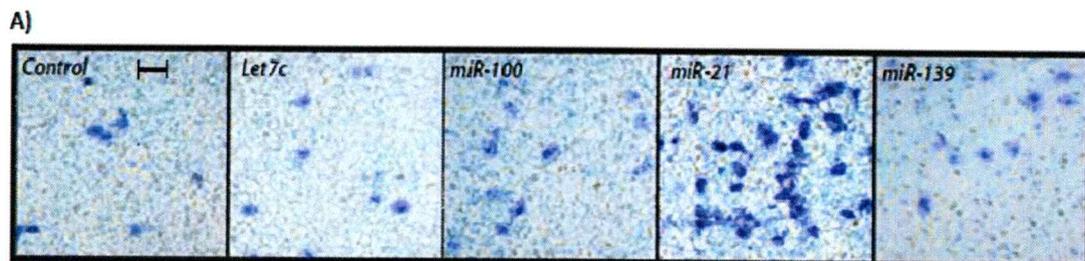


Figura 17: Efecto de la transfección de miRNA en la invasividad de las células WPMY-1. A) Figura representativa del experimento de cierre de herida. Las líneas rosa indican los límites de la herida a tiempo cero. (Imagen de la izquierda, Control Wound). La barra de tamaño indica 100 μm . B) Cuantificación de la capacidad de invasión de células WPMY-1. La columna amarilla representa la capacidad relativa basal de las células WPMY-1 control, miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). Las barras representan la desviación estándar. N=3 * = $p < 0,05$ comparado con las células control.

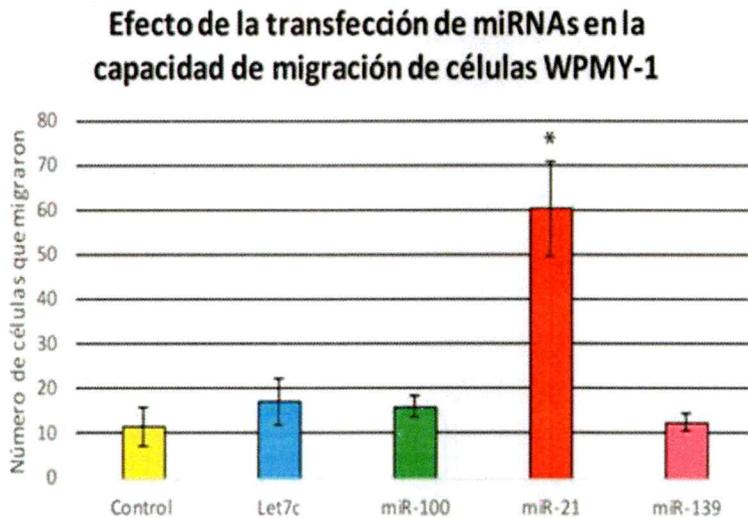
5) Efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de células de CaP en la capacidad de migración de células WPMY-1, mediante Transwell.

La capacidad de migrar de las células tumorales es una característica necesaria al momento de la progresión tumoral. Los fibroblastos que componen el estroma reactivo, presentan una mayor capacidad de migración, que los fibroblastos normales de próstata.

Se evaluó el efecto de miRNAs sobreexpresados de exosomas de CaP en la migración de fibroblastos normales de la próstata 48 horas post-transfección. El conteo de las células se realizó por microscopía de campo claro 40X. En todas las células transfectadas se observó un cambio en el número de células que migran en comparación con el control, pero sólo miR-21 mostró un aumento estadísticamente significativo. El aumento en la capacidad migratoria de las células con la transfección de cada miRNA ocurrió para la transfección con let7c y miR-21, y un aumento menor en miR-100 y miR-139. El cambio en la capacidad migratoria de los fibroblastos para cada transfección fue de: 47,8% en Let7c, 39,13% en miR-100, 423,91% en miR-21 y 8,7% en miR-139.



B)



C)



Figura 18: Efecto de la transfección de miRNAs en la invasividad de las células WPMY-1. Se evaluó el número de células capaces de migrar por quimioatracción, a través del transwell 48 horas post siembra. A) Imagen representativa del ensayo de migración a las 48 horas post siembra. La barra representa un tamaño de 100 μm . B) Número de células que migraron por campo. La columna amarilla representa la capacidad relativa basal de las células WPMY-1 control, Let7c (celeste), miR-100 (verde), miR-21 (rojo) y miR-139 (rosado). $N=3$. La barra representa la desviación estándar. $* = p < 0,05$ comparado con las células control. C) A mayor aumento microscópico, se observa un mayor número de proyecciones citoplasmáticas en las células, favoreciendo la interacción con el medio extracelular.



DISCUSIÓN

En el presente estudio se caracterizó el efecto de los miRNAs sobreexpresados en exosomas de CaP, miR-100, miR-21 y miR-139, junto a let7c como control positivo, en targets que contribuyen a la progresión tumoral y preparación de la metástasis del CaP, en células WPMY-1 y hFOB 1.19. En un estudio previo, se caracterizó la población de miRNAs presentes en los exosomas de tumores primarios de CaP (bulk) y exosomas derivados de cultivos enriquecidos con CSC. Se identificaron 990 miRNAs conocidos con expresión diferencial en un grupo reducido de ellos. El contenido de miRNA diferencial, podría desencadenar un efecto sobre el microambiente. El miRNA más abundante fue miR-100-5p y miR-21-5p, mientras que miR-139-5p se encontró sobreexpresado en CSC (Sánchez et al., 2016 b). En base a estos resultados, se transfectó miRNAs mimics miR-100, miR-21, miR-139 y let7c en células que normalmente habitan en el tumor primario (WPMY-1) y en el nicho pre-metastásico (hFOB 1.19), con el fin de observar el efecto en targets que influirían en la EMT, la remodelación de la matriz extracelular y la generación de un nicho metastásico óptimo.

