

ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES REGULADORES DEL METABOLISMO DEL ARN EN CÁNCER DE PRÓSTATA



ALUMNADO:

Luisa Martínez Moriana (1º Bach, Centro Zalima de Córdoba)
Estrella Moreno López (1º Bach, Centro Zalima de Córdoba)
Aarón Porras Moya (1º Bach, IES Fidiana de Córdoba))
Andrea Serrano Hernández (1º Bach, IES Fidiana de Córdoba)

PROFESORAS COORDINADORAS:

Mabel García Larrea (Centro Zalima de Córdoba)
Dra Elena León Rodríguez (IES Fidiana de Córdoba)

INVESTIGADOR:

Ignacio Gil Duque (Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, IMIBIC)

FIDIciencia



Junta de Andalucía
A
Zalima



UNIVERSIDAD
DE
CORDOBA



INSTITUTO MAIMÓNIDES DE
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
DE CÓRDOBA



ÍNDICE

ABSTRACT	3
1.- INTRODUCCIÓN	4
2.- OBJETIVO	4
3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
4.- MATERIALES Y MÉTODOS	7
4.1.- Variables de estudio	7
4.2.- Material experimental.....	7
4.3.- Diseño experimental	9
A)Extracción de ARN mensajero.....	9
B) Retrotranscripción de ARN mensajero (ARNm) a ADN copia (ADNc)	11
C) Cuantificación de transcritos mediante qPCR.....	11
4.4.-Planificación de la investigación	12
5.- RESULTADOS	13
5.1.- CALIDAD DEL ARN	13
5.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN qPCR.....	13
5.3.- CURVAS MELTING	14
5.3.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES	15
5.4.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS	16
6.-DISCUSIÓN	17
7.-CONCLUSIONES	18
8.- AGRADECIMIENTOS.....	18
9.- BIBLIOGRAFÍA	18

ABSTRACT

ALTERACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES REGULADORES DEL METABOLISMO DEL ARN EN CÁNCER DE PRÓSTATA

ALUMNADO: Martínez-Moriana, L.², Moreno-López, E². Porras-Moya A.¹, Serrano-Hernández, A.¹

PROFESORAS COORDINADORAS: García-Larrea M.², León-Rodríguez, E.¹

INVESTIGADOR: Gil-Duque, I.³

¹IES Fidiana

²Centro Zalima

³IMIBIC

RESUMEN

El cáncer de próstata representa la patología tumoral de mayor incidencia en la población masculina de países desarrollados. Actualmente, a pesar del reciente desarrollo de nuevas terapias, el cáncer de próstata continúa siendo letal en etapas avanzadas, por lo que resulta crucial el desarrollo de nuevas dianas diagnósticas, pronósticas y/o terapéuticas globales y efectivas. En este sentido, se ha descrito que la desregulación de los mecanismos de control del ARN presenta un papel crucial en diversos tipos tumorales. Así, la posible desregulación de algunas de estas maquinarias, incluyendo el Nonsense-Mediated Decay (**NMD**), en cáncer de próstata puede estar asociada al inicio, progresión, agresividad de estos tumores. Por ello, en este proyecto analizamos la posible desregulación de la maquinaria del **NMD** en respuesta a uno de los fármacos más utilizados en cáncer, Everolimus. Mediante extracción de ARN, retrotranscripción y PCR cuantitativa (**qPCR**), se midió la expresión de los genes *CNOT4* y *RUVBL1*, claves en el funcionamiento del **NMD**. De ellos, se demostró que el tratamiento con **Everolimus** disminuyó la expresión de *CNOT4* en líneas de cáncer de próstata, mientras que aumentaba la expresión de *RUVBL1*. En conclusión, el tratamiento con Everolimus en cáncer de próstata podría modular la expresión y funcionamiento del **NMD**.

Palabras Clave: Cáncer de Próstata; Nonsense-mediated Decay; Everolimus; qPCR; ARN.

