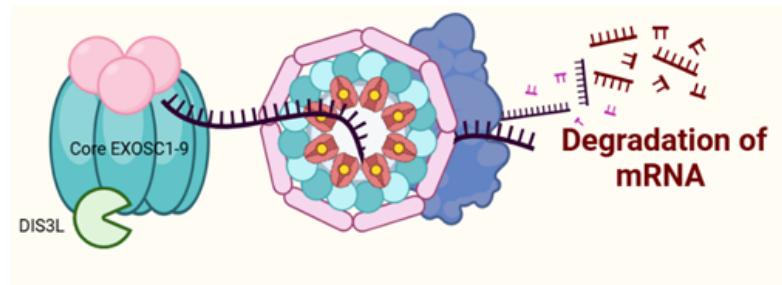


IMPLICACIÓN DE LA MAQUINARIA DEL RNA-EXOSOMA EN LA FISIOPATOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN DIS3 EN DIFERENTES LÍNEAS CELULARES



AUTORES: Haieqa Nadeem, Stefanith Paz Montalvo, Marta Moreno Pareja, Carlos Gutiérrez Díaz

INVESTIGADORES: Antonio Prats-Escribano,

PROFESORA: Lourdes de la Mata Saez

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba; Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Universidad de Córdoba, Córdoba; Instituto IES Fidiana, Colegio Británico de Córdoba

ÍNDICE

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	3
2. INTRODUCCIÓN	4
3. OBJETIVOS	6
4. MARCO TEÓRICO	7
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	8
5.1 VARIABLES DEL ESTUDIO	8
5.2 MATERIAL EXPERIMENTAL E INSTRUMENTOS DE RECOGIDA DE INFORMACIÓN.....	8
5.3 METODOLOGÍA	10
5.4 PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN.....	15
6. RESULTADOS	16
7. DISCUSIÓN	19
8. CONCLUSIONES.....	19
9. AGRADECIMIENTOS	20
10 BIBLIOGRAFÍA	21

1. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

Resumen

En este estudio, examinamos la función del complejo multiproteico altamente conservado conocido como la maquinaria del exosoma de RNA, que descompone, procesa y supervisa distintos tipos de RNA dentro de las células, en relación con el cáncer de próstata. Se investigó la maquinaria del exosoma de RNA en la fisiopatología del cáncer de próstata, con un enfoque en la expresión del gen *D/S3* (una de las principales herramientas que utiliza la maquinaria del RNA-exosoma para degradar RNA) en diversas líneas celulares de cáncer de próstata. Para ello, se cultivaron múltiples líneas celulares bajo condiciones estandarizadas y se extrajo RNA total utilizando el reactivo TRIzol. Posteriormente, las muestras de RNA fueron tratadas con ADNasa para eliminar cualquier contaminación de ADN genómico, asegurando una cuantificación precisa en los análisis posteriores. Tras este tratamiento, se llevó a cabo la síntesis de ADN complementario (ADNc) mediante retrotranscripción utilizando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis.

Los niveles de expresión de *D/S3* se evaluaron mediante PCR cuantitativa (qPCR) utilizando mezcla maestra SYBR Green. Se emplearon cebadores específicos para nuestro candidato con el fin de amplificar la secuencia objetivo, mientras que genes de referencia (housekeeping) sirvieron como controles internos para la normalización. Los datos de qPCR fueron analizados para comparar la expresión génica relativa en distintas líneas celulares de cáncer de próstata. Los resultados preliminares sugieren que el gen seleccionado presenta una expresión diferencial, posiblemente correlacionada con etapas o niveles de agresividad específicos del cáncer de próstata. Esta observación resalta la relevancia del complejo del exosoma de RNA en la biología del cáncer y sugiere que *D/S3* podría tener un papel como biomarcador o diana terapéutica.

En conjunto, la metodología utilizada —desde la extracción de RNA basada en TRIzol y el tratamiento con ADNasa, hasta la cuantificación mediante qPCR— proporciona un enfoque sólido para el análisis de la expresión génica en modelos de cáncer de próstata.

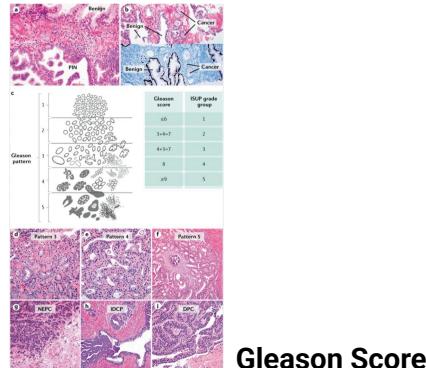
Palabras clave

2. INTRODUCCIÓN

Hipótesis

El cáncer de próstata es la patología tumoral más frecuente en hombres en países desarrollados. Se trata de un tipo de cáncer que se desarrolla en la glándula prostática y se produce cuando algunas de sus células comienzan a crecer descontroladamente. Este cáncer suele crecer lentamente, aunque en algunos casos puede ser más agresivo. El sistema de clasificación de Gleason es la herramienta utilizada para evaluar la agresividad del cáncer de próstata. Se basa en el examen microscópico de células cancerosas obtenidas mediante una biopsia de próstata. El objetivo principal del sistema de clasificación de Gleason es determinar la diferencia entre las células cancerosas y las células prostáticas normales y predecir el comportamiento del cáncer, como su tasa de crecimiento y su mayor o menor probabilidad de diseminarse a otras partes del cuerpo.

El cáncer de próstata se estadifica según su extensión y agresividad, lo cual es esencial para determinar el pronóstico y elegir el tratamiento adecuado. La estadificación se realiza mediante el sistema TNM (Tumor, Ganglios linfáticos, Metástasis), junto con la puntuación de Gleason para evaluar la agresividad tumoral y el nivel de PSA (antígeno prostático específico), que también influye en el diagnóstico. (1)



Gleason Score

El porqué de esta investigación

En este contexto, el estudio del ARN-Exosoma ha ganado atención en la investigación oncológica, que corresponde al conjunto de estudios y trabajos científicos encaminados a comprender, prevenir, diagnosticar y tratar el cáncer.