Las metaloproteinasas de matriz (MMPs) desempeñan un importante rol en la progresión del cáncer; promueven principalmente, la invasión y la angiogénesis (Khamis et al., 2016 a). La EMT es inducida por las MMPs que se activan en el nicho pre-metastásico. También modulan los mediadores de la inflamación, tales como citoquinas y quimioquinas. Facilitan la migración de las células epiteliales, mediante la interacción con éstas y las proteínas de la matriz extracelular, a través de la proteólisis de la misma matriz o de las proteínas de adhesión de tejidos, tales como E-cadherinas (Arvelo et al., 2016 b).

En el estudio se examinó el efecto de miRNAs imitadores en la expresión de MMP-2, MMP-9 y MMP-13, todas ellas presentaron un aumento en la expresión a nivel de RNAm y proteínas, con respecto a células no transfectadas en ambas líneas celulares estudiadas (Fig 3, 4, 10 y 11). Un análisis de los niveles de expresión de MMP-2 concluyó que se expresa altamente en pacientes con CaP, en comparación con pacientes que presentan hiperplasia prostática benigna, además los niveles de expresión se correlacionan estrechamente con la puntuación de Gleason y estadios clínicos en pacientes con CaP (Xie et al., 2016). MMP-2 juega un rol en la angiogénesis y se sobreexpresa en condiciones de hipoxia. Su expresión promueve la invasión tumoral, la metástasis y el comportamiento agresivo asociado a los tumores. Por otra parte, la inhibición de MMP-2, se ha demostrado que causa sensibilidad a la radiación, una disminución en el crecimiento del tumor y la invasividad (Panth et al., 2016). MMP-9 activa TGF- β , lo que deriva en un aumento en la proliferación tumoral (Khamis et al., 2016 b). La alta expresión de MMP-9 en metástasis de hígado y pulmón, reestructura la matriz extracelular, lo que contribuye a la generación del nicho pre-metastásico (Devitt Møller et al, 2011). Un análisis de pacientes con cáncer de vejiga en comparación con individuos sanos, demostró un incremento significativo en la expresión proteica de MMP-9 (Zeng et al., 2016). En cáncer de mama y ovario, la sobreexpresión de las proteínas MMP-2 y MMP-9, se correlaciona con una baja supervivencia y es un indicador del aumento en la capacidad de difusión de las células cancerosas (Sainio & Järveläinen, 2014; González et al., 2008). La proteína MMP-9 resulta ser un factor crítico en la generación del nicho metastásico, fomentando la liberación de VEGF y la migración celular in vitro (Kaplan et al., 2005). Entre las funciones de MMP-2 y MMP-9 en el microambiente óseo se encuentra participar en el

reclutamiento de precursores de osteoclastos, en la diferenciación de los osteoclastos durante el desarrollo y crecimiento de los tejidos normales, además su actividad fomenta la liberación de RANKL (Krane & Inada, 2008). La proteína MMP-13 degrada la matriz extracelular, promueve la angiogénesis y actúa como mediador del estroma, promoviendo la progresión tumoral en el cáncer de piel y nasofaríngeo. En células de cáncer nasofaríngeo, se silenció la expresión de MMP-13 y se observó una disminución de esta proteína en las células y en los exosomas liberados de estas células (You et al., 2015). MMP-13 se expresa de manera muy restringida en condiciones normales, pero se observa una sobreexpresión en cáncer y artritis. En cáncer hepático MMP-13 potencia la metástasis, y la inhibición de MMP-13 proporcionaría una estrategia terapéutica potencial (Jin et al., 2015; Kessenbrock et al., 2010).

El aumento de MMPs en las células WPMY-1 y hFOB 1.19 se relacionaría con la generación del estroma reactivo y en el nicho pre-metastásico.

La regulación de la matriz extracelular está mediada, también por la familia de proteínas Catepsinas. Se estudió las Catepsinas K, L y B. En células WPMY-1 transfectadas CatB aumentó su expresión a nivel de RNAm (Fig. 7) y CatK aumentó a nivel de proteínas (Fig. 9), mientras que CatL disminuyó su expresión a nivel de RNAm (Fig. 8). En células hFOB 1.19 transfectadas ocurrió lo opuesto a nivel de RNAm, aumentó la expresión de CatL (Fig. 14) y disminuyó la expresión de CatB (Fig. 14), a nivel de proteínas CatK mostró un aumento en la expresión (Fig. 16). Las catepsinas cisteína CatK, CatL y CatB, son secretadas como enzimas solubles en entornos pericelulares, donde permanecen completamente activas, por lo que su efecto es más rápido que el de otras catepsinas. CatK

está implicada en la remodelación ósea, la progresión del cáncer de mama y otros cánceres. Está presente en la mayoría de los tejidos epiteliales y ambientes extracelulares como una enzima soluble. Estudios en el cáncer de mama sugieren que CatK participa en la disfunción plaquetaria, que puede representar un mecanismo específico que impulsa a las células diana a expresar la señalización transmembrana desencadenantes de procesos de inflamación o el cáncer (Andrade et al., 2016). Los osteoblastos humanos secretan Cat B, K y L, que activan proteolíticamente otras proteasas secretadas a la matriz extracelular, de manera paracrina, además ejercen un efecto en la adhesión celular (Staudt et al., 2012). Estudios clínicos de diversos tipos de tumores, han demostrado que ciertas catepsinas como CatB, se suministran al tumor por las células del estroma y no por los osteoblastos (Gocheva et al., 2010). Esto podría explicar el aumento de CatB en Células WPMY-1.