ABSTRACT

Prostate cancer is the most prevalent tumour pathology among the male population in developed countries. Despite recent advances in new therapies, prostate cancer remains lethal in its advanced stages, making the development of new global and effective diagnostic, prognostic, and/or therapeutic targets crucial. In this regard, dysregulation of **RNA** control mechanisms has been shown to play a key role in various tumour types. Specifically, the possible dysregulation of some of these pathways, including Nonsense-Mediated Decay (**NMD**), in prostate cancer may be associated with tumour initiation, progression, and aggressiveness. Therefore, in this project, we analyse the potential dysregulation of the **NMD** machinery in response to one of the most commonly used drugs in cancer treatment, **Everolimus**. By performing **RNA** extraction, reverse transcription, and quantitative PCR (**qPCR**), we measured the expression of the *CNOT4* and *RUVBL1* genes, which are key to **NMD** function. Our results showed that Everolimus treatment reduced *CNOT4* expression in prostate cancer cell lines, while increasing *RUVBL1* expression. In conclusion, Everolimus treatment in prostate cancer could modulate the expression and function of the **NMD** pathway.

Keywords: Prostate Cancer; Nonsense-Mediated Decay; Everolimus; qPCR; RNA.

1.- INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata representa la patología tumoral de mayor incidencia en la población masculina de países desarrollados. Actualmente, la principal terapia consiste en el bloqueo de la señalización por andrógenos. Sin embargo, un gran número de pacientes se vuelven resistentes a la misma, progresando hacia el tipo más agresivo de esta enfermedad, el cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC). A pesar del reciente desarrollo de inhibidores de la señalización del receptor de andrógenos (AR), el CRPC continúa siendo letal, por lo que resulta crucial el desarrollo de nuevas dianas diagnósticas, pronósticas y/o terapéuticas globales y efectivas útiles para el manejo del cáncer de próstata. En este sentido, se ha descrito recientemente que la desregulación de los mecanismos de control del metabolismo del ARN presenta un papel crucial en diversos tipos tumorales. Así, la posible desregulación de algunas de estas maquinarias de control (e.g. nonsense-mediated decay) en cáncer de próstata puede estar asociada al inicio, progresión, agresividad de estos tumores.

Por ello, la hipótesis del proyecto es que la desregulación de la maquinaria del NMD (Nonsense-mediated Decay) puede estar asociada a la fisiopatología del cáncer de próstata.

2.- OBJETIVO

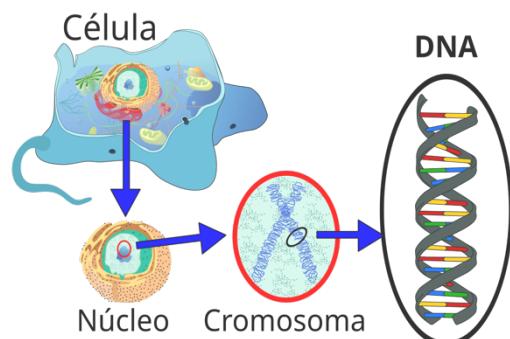
Analizar la expresión de marcadores de agresividad en cáncer de próstata y componentes reguladores del metabolismo del ARN en respuesta al tratamiento de células tumorales con inhibidores farmacológicos

3.- FUNDAMENTOS TEÓRICOS

El organismo está formado por más de 200 tipos de células diferentes, las que son como pequeños ladrillos y en su conjunto, forman tejidos y órganos, permitiendo que el cuerpo funcione. Las células son las unidades funcionales básicas y su estructura interna es compleja.

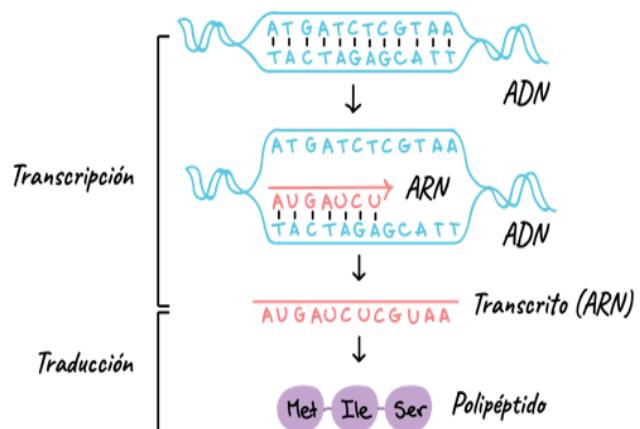
Puede asimilarse a un pequeño departamento con distintas habitaciones (organelos) que permiten que todo funcione. Uno de los organelos importantes para entender el proceso de un cáncer, es el núcleo, donde se ubica el ADN y se encuentran los genes que se encargan de controlar la reproducción de las células, entre otras funciones.