En los últimos años, las maquinarias celulares involucradas en el procesamiento de ARN mensajero, han cobrado un interés especial debido a su papel clave en la regulación de la expresión génica y a su potencial aplicación en la biotecnología y medicina. Este interés se ha intensificado con el auge de las terapias basadas en ARNm, como las vacunas de ARNm contra COVID-19, que han demostrado la capacidad de modulación de proteínas con fines terapéuticos.

Entre las maquinarias más estudiadas en este contexto se encuentra el ARN-Exosoma, un complejo multiproteico, cuya función principal es la degradación, modificación y procesamiento de diversos tipos de ARN, incluidos ARNm, ARNr y ARN no codificantes. Juega un papel esencial en el control de la estabilidad y calidad de los ARN, lo que lo convierte en un regulador fundamental de la expresión génica.

Además, los datos de incidencia de cáncer en España obtenidos por la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) y ANCAP en el año 2020 registraron 33.341 casos de cáncer de próstata y 6.112 fallecidos por esta causa, situándose como el primer tumor más frecuente en hombres.

En España, fallecen aproximadamente 6.000 varones cada año a consecuencia de este tumor, lo que supone un 2,8% del total de las defunciones registradas en la población masculina. (2,2)

Investigaciones científicas previas

El Dr. Mario Álvarez-Maestro, vocal de Actividades Científicas de la AEU asegura que la detección temprana del cáncer de próstata permite reducir la mortalidad y mejorar la calidad de vida de las personas que lo padecen. Un factor que revolucionó su diagnóstico y favoreció su localización fue la aparición del antígeno específico de próstata (PSA) en la década de los 70. Lo cual ha permitido reducir hasta un 21% las muertes causadas por este tumor.

El PSA es una proteína producida por células normales y malignas de la glándula prostática. El análisis del PSA (antígeno prostático específico) mide el nivel de concentración de esta proteína en la sangre, siendo generalmente elevada en los pacientes que sufren cáncer de próstata. (3)

Aunque, hay que tener en cuenta que el PSA tiene una baja especificidad, lo que significa que niveles elevados no siempre indican cáncer de próstata. Puede aumentar por condiciones benignas como la hiperplasia prostática benigna (HPB) o la prostatitis, causando falsos positivos y biopsias innecesarias. También hay falsos negativos, ya que algunos cánceres agresivos no elevan el PSA.

Además, el PSA no distingue entre tumores indolentes y agresivos, lo que puede llevar a sobrediagnóstico y sobretratamiento. Para mejorar su precisión, se usan otros marcadores como PSA libre/total, PCA3 o resonancia magnética multiparamétrica (RMmp).

Antes, la mayoría de los médicos consideraban que obtener un nivel menor o igual a 4,0 ng/ml era lo adecuado. (4)

La Unidad de Investigación en Terapia Molecular del Cáncer (UITM)-Caixa Research del VHIR, se dedica a la realización de ensayos clínicos complejos con fármacos en desarrollo temprano (ensayos de fase I y fase II temprana), centrados en dianas novedosas. Al promover una estrecha conexión entre la atención oncológica y la investigación, establece nuevos modelos terapéuticos para los pacientes con fármacos muy selectivos y el avance en el conocimiento de los tipos de tumores y en la forma de tratarlos de manera individualizada, consiguiendo el tratamiento adecuado para el paciente correcto en el momento preciso. En 2023, esta unidad participó en 249 ensayos clínicos de fase I con reclutamiento activo, 25 de los cuales son ensayos Basket o cesta. (5)

“La desregulación de la maquinaria de ARN-exosomas está directamente relacionada con las principales características del cáncer de próstata: papel oncogénico de PABPN1”

Este estudio, fue realizado por un equipo de investigadores que incluye a Daniella L. Cummings, Leonard A. Foster, David J. Schriemer, entre otros colaboradores. El trabajo fue publicado en el Journal of Cancer Research y es parte de un esfuerzo continuo para comprender el papel de los complejos de procesamiento de ARN, como el exosoma, en la biología del cáncer. Se encargaron de estudiar sobre la disfunción del exosoma de ARN en el cáncer de próstata, centrándose en la sobreexpresión del gen PABPN1. Se encontró que este gen está significativamente aumentado en células tumorales y está relacionado con un peor pronóstico.

Hallazgos clave: PABPN1 regula la actividad del exosoma de ARN, afectando la estabilidad de ARNm y lncRNA implicados en la progresión tumoral; su sobreexpresión promueve la proliferación, migración e invasión de células de cáncer de próstata; silenciar PABPN1 en modelos celulares reduce la agresividad del tumor, lo que sugiere que podría ser una diana terapéutica para frenar el avance del cáncer.

En conclusión, este estudio destacó el papel del exosoma de ARN en la biología del cáncer y abrió nuevas vías para terapias dirigidas. (6)

3. OBJETIVOS

- Analizar la expresión de marcadores de agresividad en cáncer de próstata y componentes reguladores del metabolismo del ARN en respuesta al tratamiento de células de tumores cerebrales con inhibidores farmacológicos
- Interpretar, discutir y representar los resultados del proyecto y las conclusiones más relevantes.

4. MARCO TEÓRICO

El proceso utilizado para determinar si el cáncer se ha propagado dentro de la próstata o a otras partes del cuerpo se denomina estadificación. La información obtenida mediante la estadificación determina el estadio de la enfermedad. Conocer el estadio es importante para planificar el tratamiento. Dicho esto, los **estadios generales** del cáncer de próstata son:

- **Estadio 1 (localizado temprano): T1 (tumor).** El cáncer se limita a la próstata y no se ha propagado. Generalmente, el cáncer es de bajo grado (puntuación de Gleason ≤ 6) y puede no causar síntomas.
- **Estadio 2 (localizado pero más avanzado): T2.** El cáncer aún se limita a la próstata, pero podría estar creciendo más rápidamente. Podría ser más agresivo (Gleason 7) y más palpable.
- **Estadio 3 (localmente avanzado): T3.** El cáncer se ha propagado a los tejidos prostáticos cercanos, como las vesículas seminales o la pared pélvica. Los ganglios linfáticos cercanos pueden estar involucrados.
- **Estadio 4 “(metastásico)”: T4.** El cáncer se ha propagado a partes distantes del cuerpo, como los huesos y los pulmones. Este estadio generalmente conlleva un pronóstico más grave (7).