La matriz extracelular es un componente principal del estroma tumoral, se presenta como un regulador clave de la función celular y tisular. Tradicionalmente, la matriz extracelular ha sido considerada como un andamio físico, donde se unen las células y se fomentan las interacciones. Presenta cambios estructurales en la progresión tumoral, aumentando los niveles de fibronectina, proteoglicanos y colágenos tipo I, III y IV (Fang et al., 2014). En la transfección de células WPMY-1 con miR-21, se observa un aumento significativo de colágeno tipo III a nivel de expresión proteica (Fig. 9). MMPs pueden degradar el colágeno, exponiendo sitios activos que generen un microambiente pro-tumorigénico, facilitando la progresión del tumor.

Al transfectar las células WPMY-1 (Fig. 5 y 6) y hFOB 1.19 (Fig. 12 y 13) con los miRNAs, se observó un aumento en la expresión de RANKL y una disminución de OPG

a nivel de RNAm y proteínas. RANKL es un miembro de la superfamilia de factor de necrosis tumoral. Se une a su receptor RANK e inicia una serie de respuestas específicas dependiendo del órgano. En el hueso media la formación y la actividad de los osteoclastos (Hein et al., 2014). RANKL se expresa en los osteoblastos activados, de modo que el contacto estrecho entre los osteoclastos y los osteoblastos, permite la unión de RANKL con su receptor RANK. Experimentos con líneas tumorales de cáncer de células escamosas de cabeza y cuello, muestran una alta expresión de RANKL que promueve la adhesión celular al colágeno, pero no se encontraría implicado en la promoción de la invasión celular, la migración, y el crecimiento celular *in vitro*. Estos resultados sugieren el papel inducido por RANKL en la tumorigénesis *in vivo* de cáncer de cabeza y cuello. En CaP RANKL es sindicado como un factor de riesgo potencial, influyente en el pronóstico clínico (Yamada et al., 2016 b). RANKL se sobreexpresa en metástasis ósea de CaP y de mama, donde es dependiente del estroma de la médula (Mori et al., 2007). Tumores de metástasis ósea de cáncer de mama muestran un aumento de expresión de RANKL y disminución del receptor señuelo de RANK, OPG, que se asocia con sobrevida libre de progresión muy baja (Santini et al., 2011). En CaP la expresión epitelial de RANKL transmite las ventajas de la activación de los osteoclastos en el microambiente de la médula. La EMT se asoció a la sobreexpresión de RANKL en experimentos con líneas celulares ARCaP y LnCaP (Odero-Narah et al., 2008). La transfección de WPMY-1 provocó un aumento en la expresión de RANKL. Las células hFOB 1.19 fueron cultivadas a condiciones restrictivas (osteoblastos inmaduros) con bajos niveles RANKL y mayores niveles de OPG. Se obtuvo un aumento de RANKL y una disminución de OPG, por lo que se sugiere que los miRNAs transfectados, permitirían la maduración de los

osteoblastos. Para la comprobación de la maduración de osteoblastos, son necesarias pruebas complementarias. Como el análisis de marcadores de diferenciación, tales como Sox-9 y RUNX2.

El aumento en la expresión de TGF- β 1 por las células tumorales, también se correlaciona con la progresión tumoral en cáncer de pulmón, colorrectal, y gástrico (Ziaee et al., 2015 b). Muchas células sintetizan TGF- β y casi todas ellas tienen receptores específicos para reconocerlo. Al transfectar las células WPMY-1 (Fig. 7) y hFOB 1.19 (Fig. 14) se obtuvo un aumento de expresión de la proteína TGF- β 1. TGF- β regula a las proteínas MMPs y genera una cascada de señalización aguas abajo, que mejora la degradación de la matriz extracelular. La señalización de TGF- β en los fibroblastos, es regulada por epitelios tumorales adyacentes, que promueven el CaP (Smith & Bhowmick, 2016 a). El TGF- β procedente de la masa tumoral, tiene un potente efecto sobre la respuesta inmune celular anti-tumoral a nivel local. Los pacientes con altos niveles de TGF- β en suero tienen una respuesta menor a los tratamientos, que aquellos con niveles más bajos (Maitland, 2015). TGF- β 1 tendría un rol predominante en la generación del estroma reactivo. En un estudio realizado con células madre mesenquimales derivadas de la médula, se analizó la posible influencia de los exosomas de CaP en modificar las células mesenquimales y diferenciarlas a células con características de miofibroblastos. Se demostró que los exosomas desempeñaban un papel en el control de las células madre mesenquimales derivadas de médula ósea, a la diferenciación de miofibroblastos, a través de un mecanismo dependiente de TGF- β 1. Estas células diferenciadas aumentaron la producción de VEGF y MMPs. Por lo tanto, exosomas de CaP podrían dictar el destino

de las células madre mesenquimales que habitan el nicho pre-metastásico de una manera dominante, generando células con características miofibroblásticas promotoras de tumores. Al agregar un inhibidor de TGF- β 1 junto con los exosomas, la diferenciación a células positivas a α actina de músculo liso (marcador de células miofibroblásticas) no se desencadenaba (Chowdhury et al, 2015 b), demostrando la importancia de TGF- β 1 en la mioidiferenciación. Otro estudio de diferenciación a células miofibroblásticas fue realizada con fibroblastos primarios, donde se demostró que los exosomas de CaP y otros cánceres, realizaban la diferenciación a células con características miofibroblásticas, proceso que podría explicar la generación de fibroblastos activados asociados a cáncer (CAF). Este proceso de diferenciación, también es dependiente de un alto contenido de TGF- β 1 (Webber et al, 2010).