El ADN un ácido nucleico que contiene las instrucciones genéticas fundamentales para el desarrollo, funcionamiento y reproducción de todos los seres vivos; también es responsable de la transmisión hereditaria. El ADN es como un libro de recetas, pero en vez de indicar cómo cocinar, contiene instrucciones para hacer las proteínas, que son las "herramientas" y "materiales" que construyen y mantienen al cuerpo humano.



El dogma central de la biología molecular es una especie de "ley" que explica cómo la información en las células se transforma para que sea posible la vida y la realización de las funciones vitales. La información en el ADN no se usa directamente; sigue un camino en tres pasos:

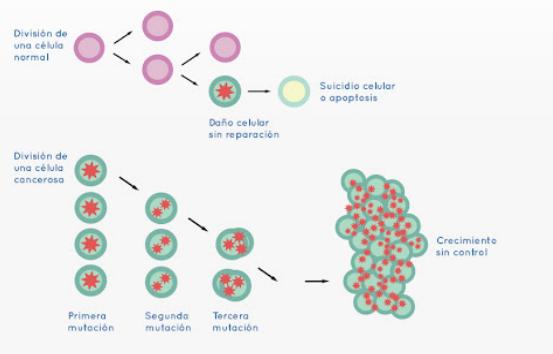
1. Replicación: Primero, el ADN se copia a sí mismo cuando una célula se va a dividir. Así, cada nueva célula tiene una copia exacta del manual de instrucciones.
2. Transcripción: Cuando la célula necesita fabricar una proteína específica, toma un trocito de la información en el ADN y lo convierte en ARN, un "mensajero" que lleva la receta desde el núcleo de la célula hasta donde se necesita.
3. Traducción: Finalmente, este ARN mensajero se usa para "traducir" la receta en una proteína. Las proteínas se fabrican usando pequeños ingredientes llamados aminoácidos, que se colocan en el orden correcto según las instrucciones del ARN.



En condiciones normales, las células crecen y se dividen para formar nuevas, a medida que el organismo las necesita. Cuando una de ellas envejece, se daña o muere, es reemplazada por otra. Este proceso se llama división celular, el cual se realiza de manera ordenada y controlada.

El cáncer se asemeja a las células del cuerpo olvidando las reglas y empezando a comportarse incorrectamente. Normalmente, las células crecen y se dividen solo cuando es necesario, pero en el cáncer, algo en su "manual de instrucciones" (el ADN) se daña y causa que las células crezcan sin control.

Estas células "rebeldes" se multiplican, formando masas llamadas tumores. Algunas de ellas incluso pueden viajar a otras partes del cuerpo, lo que es más peligroso.



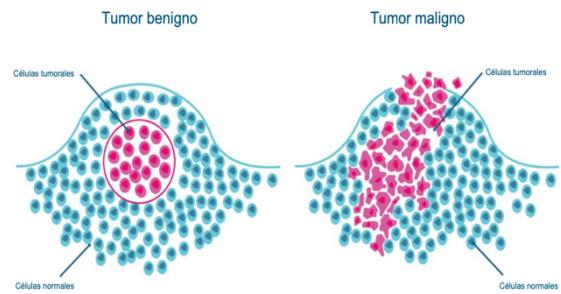
TIPOS DE CÁNCER.

- Benignos: Las células se multiplican de forma descontrolada generando un incremento, sin extenderse a otras partes del cuerpo. Su estructura y función son normales, es decir, no provocan cáncer. No presenta riesgo para la vida del paciente, pero si no es tratado a tiempo, puede convertirse en tumor maligno o canceroso.

- **Malignos:** Se trata de células anormales que pierden el control del crecimiento y se extienden a otros tejidos, lo que produce cáncer. Por definición, el término "cáncer" se aplica sólo a los tumores malignos.

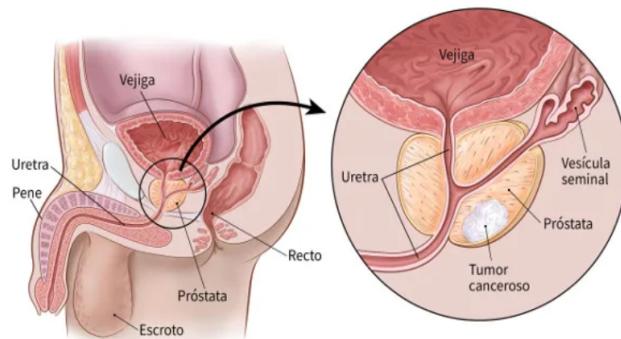
El cáncer es una enfermedad frecuente (según la OMS), el número de casos nuevos a nivel mundial en el 2020, fueron 19,3 millones y se estima que para el año 2040 sean 30,2 millones.