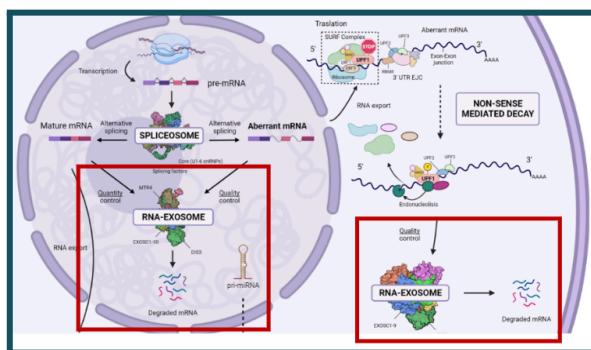
Figura 1: Estadificación del cáncer de próstata.

En el tratamiento del cáncer de próstata (CaP), la prostatectomía (extirpación quirúrgica de la próstata) es considerada la primera línea de tratamiento, especialmente en casos de cáncer localizado. A menudo, se combina con radioterapia para aumentar las probabilidades de éxito, especialmente si el cáncer está en etapas más avanzadas o tiene un alto riesgo de recurrencia. Si el cáncer se disemina o recurre, el tratamiento se enfoca en la deprivación androgénica. Este enfoque busca reducir los niveles de andrógenos (hormonas masculinas como la testosterona) que alimentan el crecimiento del tumor. La deprivación androgénica se puede lograr mediante castración quirúrgica o mediante fármacos como los análogos de

GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas) o antagonistas de GnRH, que disminuyen la producción de testosterona. En cuanto al tratamiento farmacológico, existen inhibidores del receptor de andrógenos como la enzalutamida y la abiraterona. Estos fármacos bloquean la acción de la testosterona y otros andrógenos sobre las células cancerosas. La enzalutamida inhibe la actividad del receptor de andrógenos, lo que impide que los andrógenos estimulen el crecimiento del tumor. Por otro lado, la abiraterona bloquea la producción de andrógenos en varias partes del cuerpo, incluidos los testículos y las glándulas suprarrenales, contribuyendo a reducir los niveles de testosterona. (7)

Maquinaria ARN-Exosoma:

Este sistema es como una "trituradora de basura" para el ARN. Cuando la célula detecta que un ARN no está funcionando bien o no se necesita, el exosoma lo descompone y lo elimina.



En el cáncer de próstata, los exosomas son vesículas extracelulares que transportan ARN (como microARNs y ARN no codificantes) entre las células, afectando la expresión génica y la comunicación celular. Los exosomas permiten que las células tumorales modulen su entorno favoreciendo la progresión y metástasis del cáncer. También pueden influir en la resistencia a tratamientos, como la resistencia a la castración. El ARN en los exosomas puede

servir como biomarcador para monitorear el cáncer y es un objetivo terapéutico emergente, ya que al inhibir su biogénesis o al manipular sus microARNs se podrían ofrecer nuevas formas de tratamiento. (8)

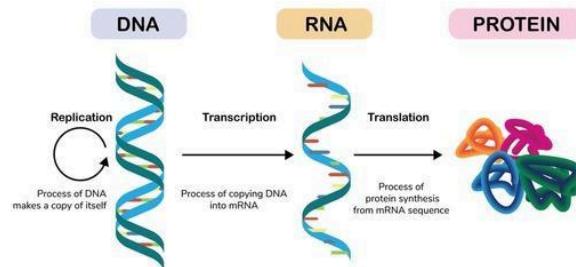
Dogma central del ADN y el Gen DIS3:

El dogma central de la biología molecular establece que la información genética contenida en el ADN se transcribe a ARN mensajero (ARNm), que luego se traduce para formar proteínas. Este proceso, que involucra la transcripción (de ADN a ARN) y la traducción (de ARN a proteína), es fundamental para la expresión génica en todos los organismos vivos. Sin embargo, además de estos procesos básicos, existen mecanismos adicionales que regulan la estabilidad y el destino del ARN en la célula, los cuales son cruciales para el control preciso de la expresión génica.

En este contexto, se hará énfasis en una maquinaria clave para la regulación del ARN el complejo ARN-exosoma. El exosoma es una maquinaria esencial para mantener la calidad del ARN y eliminar transcritos defectuosos o innecesarios, garantizando así un entorno celular saludable y controlado.

Dentro de este complejo, uno de los componentes más importantes es DIS3, el cual es una ribonucleasa que forma parte del exosoma y se encarga de la degradación de ARN defectuosos o redundantes.

Su función es crucial para el procesamiento de ARN y la regulación de la expresión génica. DIS3 actúa en la eliminación de ARN no deseado, asegurando que solo el ARN funcional permanezca en la célula. Este componente también está involucrado en el mantenimiento de la homeostasis del ARN y en la respuesta celular frente a ARN aberrante, lo que tiene implicaciones importantes para la prevención de enfermedades asociadas con la acumulación de ARN defectuoso, como algunos tipos de cáncer y trastornos neurodegenerativos. (9)



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 VARIABLES DEL ESTUDIO

En este estudio se ha distinguido tres tipos de variables:

→ **VARIABLE INDEPENDIENTE:**

- **Líneas celulares de cáncer de próstata:** se observarán en estas las distintas expresiones del gen del estudio: DIS3.

→ **VARIABLE DEPENDIENTE:**

- **Niveles de expresión del gen DIS3:** es el propio objeto de la investigación. Los resultados finales se obtienen gracias a la amplificación y cuantificación (ng/μl) mediante qPCR y serán propias de cada línea celular estudiada.

→ **VARIABLE DE CONTROL:**

- **Genes de referencia o housekeeping genes:** son aquellos que se expresan de forma constante y que, por lo tanto, servirán para normalizar la qPCR y obtener resultados coherentes en relación con su expresión génica.

- **Cantidad y calidad de ARN:** gracias al trizol, las DNAs... se establecen unos valores estándares.

- **Condiciones de qPCR:** se asegura que la temperatura, el tiempo y el número de ciclos en todas las muestras sea igual para asegurar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

5.2 MATERIALES EXPERIMENTALES E INSTRUMENTOS DE RECOGIDA DE INFORMACIÓN

- **Pellet de células:** es el sedimento compacto estancado en el fondo de tubo, tras la centrifugación de las células de las distintas líneas celulares empleadas. Encontramos líneas celulares cancerígenas:

- DU-145: cuentan con una morfología epitelial, las cuales son agresivas y cuentan con una capacidad de metástasis moderada.