En las células del estroma las señales de andrógenos/AR pueden estimular la mioidiferenciación (Wen et al, 2015). En las células WPMY-1 ocurrió una disminución de la expresión de RNAm de AR (Fig. 8), mientras que en hFOB 1.19 (Fig. 15) la disminución fue menor y en miR-21 la diferencia de expresión con las células control fue poco significativa. Los osteoblastos humanos no expresan AR de forma constitutiva, por lo que la maduración de osteoblastos puede ser el gatillante de esta disminución. El AR se demostró que es influyente en la progresión metastásica de CaP, a través de la convergencia de la señal aguas abajo con receptor de quimioquinas y los receptores acoplados a proteína G. En un comienzo, el tumor primario es dependiente de AR epitelial, luego al comenzar la progresión tumoral se hace independiente de él. Para definir el efecto de los miRNAs en AR, es necesario estimular las células con andrógenos, fundamental

para su activación (Smith & Bhowmick, 2016 b). Por lo que los resultados de este experimento no son concluyentes.

El desarrollo de la metástasis ocurre en un sitio definido, junto con la formación del nicho pre-metastásico, deben secretarse sustancias atrayentes hacia dicho sitio. IL-8 es una citoquina multifuncional, que se identificó originalmente como una proteína de neutrófilos quimioatrayente. IL-8 puede ser secretada por diferentes tipos de células, incluyendo linfocitos, neutrófilos, macrófagos y células tumorales. Se identificó un aumento de IL-8 en cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de vejiga y CaP. Células infiltrantes y tumorales pueden aumentar aún más el nivel de IL-8, que jugaría un papel clave en la progresión del tumor, por su capacidad de influir en la proliferación, invasión y angiogénesis de tumores (Ou et al., 2015). En nuestro estudio se identificó un aumento significativo en los niveles de expresión de RNAm y proteínas IL-8, en células WPMY-1 (Fig. 7 y 9) y una disminución en los niveles de RNAm de IL-8 en células hFOB 1.19 (Fig. 15). El efecto de IL-8 se ejercería en las células cancerosas que migren hacia el sitio de metástasis, por lo que se esperaría encontrar un aumento en el microambiente del nicho primario, como es el caso del estroma prostático.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs), ejercerían un papel en los sitios de metástasis del CaP. BMP-7 suprime el crecimiento de CSC, en estudios de enriquecimiento de prostatosferas de CaP inhibe la formación de esferas. BMP-7 secretada a partir de células estromales de la médula, juega un papel en la latencia del tumor, suprimiendo el crecimiento de las CSC en el entorno del hueso, por lo que actuaría como un supresor de tumor que necesita del receptor BMPR2 para su acción. En un estudio la disminución de

BMPR2 atenuó significativamente los niveles de BMP-7. También se confirmó que la caída de BMPR2 interrumpe la señalización de BMP-7 *in vitro* (Kobayashi et al., 2011). BMP7 se expresa a un mayor nivel en las células estromales de la médula, que en las células de cáncer de próstata. En las células WPMY-1 (Fig. 8) y hFOB 1.19 (Fig. 15) transfectadas con miRNAs ocurrió una disminución de la expresión de RNAm de BMPR2. Hemos identificado que los miRNAs tienen un efecto en moléculas claves en la progresión tumoral y desarrollo del nicho pre-metastásico. Aunque los 4 miRNAs estudiados mostraron un efecto, los cambios más significativos se observaron con miR-21, que se pronuncian al observar los ensayos de invasividad (Fig. 17) y migración celular (Fig. 18). Estos miRNAs se encuentran en una baja expresión en las células WPMY-1 y hFOB 1.19, con respecto a las CSC y las Bulk. El empaquetamiento de los miRNAs en los exosomas, puede ser también, un mecanismo de eliminación debido a su alto contenido celular. Por lo que una alta expresión de un miRNA en exosomas tumorales, no necesariamente se relaciona con malignidad.

MiR-21 es uno de los miRNAs ampliamente estudiados, ya que se sobreexpresa en casi todos los tumores humanos y se considera un oncogén implicado en la apoptosis, necrosis, invasión, proliferación y angiogénesis (Peralta-Zaragoza et al, 2016). miR-21 es un biomarcador no específico, para la detección temprana del cáncer, ya que no sería capaz de distinguir tumores malignos de lesiones benignas no cancerosas (Chen H, et al 2016). Un aumento en los niveles de expresión de miR-21, generados por transfección con miRNAs, en células endoteliales, promovió la migración y la formación de tubos, además inhibió la proteína TIMP-3 (inhibidor de MMPs), que generó un aumento en la expresión

de MMP-2 y MMP-9. La inhibición de miR-21 por un antagonista mir-21, suprimió este efecto, manteniendo alto los niveles de TIMP-3 (Hu J et al., 2016). En el CaP, miR-21 promueve el crecimiento tumoral de manera dependiente o independiente de andrógenos (Rivas J. et al, 2009) y la EMT (Coppola et al, 2013).

En varios tipos de cáncer se ha encontrado la expresión desregulada de miR-100, que puede actuar como un oncomiR o un supresor de tumor (Chen P. et al, 2014). MiR-100 induciría la EMT en cáncer de mama (Chen D. et al, 2014 b), también se encuentra sobreexpresado en cáncer gástrico y leucemia mieloide (Li X. et al, 2011), actuando como un oncomiR. Mientras, que en células de cáncer de vejiga, actúa disminuyendo la viabilidad celular (Blick et al, 2013) y en líneas celulares de cáncer de colon resistente, sensibiliza las células y las hace vulnerables a la radioterapia (Yang et al, 2015), actuando en ambos casos como supresor de tumores.