Los cánceres con mayor incidencia a nivel nacional son próstata, colorrectal y mama y aquellos con mayor mortalidad son pulmón, gástrico y colorrectal.



EL CÁNCER DE PRÓSTATA.

La próstata es una pequeña glándula que solo tienen los hombres. Está justo debajo de la vejiga y rodea parte de la uretra, que es el conducto por donde pasa la orina.



El cáncer de próstata ocurre cuando algunas células de esta glándula empiezan a crecer de forma descontrolada. Si no se detecta a tiempo, el cáncer de próstata puede crecer más allá de la glándula y afectar otras partes del cuerpo, pero si se detecta temprano, suele ser tratable.

MECANISMOS REGULADORES DEL ARN

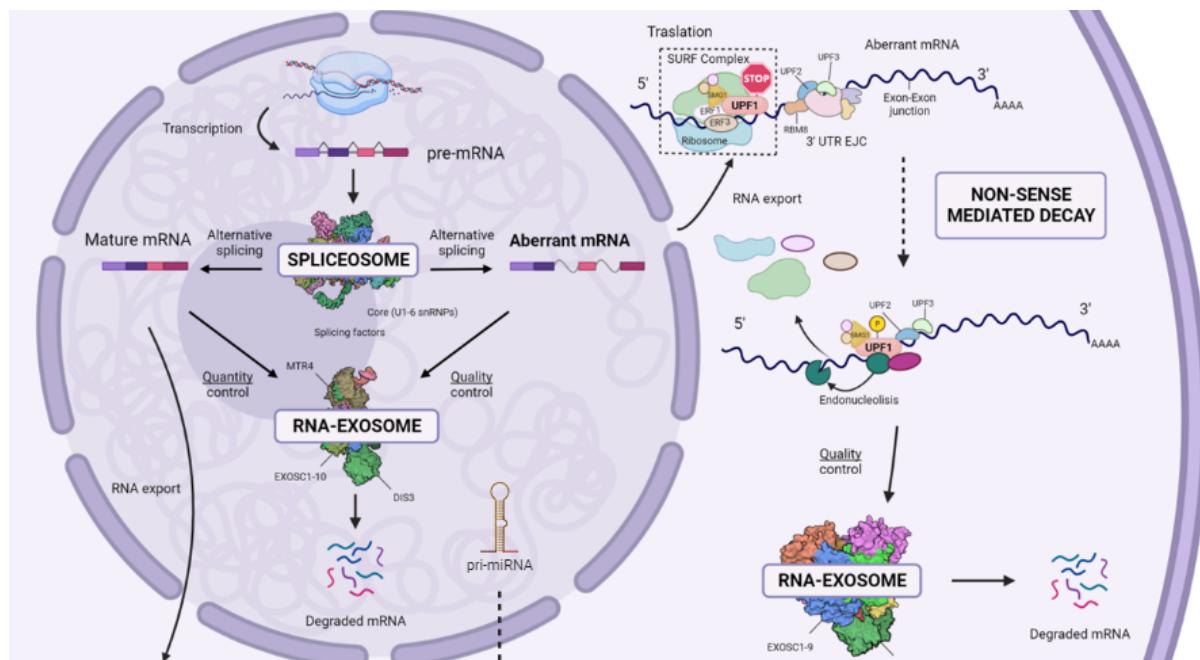
Dentro de las células, hay sistemas que actúan como "guardianes" para asegurarse de que las instrucciones del ADN, que pasan al ARN, se usen correctamente para crear proteínas. Estos guardianes son importantes porque, si algo sale mal en la información del ARN, se podrían producir proteínas defectuosas, lo que a veces contribuye a enfermedades como el cáncer.

Es importante estudiarlos porque en el cáncer, a veces estos "guardianes" no funcionan bien, permitiendo que las células cancerosas hagan ARN y proteínas anormales que las ayudan a crecer y a evadir el control. Al estudiar el ARN exosoma y el NMD, los científicos esperan encontrar maneras de reforzar o mejorar estas maquinarias para eliminar ARN dañinos y frenar el crecimiento del cáncer.