- 22Rv1: expresan el receptor androgénico (RA) y el antígeno prostático específico (PSA), marcadores esenciales en la investigación del cáncer de próstata y su abordaje terapéutico.

- VCaP: las células de esta línea son conocidas por expresar un alto nivel de antígeno prostático específico (PSA) y receptor de andrógenos (RA), lo que las hace muy relevantes para estudios sobre las vías de señalización del receptor de andrógenos y los mecanismos de resistencia a la terapia antiandrogénica.

Estas serán comparadas con una línea celular sana:

- RWPE1: Estas células epiteliales, caracterizadas por sus propiedades de crecimiento adherente y morfología epitelial típica, se utilizan en la investigación de cáncer de próstata para ser comparada con las líneas tumorigénicas de dicho caso, en este caso, las mencionadas anteriormente.

De estas 4 líneas celulares se tienen 3 réplicas biológicas distintas (“n1, n2 y n3”), 3 mismas muestras cultivadas en diferentes botellas. Se colocarán en pocillos y ayudarán a la hora de confirmar la coherencia de los resultados de la investigación.

Los genes a cuantificar, objeto de estudio, son:

- GAPDH: es un gen que codifica la proteína “Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, teniendo un papel importante en la glucólisis. En biología molecular y en esta investigación será reconocido como un gen de referencia o control.

- ACTB (alias actina beta): es otro gen que, en este caso, codifica la actina beta, la cual es una de las formas de la proteína actina del citosol de las células eucariotas. Ambos conforman los llamados “genes housekeeping”.

- DIS3 (exonucleasa del complejo exosomal RRP44): será el gen que codifica la enzima ARNasa y puede ser parte del complejo exosomal en el núcleo eucariótico.

- Trizol: es un reactivo completo que se basa en soluciones de fenol e isotiocianato de guanidina diseñado para la extracción de ADN, ARN y proteínas, a partir de determinadas muestras biológicas.

- Cloroformo: es otro reactivo de laboratorio empleado como disolvente gracias a la relativa ausencia de reactividad en contacto con compuestos orgánicos.

- Isopropanol: se trata de un disolvente orgánico polar. Al ser el ADN menos soluble en este disolvente, ayudará a que este se precipite.

- Etanol (75%): se trata de un compuesto químico orgánico que, al igual que el isopropanol, contribuye a la precipitación del ADN.

- H₂O libre de ARNasas: agua destilada utilizada para descartar la degradación de ARN que se están manipulando en la investigación.

- Kit de retrotranscripción: contiene todos los componentes necesarios para que se lleve a cabo la síntesis de ADNc (complementario), a partir del ARN. Cuenta con transcriptasa

inversa o retrotranscriptasa; buffer de retrotranscripción; dNTPs; Oligo(dT) o primer random; inhibidor de ribonucleasa y H₂O libre de ARNasa.

- **Primers (cebadores):** son cortas secuencias de ADN utilizados para la amplificación de un gen, mediante la PCR.

- **Fluoróforo SYBR de PCR:** es el producto encargado de ocupar menos tiempo a la hora de la preparación de la reacción de la PCR, así como evitar contaminaciones durante el pipeteo.

- **Micropipetas y puntas:** instrumentos para transportar pequeños volúmenes de líquido. Según dicho volumen, será necesario el empleo de una u otra micropipeta, al igual que decidir el tamaño de la punta correspondiente.

- **Centrífuga refrigerada:** equipo cuya función es lograr la sedimentación de componentes de una solución homogénea, siempre manteniendo la temperatura refrigerada para mantener dichos componentes en buen estado.

- **Tubos de 1,5 mL:** son los recipientes encargados de contener las muestras de los solventes o compuestos a analizar.

- **Placas de PCR:** son las placas que se desecharán tras la realización de la PCR, que se explicará más adelante.

- **Espectrofotómetro (Nanodrop):** es el instrumento que permite cuantificar ARN, ADN y proteínas con una microgota de muestra.

- **Termobloques:** instrumento empleado para calentar ciertas muestras sin la necesidad de utilizar líquidos.

- **Termociclador de qPCR:** aparato que servirá para realizar los ciclos de temperaturas pertinentes para la amplificación de diversas hebras de ADN.

5.3 METODOLOGÍA

- **RECOGIDA DE MUESTRAS:** Se ha podido llevar a cabo esta investigación gracias a las líneas inmortalizadas adquiridas de una casa comercial.

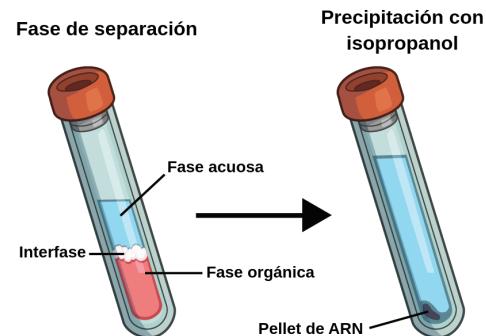
- **EXTRACCIÓN DE ARN MENSAJERO:** es un proceso crucial para las técnicas de biología molecular para el análisis de la expresión génica, mediante el cual se aísla de forma intacta el ARN.

Materiales:

- Una caja grande con hielo
- Trizol Reagent
- Etanol 75%
- Puntas (azules, amarillas y blancas)
- Cloroformo
- Glicógeno
- PBS 1x
- Isopropanol

En relación con los tubos eppendorf a preparar:

- X tubos eppendorf (free RNase) para recoger en Trizol (numerados del 1-24).
- X tubos eppendorf (free RNase) para recoger la fase acuosa y conservación (correctamente marcados: tipos de células, fecha y tratamiento).



	Trizol	Cloroformo	Isopropanol
Placa de 12 o 14	600 µl	120 µl	300 µl
Placa de 6	1 ml	200 µl	500 µl

Para la preparación del procedimiento:

- Trabajar en la campana de extracción
- PBS en el hielo
- Contenedor para desechar Trizol adecuadamente.
- Sacar dos alícuotas antes del glicógeno y el Buffer de la DNAsa, en el hielo: (stock -20°C).
- Termobloque a 65°C y otro a 37°C.