En el caso de miR-139, este miRNA es identificado principalmente como supresor tumoral en varios tipos de cáncer. Una regulación baja de miR-139 se asocia con un mal pronóstico de pacientes con cáncer hepático y una sobreexpresión activa de genes apoptóticos en cáncer de esófago de células escamosas (Liu et al, 2013). Nuevos blancos son necesarios para definir las vías en las que interviene miR-139 que aún no han sido aclaradas, aunque es conocido su papel en la diferenciación ósea, los blancos específicos no se han sido identificados específicamente (Krishnan et al, 2013).

Los ensayos funcionales, muestran un aumento en la capacidad de migrar y de invadir tejidos, de las células WPMY-1. Este efecto no sólo debe atribuirse a este hecho, ya que

la proliferación puede alterarse al transfectar con los miRNAs. Ensayos de proliferación, aclararían el efecto de los fenómenos.

El presente estudio tuvo como finalidad caracterizar el efecto en líneas celulares WPMY-1 y hFOB 1.19, de un grupo de 3 miRNAs sobreexpresados en exosomas de CaP primario y exosomas de CSC derivadas de CaP. El efecto provocado a nivel celular por los exosomas, es un efecto cooperativo y sinérgico de todos los componentes que pertenecen a los exosomas, pero se logró evidenciar que solo un miRNA genera cambios moleculares en las células que normalmente habitan el microambiente del tumor primario y el nicho pre-metastásico, que favorecerían la progresión y metástasis.

Conclusiones

Se caracteriza el efecto de los miRNAs imitadores, sobreexpresados en exosomas de CaP en las células WPMY-1 y hFOB 1.19, provocando cambios en los niveles de expresión de RNAm y proteínas que fomentan la progresión tumoral y el establecimiento del nicho pre-metastásico. En células WPMY-1 se observó un aumento de la capacidad de migración y de la invasividad de los fibroblastos de próstata, características clave en la EMT y el CaP avanzado, etapas que se potencian con la generación del estroma reactivo.

Es imperante comprobar si la transfección de estos miRNAs genera efectivamente osteoblastos maduros y fibroblastos activados, lo que será investigado en los siguientes estudios. Se verifica el potencial como diagnóstico o diana terapéutica de miR-21. La relación de la sobreexpresión de miR-100 y miR-139 en los exosomas de CaP y su potencial uso como blanco terapéutico es más reservado y sujeto a estudios.

BIBLIOGRAFÍA

- Adisetiyo H. et al. 2014.** Dependence of castration-resistant prostate cancer (CRPC) stem cells on CRPC-associated fibroblasts. *J Cell Physiol* 229:1170–1176.
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2015.*** Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2015.
- Andrade S. et al. 2016.** Cathepsin K induces platelet dysfunction and affects cell signaling in breast cancer - molecularly distinct behavior of cathepsin K in breast cancer. *BMC Cancer*, 16, 173.
- Arvelo R. et al. 2016.** Tumour progression and metastasis. *Ecancermedicallscience*, 10: 610-617.
- Azmi AS. et al. 2013.** Exosomes in cancer development, metastasis, and drug resistance: a comprehensive review. *Cancer metástasis Rev* ; 32: 623-642.
- Baietti MF. et al. 2012.** Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes. *Cell Biol Nat.* 2012; 14: 677-685.
- Barve A. et al. 2014.** Prostate Cancer Relevant Antigens and Enzymes for Targeted Drug Delivery. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society. J Control Release* 187: 118-132.
- Blick C. et al. 2013.** Hypoxia regulates FGFR3 expression via HIF-1 α and miR-100 and contributes to cell survival in non-muscle invasive bladder cancer. *British Journal of Cancer*, 109(1), 50–59.
- Boyce BF & Xing L. 2008.** Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys* 473: 139–146.
- Cai X. et al. 2004.** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10:1957–1966.
- Cammarota F. & Laukkanen, M. O. 2016.** Mesenchymal Stem/Stromal Cells in Stromal Evolution and Cancer Progression. *Stem Cells International*, 4824573.
- Castellón EA. et al. 2012.** Molecular signature of cancer stem cells isolated from prostate carcinoma and expression of stem markers in different Gleason grades and metastasis. *Biol Res* 45: 297-305.
- Camussi G. et al. 2010.** Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* 78: 838–848.
- Chang TC. et al. 2008.** Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40:43-50.
- Chen D. et al. 2014.** miR-100 Induces Epithelial-Mesenchymal Transition but Suppresses Tumorigenesis, Migration and Invasion. *PLoS Genetics*, 10:2, e1004177.
- Chen G. et al. 2006.** Expression of RANKL/RANK/OPG in primary and metastatic human prostate cancer as markers of disease stage and functional regulation. *Cancer* 107: 289–298.
- Chen H. et al. 2016.** Evaluation of Plasma miR-21 and miR-152 as Diagnostic Biomarkers for Common Types of Human Cancers. *Journal of Cancer*, 7(5), 490–499.
- Chen P. et al. 2014.** Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Med Oncol.* 31:235.
- Cheng L. et al. 2014.** Exosomes provide a protective and enriched source of miRNA for biomarker profiling compared to intracellular and cell-free blood. *Journal of Extracellular Vesicles.* 3

- Chowdhury R. et al. 2015.** Cancer exosomes trigger mesenchymal stem cell differentiation into pro-angiogenic and pro-invasive myofibroblasts. *Oncotarget*. 6:715-731.
- Clark et al. 2013.** A bioengineered microenvironment to quantitatively measure the tumorigenic properties of cancer-associated fibroblasts in human prostate cancer. *Biomaterials*. 34:4777-4785.
- Collins AT. et al. 2005.** Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res*. 65:10946-10951.
- Coppola V. et al. 2013.** BTG2 loss and miR-21 upregulation contribute to prostate cell transformation by inducing luminal markers expression and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 32: 1843-1853.
- Costa-Silva B. et al. 2015.** Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat Cell Biol*.17:816-826.
- Cunha GR. 2008.** Mesenchymal-epithelial interactions: Past, present, and future. *Differentiation* 76: 578-586.
- Devitt Møller H. et al 2011.** Role of Fibulin-5 in Metastatic Organ Colonization. *Mol Cancer Res* 9:553-563.
- Dey N. et al. 2012.** microRNA-21 Governs TORC1 Activation in Renal Cancer Cell Proliferation and Invasion. *PLoS ONE*, 7(6), e37366.
- Elmageed ZY. et al. 2014.** Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells* 32:983-997.
- Eulalio A. et al. 2008.** Getting to the root of miRNA-mediated gene silencing. *Cell* 132:9-14.
- Fang M. et al. 2014.** Collagen as a double-edged sword in tumor progression. *Tumour Biology*, 35(4), 2871-2882.
- Fiaschi T. et al. 2012.** Reciprocal metabolic reprogramming through lactate shuttle coordinately influences tumor-stroma interplay. *Cancer Res*.72:5130-5140.
- Fidler IJ. 1970.** Metastasis: quantitative analysis of distribution and fate of tumor emboli labeled with 125 I-5-iodo-2'-deoxyuridine. *J Natl Cancer Inst*.45:773-82.
- Florencio-Silva, R. et al. 2015.** Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed Research International*, 2015, 421746.
- Gay L. et al. 2016.** Tumour Cell Heterogeneity. *F1000Research*, 5, F1000 Faculty Rev-238.
- Guise T. 2010.** Examining the metastatic niche: targeting the microenvironment. *Semin Oncol*. 37: S2-S14.
- Globocan IARC. 2014.** Estimate cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012.
- Gocheva, V et al. 2010.** IL-4 induces cathepsin protease activity in tumor-associated macrophages to promote cancer growth and invasion. *Genes & Development*, 24(3), 241-255.
- Gonzalez et al. 2008.** Study of matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in ductal in situ carcinomas of the breast. *Histopathology*.53:403-415.
- Hägglöf C. & Bergh A. 2012.** The Stroma—A Key Regulator in Prostate Function and Malignancy. *Cancers*, 4: 531-548.
- Han J. et al. 2004.** The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev* 18:3016-3027.
- Hanahan D. & Weinberg RA. 2011.** Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-674
- Hanahan D. & Coussens LM. 2012.** Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell* 21:309-322.
- Hannafon BN. & Ding W-Q. 2013.** Intercellular Communication by Exosome-Derived microRNAs in Cancer. *International Journal of Molecular Sciences* 14:14240-14269.

- Hein A. et al. 2014.** Polymorphisms in the RANK/RANKL Genes and Their Effect on Bone Specific Prognosis in Breast Cancer Patients. *BioMed Research International*, 2014, 842452.
- Heppner G.H. & Miller F.R. 1998.** The cellular basis of tumor progression. *Int. Rev. Cytol* 177:1–56.
- Hu, J. et al. 2016.** The Angiogenic Effect of microRNA-21 Targeting TIMP3 through the Regulation of MMP2 and MMP9. *PLoS ONE*, 11(2), e0149537.
- Jacob K. et al. 1999.** Osteonectin promotes prostate cancer cell migration and invasion: a possible mechanism for metastasis to bone. *Cancer Res*59:4453.
- Jiang W. et al. 2012.** The implications of cancer stem cells for cancer therapy. *Int. J. Mol. Sci.*13:16636–16657.
- Kalluri R. & Weinberg RA. 2009.** The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 119:1420–1428.
- Kaplan RN et al. 2005.** VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. *Nature.* 438:820–827
- Keller S et al. 2006.** Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett.*107:102–108.
- Kessenbrock K. et al. 2010.** Matrix Metalloproteinases: Regulators of the Tumor Microenvironment. *Cell*, 141(1), 52–67.
- Khamis et al. 2016.** Evidence for a Proapoptotic Role of Matrix Metalloproteinase-26 in Human Prostate Cancer Cells and Tissues. *Journal of Cancer*, 7(1):80–87.
- Kobayashi A. et al. 2011.** Bone morphogenetic protein 7 in dormancy and metastasis of prostate cancer stem-like cells in bone. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(13), 2641–2655.
- Korski K. et al. 2014.** Expression of stem cell marker CD44 in prostate cancer biopsies predicts cancer grade in radical prostatectomy specimens. *Pol. J. Pathol.*65:291–295.
- Krane SM. & Inada M. 2008.** Matrix metalloproteinases and bone. *Bone.*43:7–18
- Kreso A. & Dick JE. 2014.** Evolution of the cancer stem cell model. *Cell stem cell*14:275–291.
- Krishnan K. et al. 2013.** miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer. *RNA*, 19(12), 1767–1780.
- Leite K. R. M et al. 2013.** MicroRNA 100: a context dependent miRNA in prostate cancer. *Clinics*, 68(6), 797–802.
- Li H et al. 2015.** MicroRNA screening identifies circulating microRNAs as potential biomarkers for osteosarcoma. *Oncology Letters*, 10(3), 1662–1668.
- Li M. et al. 2016.** Targeting of cancer-associated fibroblasts enhances the efficacy of cancer chemotherapy by regulating the tumor microenvironment. *Molecular Medicine Reports*, 13(3), 2476–2484.
- Lin J et al. 2015.** Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis. *The Scientific World Journal.* 6:10-18.
- Liu J et al. 2005.** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7:719-723.
- Liu R. et al. 2013.** Tumor-Suppressive Function of miR-139-5p in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(10), e77068
- Lu J et al. 2005.** MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834–838.
- Lu P et al. 2011.** Extracellular matrix degradation and remodeling in development and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3:1–24.