A continuación, el procedimiento detallado (optimizado a 600 µL de Trizol):

Recolección con Trizol:

- Colocar la placa con las células en hielo y retirar el medio con puntas azules y blancas (2 ml).
- Lavar con PBS (1 ml) por un lateral para que no se levanten las células y sin tocar con la misma punta. Después, agitar ligeramente.
- Retirar con doble punta.
- Echar 600 µL de Trizol en el centro de cada pocillo.
- En la pipeta, alcanzar los 770µL para asegurar haber cogido todo. Seguidamente, recoger y soltar repetidas veces para levantar las células de cada pocillo (aspecto mucoso) y recoger en el eppendorf rotulado desecharable.
- Una vez recogido, anclar en el hielo y almacenar las muestras a -80°C.

Extracción con Trizol:

- Incubar las muestras 5 min a RT. Si están en stock -80 °C, descongelar completamente.
- Añadir 120 µl de cloroformo al tubo con Trizol. Sin tocar nada, utilizar la misma punta.
- Agitar y voltear 15 segundos con la mano los eppendorf hasta asegurar que se mezclan las dos fases, si quedara blanco abajo, continuar mezclando.
- Sacar del hielo y dejar reposar a RT unos 2-3 min. No mezclar ni mover los tubos a partir de este momento.
- Centrifugar a 4°C durante 15 min a 11400 rpm.
- Sacar dos alícuotas de glicógeno (stock-20 °C), descongelar y dar un spin.
- Preparar una segunda tanda de tubos (free RNase) limpios añadiéndoles 1µL de glicógeno en el fondo.
- Recoger la fase acuosa superior (transparente, ARN) con mucho cuidado de no tocar la blanca. Usar doble punta y recoger 100-200 µl varias veces. Verter al nuevo tubo con 1 µl de glicógeno en el fondo.
- Anclar en hielo el tubo con el ARN.
- Añadir 300 µl de isopropanol a cada eppendorf al tubo con la fase acuosa y el glicógeno (que precipita y concentra ARN)

- Mezclar invirtiendo 20 segundos e incubar 10 min a RT
- Centrifugar 10 min a 4°C a 11400 rpm. Despues, poner en hielo
- Eliminar sobrenadante con la pipeta 1000 al maximo (doble punta). No apurar demasiado.
- Lavar con 600 µl de etanol 75% (frio), e invertir hasta levantar el pellet
- Centrifugar 5 min a 4°C a 9000 rpm.
- Eliminar etanol y secar el pellet 3-4 min al aire y eliminar gotas en papel de filtro (no secar tanto como para que el pellet se vuelva transparente).
- Resuspender 8µl de H₂O DEPC (dietilpirocarbonato, bloquea RNasas) poniéndolo en hielo si no se resuspende.

Aclaración:

Asegurarse de que la muestra de ARN queda en el fondo del tubo, mientras que el resto de reactivos en las paredes del eppendorf para poder usar la misma punta. En caso de que la muestra sea muy grande, calentar durante 2 min a 60°C para resuspender mejor el pellet en H₂O DEPC, poner en hielo 2 min y dar un spin.

Tratamiento con DNAsa:

- Añadir 8 µl de H₂O DEPC al pellet para resuspenderlo (paso anterior)
- Añadir 1 µl de Buffer 10x para ADNasa (descongelar primero en mano y mantener en hielo hasta su requerimiento).
- Añadir 1 µl de DNasa (stock-20°C). Colocar en el fondo y pipetear varias veces.
- Dar un spin a las muestras.
- Incubar a 37°C durante 30 min. Tras ello, dar un spin y colocar en hielo.
- Añadir 1µl de solución STOP y dar spin.
- Incubar a 65 °C durante 10 minutos.
- Poner las muestras en hielo y dar spin.

Para finalizar este proceso de extracción de ARN:

- Cuantificar 1µl en el Nanodrop (blanco H₂O DEPC).
- Conservar en stock a -80°C.

- DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN Y CALIDAD DEL ARN EXTRAÍDO:

Crucial para asegurar que las muestras de ARN estén en las condiciones adecuadas para la continuación del proyecto.

	22Rv1	Du145	VCaP	RWPE 1
n1	338,9	819,5	217,2	162,7
n2	259,8	515,1	125,9	134,7
n3	1119,9	468,0	121,5	166,9

Tabla 1: proporciona la cantidad de ARN extraido en cada caso, expresado en ng/µl.

- **RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN MENSAJERO A ADN COPIA:** será el proceso que tiene como finalidad hacer una copia de ADN (ADN copia) a partir de ARN mensajero.

Precauciones:

- Poner en hielo las muestras, primers, agua, dNTPs y Buffer.
- Poner a calentar bloques a 65°C y 42 °C. Además, después, otro a 70°C.
- Preparar el mismo número de tubos que muestras más uno extra para la MIX.
- Llevar a cabo las cuentas necesarias. Una RT normal necesita 500-2000 ng (óptimo 1000) de ARN. Ejemplo:

50,5 ng -----	1μl
1000 ng -----	x

El volumen total es de 11μl(ARN+agua), si al hacer las cuentas aparece que se necesitan más de 11μl, echar los 11μl como máximo de ARN sin agua, pero se debe tener en cuenta para la qPCR.

Materiales:

- MIX 8μl/muestra:
 - 4μl Buffer
 - 2μl dNTPs (10mM)
 - 1μl Ribolock*¹ (para bloquear las ARNsas)
 - 1μl RetroTranscriptasa*²

*¹ Añadir como si hubiera 1 muestra extra cada 5, por error de pipeteo.

*² Están a -20°C con glicerol (no congeladas para que no pierdan su estructura. Una vez sacadas, colocarlas en la gradilla con hielo.

Procedimiento:

Se parten de muestras de ARN cuantificadas en el NanoDrop (ng/μ)

- Añadir a los eppendorf rotulados el agua y el ARN (según concentración) correspondientes (volumen final: 11 μl).
- Dar un spin en la centrifugadora fría a 4°C
- Añadir 1 μl de random primers (sobre un lateral del eppendorf)
- Spin e incubar 5 min a 65 °C (los primers se unen).
- Preparar, mientras tanto, la MIX y dejarla en hielo.
- Spin para recuperar lo evaporado.
- Añadir la MIX y resuspender con la pipeta.
- Dejar 5 min a RT.
- Poner 1 h a 42 °C (desarrollo de la retrotranscripción)
- Poner 5 min a 70 °C (desnaturaliza las enzimas). Se obtiene ADN copia lista para usar o congelar a -20 °C (short storage) y a -80 °C (large storage).