- Luga V et al. 2012.** Exosomes mediate stromal mobilization of autocrine Wnt-PCP signaling in breast cancer cell migration. *Cell.*;151:1542–1556.
- Lugassy C & Escande JP. 1997.** The haematogenous theory of metastasis: récamier did not propose it. *Virchows Arch.* 431:371-376.
- Maitland, N. J. 2015.** Carcinoma-derived exosomes modify microenvironment. *Oncotarget*, 6(3), 1344–1345.
- Mitchell PJ et al. 2009.** Can urinary exosomes act as treatment response markers in prostate cancer? *J Transl Med* 12;7:14.
- Mori K. et al. 2007.** DU145 human prostate cancer cells express functional receptor activator of NFκB: new insights in the prostate cancer bone metastasis process. *Bone* 40, 981–990.
- Neelakantan, D. et al. 2015.** Intratumoral heterogeneity: Clonal cooperation in epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis. *Cell Adhesion & Migration*, 9(4), 265–276.
- Nourae N et al. 2013.** Expression, Tissue Distribution and Function of miR-21 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *PLoS ONE*, 8(9), e73009.
- Ou Z et al. 2015.** Tumor microenvironment B cells increase bladder cancer metastasis via modulation of the IL-8/androgen receptor (AR)/MMPs signals. *Oncotarget*, 6(28), 26065–26078.
- Panagiotou OA, et al. 2015.** A Genome-wide Pleiotropy Scan for Prostate Cancer Risk. *European urology*. 67(4):649-657.
- Panth K. M. et al. 2016.** In vivo optical imaging of MMP2 immuno protein antibody: tumor uptake is associated with MMP2 activity. *Scientific Reports*, 6, 22198.
- Peña-Chilet, M et al. 2014.** MicroRNA profile in very young women with breast cancer. *BMC Cancer*, 14, 529.
- Peralta-Zaragoza O. et al. 2016.** Relevance of miR-21 in regulation of tumor suppressor gene PTEN in human cervical cancer cells. *BMC Cancer*, 16, 215.
- Quesenberry PJ. et al. 2010.** Stem cell plasticity revisited: the continuum marrow model and phenotypic changes mediated by microvesicles. *Exp Hematol.*38:581–592.
- Raiborg C. et al. 2003.** Protein sorting into multivesicular endosomes. *Current Opinion in Cell Biology*. 15:446–455.
- Ribas J. et al. 2009.** miR-21: an androgen receptor-regulated microRNA that promotes hormone-dependent and hormone-independent prostate cancer growth. *Cancer Res.* 69: 7165–7169.
- Roato I. et al. 2008.** Osteoclasts Are Active in Bone Forming Metastases of Prostate Cancer Patients. *PLoS ONE*. 3-11.
- Sainio, A. & Järveläinen, H. 2014.** Extracellular matrix macromolecules: potential tools and targets in cancer gene therapy. *Molecular and Cellular Therapies*, 2, 14.
- Sánchez C. et al. 2016.** Exosomes from bulk and stem cells from human prostate cancer have a differential microRNA content that contributes cooperatively over local and pre-metastatic niche. *Oncotarget* 7(4):3993-4008.
- Santini D. et al. 2011.** Receptor activator of NF-κB (rank) expression in primary tumors associates with bone metastasis occurrence in breast cancer patients. *PLoS ONE*. 2011;6(4)e19234.
- Simons M. & Raposo G. 2009.** Exosomes vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*.21:575–581.
- Smith, B.N. & Bhowmick, N.A. 2016.** Role of EMT in Metastasis and Therapy Resistance. *Journal of Clinical Medicine*, 5(2), 17.

- Soldevilla B et al. 2014.** Tumor-derived exosomes are enriched in DeltaNp73, which promotes oncogenic potential in acceptor cells and correlates with patient survival. *Hum Mol Genet.*23:467–478.
- Staudt N.D. et al. 2012.** Processing of CXCL12 by Different Osteoblast-Secreted Cathepsins. *Stem Cells and Development*, 21(11), 1924–1935.
- Su Y et al. 2014.** Small molecule with big role: MicroRNAs in cancer metastatic microenvironments. *Cancer Lett.* 344:147–156.
- Suzman, D. L et al. 2014.** Bone-targeting agents in prostate cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, 33:619–628.
- Tuxhorn JA. et al. 2001.** Reactive stroma in prostate cancer progression. *J Urol* 166:2472–2483.
- Urgese G. et al. 2016.** isomiR-SEA: an RNA-Seq analysis tool for miRNAs/isomiRs expression level profiling and miRNA-mRNA interaction sites evaluation. *BMC Bioinformatics*, 17, 148.
- Valent P. et al. 2012.** Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.*12:767–775.
- Vlassov AV et al. 2012.** Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim Biophys Acta.*1820:940–948.
- Webber J. et al. 2010.** Cancer Exosomes Trigger Fibroblast to Myofibroblast Differentiation. *Cancer research* 70: 9621.
- Webber JP. et al. 2015.** Differentiation of tumour-promoting stromal myofibroblasts by cancer exosomes. *Oncogene.*34:290–302.
- Wei Y. et al. 2014.** Exosomal miR-221/222 enhances tamoxifen resistance in recipient ER-positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.*147:423–431.
- Weidner et al. 1993.** Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143:401-409.
- Wen S. et al. 2015.** Stromal Androgen Receptor Roles in the Development of Normal Prostate, Benign Prostate Hyperplasia, and Prostate Cancer. *The American Journal of Pathology*, 185(2), 293–301.
- Wyatt et al. 2014.** Heterogeneity in the inter-tumor transcriptome of high risk prostate cancer. *Genome Biology.*15:426-440.
- XIE T. et al. 2016.** Association between MMP-2 expression and prostate cancer: A meta-analysis. *Biomedical Reports*, 4(2): 241-245.
- Yamada, T et al. 2016.** Receptor activator of NF- κ B ligand induces cell adhesion and integrin α 2 expression via NF- κ B in head and neck cancers. *Scientific Reports*, 6, 23545.
- Yamashita M et al. 2012.** Role of stromal myofibroblasts in invasive breast cancer: stromal expression of alpha-smooth muscle actin correlates with worse clinical outcome. *Breast Cancer.* 19:170–176.
- Yang X.D. et al. 2015.** Role of miR-100 in the radioresistance of colorectal cancer cells. *American Journal of Cancer Research*, 5(2), 545–559.
- Yeh Y-Y et al.** Characterization of CLL exosomes reveals a distinct microRNA signature and enhanced secretion by activation of BCR signaling. *Blood.* 125:3297-3305.
- You Y. et al. 2015.** Matrix metalloproteinase 13-containing exosomes promote nasopharyngeal carcinoma metastasis. *Cancer Science*, 106(12), 1669–1677.
- Yu Y et al. 2014.** Cancer-associated fibroblasts induce epithelial-mesenchymal transition of breast cancer cells through paracrine TGF-beta signalling. *Br J Cancer.*110:724–732.