Aclaración:

El ARN inestable se puede mantener en frío en stock a -80°C.

- AMPLIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE QPCR: La qPCR o PCR en tiempo real es una variante de la PCR convencional, permitiéndonos amplificar y cuantificar simultáneamente un fragmento de ADN y monitorizar el proceso en tiempo real.

- Amplificación: se replica exponencialmente una secuencia específica de ADN, la cual

contiene el gen de interés. Se obtiene la curva de amplificación.

- Cuantificación: se mide la cantidad de ADN a lo largo de la curva de amplificación.

Materiales:

Componente	Volumen
Primer Fw	0.3 μ l
Primer Rv	0.3 μ l
Máster MIX (SYBR)	5 μ l
H_2O_d (autoclavada)	3.4 μ l
ADN copia	1 μ l (\approx 50 ng/ μ l mínimo cuantificado en NanoDrop)

Procedimiento:

Mezcla qPCR/pocillo:

- Descongelar en hielo muestras, primers y curva. Las enzimas (SYBR, fluoróforo y polimerasa están en la Máster Mix) se sacan justo al usarlas.
- Encender instrumento, ordenador, lámpara del instrumento y termociclador qPCR. Abrir el programa Mxpro. SYBR Green (with dissociation curve). La lámpara tarda en encenderse, así que lo estará cuando se ponga en verde.

Preparar un mix (incluso para una muestra se calcula mínimo para dos, nunca para una) en un tubo eppendorf para cada secuencia con los primers, dNTPs H_2O y la Máster Mix (contar 3 o 4 pocillos por el error). Realizar todo sobre hielo para mantener la temperatura.

- Añadir Master Mix.
- Añadir H_2O_d (autoclavada).
- Añadir los primers necesarios. Vórtex a los primers antes de usarlos.
- Mezclar la mix con la pipeta y dar un vórtex y spin al final.
- Coger placa de 96 pocillos cónicos. Añadir los 19 μ l de la mezcla en todos los pocillos del mismo gen con la misma punta (meter lo mínimo posible). Hacer doble pipeteo a la hora de coger el líquido. Evitar hablar durante el proceso para no favorecer la contaminación.
- Vórtex a la curva y a las muestras agitar los tubos con el dedo.
- Coger 1 μ l de la muestra introduciendo la punta lo mínimo posible. Al echar, presionar rápido la pipeta y, sin soltar, comprobar si queda algo de volumen en la punta.

	22Rv1			Du145			VCaP			RWPE1		
	<i>n1</i>	<i>n2</i>	<i>n3</i>									
GAPDH	18,27	18,54	18,33	17,92	18,01	18,17	18,49	18,21	18,21	17,51	17,66	18,03
ACTB	19,07	19,23	19,12	18,80	18,94	18,76	19,09	18,98	18,99	18,32	18,96	17,09
DIS3	27,51	27,21	27,88	28,40	28,33	29,09	26,54	27,34	27,20	22,34	23,05	22,14

Tabla 2: muestra los genes housekeeping (GAPDH y ACTB) y el gen de interés (DIS3).

Las columnas representan las líneas celulares (22Rv1, Du145, VCaP y RWPE1), con sus respectivas réplicas biológicas (n1, n2 y n3). Se observa cuánta cantidad de un gen específico se presenta en las diferentes muestras, obtenidas de la qPCR, en ng/μL.

5.4 PLANIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

Esta investigación ha sido realizada en un total de cuatro sesiones presenciales en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), las cuales se planificaron de la siguientes manera:

- **Sesión 1 (06/11/2024) (4 horas):** Presentación institucional del IMIBIC y visita a las instalaciones del grupo GC27 “OncObesidad y Metabolismo”, del IMIBIC. Presentación de los objetivos del proyecto, resumen de las técnicas de laboratorio (métodos) empleados, introducción al metabolismo del ARN, su importancia en la regulación de la expresión génica y su implicación en los procesos tumorales con especial interés en cáncer de próstata.
- **Sesión 2 (03/12/2024) (4 horas):** Presentación y descripción enfocada a los materiales y métodos empleados en la sesión. Extracción de ARN de células modelo de cáncer de próstata, tratamiento con DNAsa y obtención del ADN copia mediante retrotranscripción.
- **Sesión 3 (15/01/2025) (4 horas):** PCR cuantitativa (qPCR) para determinar la expresión génica de diferentes factores de relevancia en el metabolismo del ARN y cáncer de próstata.
- **Sesión 4 (12/02/2025) (4 horas):** Análisis y discusión de los resultados obtenidos y asesoramiento para la realización de un póster científico.

6. RESULTADOS

De los experimentos y pruebas que hemos hecho en el laboratorio hemos logrado varios resultados como esta tabla o las gráficas que verán más abajo.

- Cuantificación del ARN

Tipo	ARN (ng/μL)	A260/A280	A260/A230
VCaP n1	217.20	2.11	1.97
VCaP n2	125.90	2.09	1.47
VCaP n3	121.50	2.09	1.45

RWPE1 n1	162.70	2.13	1.98
RWPE1 n2	134.70	2.12	1.98
RWPE1 n3	166.90	2.12	1.94
22Rv1 n1	338.90	2.14	1.81
22Rv1 n2	259.80	2.14	2.06
22Rv1 n3	1119.90	2.13	2.09
DU145 n1	819.50	2.14	2.14
DU145 n2	515.10	2.12	1.84
DU145 n3	468.00	2.10	1.90

Tabla 3: En esta tabla se presentan los resultados de la cuantificación de ARN extraído de tres líneas celulares de cáncer de próstata diferentes: **VCaP**, **22Rv1**, y **DU145** y una línea sana de células prostáticas: **RWPE1**. Se incluyen tres mediciones (réplicas) para cada línea celular (n1, n2, n3).