Zhang, B et al 2012. microRNA-21 promotes tumor proliferation and invasion in gastric cancer by targeting PTEN. *Oncology Reports*, 27(4), 1019–1026.

Zhang, H. et al. 2009. MicroRNA Patterns Associated with Clinical Prognostic Parameters and CNS Relapse Prediction in Pediatric Acute Leukemia. *PLoS ONE*, 4(11), e7826.

Zhang X et al. 2015. Exosomes in cancer: small particle, big player. *Journal of Hematology & Oncology*.8:83.

Zeng, F.C. et al. 2016. Elevated matrix metalloproteinase-9 expression may contribute to the pathogenesis of bladder cancer. *Oncology Letters*, 11(3), 2213–2222.

Zhou W et al. 2014. Cancer-secreted miR-105 destroys vascular endothelial barriers to promote metastasis. *Cancer Cell*. 25:501–515.

Ziaee, S et al. 2015. Prostate cancer metastasis: roles of recruitment and reprogramming, cell signal network and three-dimensional growth characteristics. *Translational Andrology and Urology*, 4:438–454.

ANEXOS

Tabla 2: Primers de los targets evaluados en PCR cuantitativo.

Target	Primer Forward (5'→3')	Primer Reverse (5'→3')
AR	ACTGCCAGGGACCATGTTTT	TGCAATCATTCTGCTGGCG
BMP2	CACTCAGTCCACCTCATTCAATT	TTGTTTACGGTCTCCTGTCAAC
CatB	AGAATGGCACACCCTACTGC	TGGCCTGTCTGCACTGTAAC
CatL	ACAGTGGACCAAGTGAAGG	AAGCCCAACAAGAACCACAC
GAPDH	TGCACCACCTGCTTAGC	GGCATGGACTGTGGTCATGAG
IL-8	ATGACTTCCAAGCTGGCCGTGG CT	TCTCAGCCCTCTTCAAAAACCTCTC
MMP-2	CAAGGACCGGTTTATTTGGC	ATTCCCTGCGAAGAACACAGC
MMP-9	CGCTGGGCTTAGATCATTCC	TTGTCGGCGATAAGGAAGG
MMP-13	TTGAGCTGGACTCATTGTCG	GGAGCCTCTCAGTCATGGAG
OPG	GAAGGGCGCTACCTTGAGAT	GCAAACGTATTTGCCTCTGG
P63	GGAAAACAATGCCAGACTC	GAAGGACACGTCGAAACTGTG
RANKL	TGATTCATGTAGGAGAATAAA CAGC	GATGTGCTGTGATCCAACGA
TGFB1	GCGTGCTAATGGTGGAAAC	CGGTGACATCAAAGATAACCAC

Tabla 3: Lista de anticuerpos primarios utilizados en western blot y diluciones de uso.

Anticuerpo primario	Código/ Marca	Dilución	Especie
Anti-B-Actina	MAB1501/ Millipore	1: 10.000	Monoclonal Mouse IgG1
Anti-Catepsina K	Ab66237/ Abcam	1:100.000	Monoclonal mouse igG2
Anti-Colágeno III	MA122147/Thermo Scientific	1: 1.000	Monoclonal mouse igG1
Anti-IL-8	MAB208/ R&D Systems	1:2.000	Monoclonal Mouse IgG1
Anti-MMP-2	Sc-53630/ Santa Cruz Biotechnology	1:2.000	Monoclonal mouse igG1
Anti-MMP-9	D6O3H/ Cell Signaling	1:5.000	Rabbit igG
Anti-MMP-13	MAB511/ R&D Systems	1: 2.000	Monoclonal Mouse IgG1
Anti-OPG	AF805/ R&D Systems	1: 2.000	Policlonal Goat IgG
Anti-RANKL	SC-377079/ Santa Cruz Biotechnology	1: 2.000	Monoclonal mouse igG1

Tabla 4: Eficiencia de amplificación de los partidores de cada target evaluados en los tratamientos.

Partidor	Eficiencia
BMPR2	1,756
P63	2,038
OPG	1,7
AR	2,008
MMP-2	1,93
MMP-9	1,949
MMP-13	1,927
CatL	1,9
CatB	1,98
IL-8	1,81
TGF- β 1	1,86
GAPDH	1,961