La cuantificación se basa en tres parámetros clave:

1. **ARN (ng/µL)**: Indica la concentración de ARN en nanogramos por microlitro.
2. **A260/A280**: Representa la relación de absorbancia a 260 nm y 280 nm. Es un indicador de la pureza del ARN en relación con proteínas. Un valor cercano a **2.0-2.2** sugiere ARN de buena calidad.
3. **A260/A230**: Otra medida de pureza que evalúa la posible contaminación con sales, compuestos orgánicos o fenol. Valores por encima de **2.0** se consideran óptimos.

Interpretación de los datos:

- **Concentración de ARN:**
 - La muestra **22Rv1 n3** tiene la concentración más alta (1119.9 ng/µL), mientras que **VCaP n3** tiene la más baja (121.5 ng/µL).
 - En general, las líneas **DU145** y **22Rv1** presentan concentraciones más altas que **VCaP** y **RWPE1**.
- **Pureza (A260/A280):**
 - Todos los valores están entre **2.09** y **2.14**, lo que sugiere ARN relativamente puro sin contaminación significativa de proteínas.
- **Pureza (A260/A230):**

- Las muestras **VCaP n2 (1.47)** y **VCaP n3 (1.45)** tienen los valores más bajos, lo que sugiere contaminación con sales o compuestos orgánicos.
- En contraste, las muestras de **DU145** y **22Rv1** tienen valores más altos, indicando mejor calidad

Ciclo umbral indica cuántos ciclos de amplificación son necesarios para detectar el gen.

A este se le conoce como Ct (Cycle Threshold)

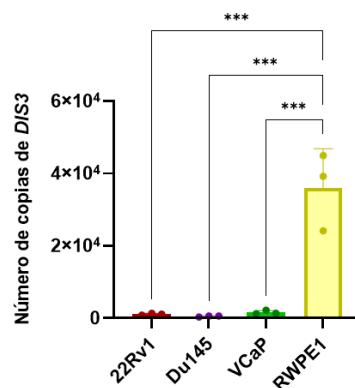
Valores de Ct más bajos significan que hay más copias de ARN, porque el gen se detecta temprano en el proceso de amplificación.

Valores de Ct más altos indican que hay menos copias de ARN, porque se necesitan más ciclos para alcanzar un nivel detectable.

Gráfica 1

En esta gráfica se interpreta la expresión del gen *D/S3* , en distintas líneas celulares de cáncer de próstata: VCaP ,DU145 y 22Rv1 y una línea celular de próstata sana RWPE1.

Este está sobreexpresado en RWPE1 (hasta 44,951 copias en n3).



Esto concuerda con los valores de Ct más altos para *D/S3* en 22Rv1, DU145 y VCaP, lo que indica que se necesita más amplificación para detectar el gen, es decir, que su expresión es baja.

RWPE1 expresa *D/S3* en niveles significativamente más altos que las otras líneas celulares. El número de copias de *D/S3* en RWPE1 es mucho mayor que en las demás líneas celulares. Por ejemplo, en RWPE1:

En la réplica n3, hay 44,951 copias de *D/S3*,

Mientras que en DU145 n3, hay solo 390 copias,

Esto significa que RWPE1 tiene más de 100 veces la cantidad de copias de *D/S3* en comparación con DU145 en esta réplica.

Esto sugiere que *D/S3* se transcribe en grandes cantidades en RWPE1, pero en muy bajas cantidades en DU145, VCaP y 22Rv1.

Esto se relaciona con el valor de los Ct debido que en el experimento de qPCR, el valor de

En los datos:

RWPE 1 tiene valores de Ct más bajos para *D/S3* (22.14 - 23.05), lo que significa que la cantidad de ARN es alta y se detecta rápidamente.

En Du145, VCaP y 22Rv1, los valores de Ct de *D/S3* son mucho más altos (27 - 29), lo que indica que el gen está menos expresado y necesita más ciclos de amplificación para detectarse.

RWPE 1 expresa *D/S3* en grandes cantidades, lo que sugiere que es un gen importante en células prostáticas sanas.

Du145, VCaP y 22Rv1 (líneas celulares de cáncer de próstata) muestran una fuerte reducción en la expresión de *D/S3*, lo que sugiere que este gen podría estar regulado negativamente en el cáncer.

Grafica 2

Estos valores muestran la representación de la expresión relativa del gen DIS3 en diferentes líneas celulares (22Rv1, Du145, VCaP), con RWPE 1 como referencia (100%).

Interpretación de la gráfica:

RWPE 1 tiene un valor de 100, lo que significa que se usa como referencia para comparar las otras líneas celulares.

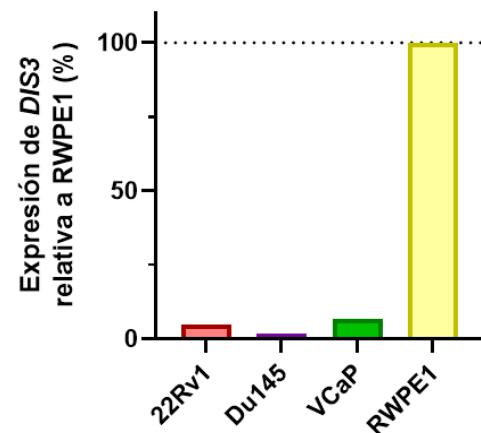
22Rv1: 5.0075 → La expresión de DIS3 en 22Rv1 es 5% de la expresión en RWPE 1 (es decir, mucho menor).

Du145: 1.8354 → La expresión de DIS3 en Du145 es 1.8% de la de RWPE1, indicando una reducción aún mayor.

VCaP: 6.8696 → La expresión en DIS3 es 6.87% en comparación con RWPE1, lo que significa que también es mucho menor.

Estos datos han sido obtenidos gracias a la enzima **GAPDH**.

La enzima GAPDH (gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) se utilizó como gen de referencia en este estudio para la normalización de la expresión del gen DIS3 en diferentes líneas celulares. GAPDH es una enzima clave en la glucólisis, pero en estudios de expresión génica se emplea como control endógeno debido a su expresión estable en la mayoría de los tejidos y células. La normalización con GAPDH permite corregir posibles variaciones en la cantidad de ARN utilizado en cada muestra, asegurando así una comparación precisa de la expresión relativa de DIS3 entre las líneas celulares analizadas. A partir de estos datos, se observó que la expresión de DIS3 en las líneas 22Rv1, Du145 y VCaP es significativamente menor en comparación con la línea RWPE1, tomada como referencia (100%).



7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos mostraron que la expresión del gen DIS3 se encuentra significativamente reducida en las líneas celulares VCaP, DU145 y 22Rv1 en comparación con la línea celular no tumoral RWPE1. Este hallazgo sugiere una posible regulación a la baja de DIS3 en líneas celulares de cáncer de próstata, en contraste con células sanas, lo cual podría asociarse con una menor estabilidad del ARN en las células tumorales.

- Comparación con estudios previos:

Estos resultados son consistentes con estudios realizados en mieloma múltiple y leucemia, donde también se ha observado que DIS3 actúa como un inhibidor de la proliferación de células malignas. En nuestra muestra, la línea RWPE1 presentó la mayor expresión de DIS3, alcanzando un valor de 44,95, mientras que en DU145 apenas llegó a 0,39, lo que confirma una expresión marcadamente reducida en esta línea tumoral.

En este contexto, la downregulation observada de *DIS3* en células tumorales frente a células normales podría indicar un mal funcionamiento de este componente, que forma parte del núcleo del exosoma de ARN, una maquinaria esencial para el procesamiento y degradación del ARN. Por lo tanto, una menor expresión de *DIS3* en células tumorales podría estar favoreciendo la acumulación de moléculas de ARN defectuosas o anómalas, al no actuar correctamente este mecanismo de control. Esta disfunción podría estar implicada en los procesos de inicio o desarrollo tumoral.

- Implicaciones biológicas

La baja expresión de *DIS3* en las líneas de cáncer puede relacionarse con la acumulación de subtranscritos aberrantes que promueven la proliferación normal de las células. Para la qPCR, los valores de Ct validaron esta disminución. Por ejemplo, el carcinoma RWPE-1 mostró valores bajos en el rango de 22.140-23.05. Las líneas de cáncer mostraron valores en los rangos de 27-29 marcando baja expresión.

- Conclusion

Estos hallazgos refuerzan la idea de que *DIS3* podría actuar como un regulador clave en el cáncer de próstata.

8. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio muestran una diferencia significativa en la expresión del gen *DIS3* entre las líneas celulares de cáncer de próstata (VCaP, DU145 y 22Rv1) y la línea celular epitelial prostática normal (RWPE1). La cuantificación de ARN indicó que las concentraciones varían entre las líneas celulares, con 22Rv1 y DU145 presentando mayores concentraciones que VCaP y RWPE1. No obstante, los análisis de pureza sugieren que algunas muestras, en particular de VCaP, podrían presentar contaminantes que podrían afectar la calidad del ARN.

El análisis de expresión génica mediante qPCR revela que *DIS3* está altamente expresado en RWPE-1, con una cantidad de copias mucho mayor en comparación con las líneas tumorales. En contraste, DU145, VCaP y 22Rv1 presentan una reducción drástica en la expresión de *DIS3*, lo que concuerda con sus valores de Ct más altos, indicando que se requiere un mayor número de ciclos para detectar el gen. La expresión relativa muestra que, en comparación con RWPE-1, la expresión de *DIS3* en 22Rv1 es del 5%, en DU145 solo del 1.8% y en VCaP del 6.87%, lo que confirma una reducción significativa en las líneas cancerígenas.

Estos resultados sugieren que *DIS3* podría desempeñar un papel relevante en la fisiología de las células prostáticas normales y que su disminución podría estar asociada con el desarrollo o progresión del cáncer de próstata. La utilización de GAPDH como gen de referencia permitió la normalización de los datos, asegurando la validez de las comparaciones entre las diferentes líneas celulares. Futuras investigaciones serán necesarias para determinar el impacto funcional de la disminución de *DIS3* en la carcinogénesis prostática y su posible implicación como biomarcador o diana terapéutica en esta enfermedad.

9. AGRADECIMIENTOS

Agradecemos profundamente a Antonio Prats Escribano y a Lourdes de la Mata Sáez su invaluable guía y asesoramiento a lo largo de esta investigación. También expresamos nuestra gratitud al equipo del IMIBIC por su apoyo técnico y por proporcionarnos los recursos necesarios para llevar a cabo este estudio, así como por brindarnos la oportunidad de realizar una investigación de prestigio y presentarla en un congreso internacional.

Agradecemos al IES Fidiana por brindarnos la oportunidad de participar en el proyecto Fidiciencia para proporcionarnos una situación de aprendizaje más inmersiva y práctica.

Finalmente, reconocemos la colaboración de nuestros colegas, cuyas aportaciones fueron fundamentales para la interpretación de los resultados.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Rogers, Kara. "exosome". Encyclopedia Britannica, 8 Sep. 2020, <https://www.britannica.com/science/exosome>.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method. *Methods*, 25(4), 402-408. <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1046202301912629?via%3Dihub>
- Complejo exosoma. (2024, 24 de enero). *Wikipedia, La enciclopedia libre*. Fecha de consulta: 12:45, enero 24, 2024 desde https://es.wikipedia.org/w/index.php?title=Complejo_exosoma&oldid=157617512.
- American Cancer Society. (s.f.). *Clasificación por etapas del cáncer de próstata*. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/cancer-de-próstata/detección-diagnóstico-clasificación-por-etapas/clasificación-por-etapas.html> (1)
- National Cancer Institute. (s.f.). *Tratamiento del cáncer de próstata (PDQ®)*. Bethesda: National Cancer Institute. https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/paciente/tratamiento-prostata-pdq#_102 (7)
- Housekeeping genes. Jo, J., Choi, S., Oh, J., Lee, S. G., Choi, S. Y., Kim, K. K., & Park, C. (2019). "Conventionally used reference genes are not outstanding for normalization of gene expression in human cancer research", *BMC Bioinformatics*, 20, 245. <https://bmcbioinformatics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12859-019-2809-2> (10)
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta CT$ method." *Methods*, 25(4), 402-408. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>. Proporciona la metodología utilizada para calcular la expresión relativa de DIS3 en nuestro experimento de qPCR.
- Schroeder, A., et al. (2006). "The RNA integrity number and its application to RNA quality control." *BMC Molecular Biology*, 7(1), <https://bmcmolbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2199-7-3>.