Uno de estos guardianes es la maquinaria del RNA-Exosoma. Este sistema es como una "trituradora de basura" para el ARN. Cuando la célula detecta que un ARN que no está

funcionando bien o no se necesita, el exosoma lo descompone y lo elimina. Así, evita que estos mensajes defectuosos puedan usarse para crear proteínas que podrían ser peligrosas para la célula

El **NMD** es un sistema que controla la en ARN mensajero y evita la expresión de proteínas erróneas. Se encarga de degradar selectivamente el ARN que contiene mutaciones. Además, no solo tiene la capacidad de limitar la traducción de proteínas anormales, sino que ocasionalmente puede causar efectos perjudiciales en mutaciones genéticas específicas.



4.- MATERIALES Y MÉTODOS.

4.1.- Variables de estudio

En este proyecto de investigación se han utilizado dos tipos de variables.

Variable independiente: El tratamiento con Everolimus. Es la variable que se utilizó para observar su efecto en la expresión de los genes relacionados con el NMD.

Variable dependiente: La expresión de los genes CNOT4 y RUVBL1, medida mediante qPCR. Esta variable depende del tratamiento con Everolimus, ya que se observó que su aplicación disminuye la expresión de CNOT4 y aumenta la de RUVBL1.

4.2.- Material experimental

- **Pellet de células** (22Rv1, LNCap, etc.) (pequeño concentrado de células obtenido al centrifugar una muestra biológica).
- **TRIzol** (reactivo utilizado para extraer ARN, ADN)



- **Cloroformo** (solvente para la extracción de compuestos orgánicos y en la separación de fases durante procesos)
- **Isoproanol** (alcohol utilizado en la precipitación de ácidos nucleicos)
- **Etanol 75 %** (alcohol utilizado para la precipitación de ácidos nucleicos)
- **H₂O libre de ARNasas** (agua purificada que no contiene enzimas ARNasa)
- **Kit de retrotranscripción** (conjunto de reactivos y enzimas utilizado para convertir ARN en ADNc)
- **Primers** (cebadores)
- **Master Mix** (fluoróforo SYBR) de PCR (mezcla preconfigurada utilizada en PCR)



- **Micropipetas y puntas** (Las micropipetas son instrumentos usados para medir y transferir volúmenes muy pequeños con precisión. Las puntas son accesorios desechables que se colocan en la parte superior de las micropipetas para evitar la contaminación)



- **Centrífuga refrigerada** (equipo que separa componentes de una muestra mediante rotación a alta velocidad, mientras mantiene la temperatura controlada)



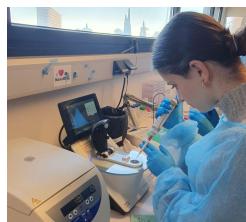
- **Tubos de 1,5 ML**



- **Placas de PCR** (dispositivos de plástico con múltiples pocillos pequeños, utilizados para realizar reacciones de PCR en múltiples muestras simultáneamente)



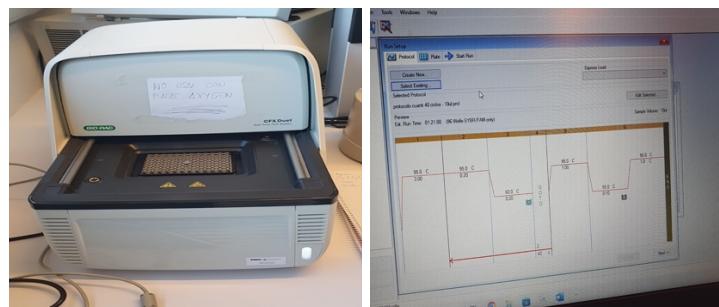
- **Espectrofotómetro/Nanodrop** (instrumento que mide la cantidad de luz absorbida o transmitida por una muestra)



- **Termobloques** (dispositivos que proporcionan control preciso de la temperatura)



- **Termociclador de qPCR** (equipo que realiza la amplificación del ADN en tiempo real mediante ciclos de temperatura controlada)



4.3.- Diseño experimental

La investigación se llevó a cabo en las siguientes etapas:

A) Extracción de ARN mensajero

Preparación previa

Se trabajó en la campana, se mantuvo el PBS en hielo, y se preparó un contenedor para desechar el TRIzol adecuadamente. Se sacaron dos alícuotas de glicógeno y del Buffer de la DNAsa, manteniéndolos en hielo. Además, se colocaron dos termobloques a 65 °C y 37 °C.

Extracción de ARN a partir de pellet celulares

- En primer lugar, el procedimiento fue realizado dentro de la campana. Las placas con las células fueron colocadas en hielo y el medio fue retirado utilizando punta azul+ blanca (2 ml). Luego, las células fueron lavadas con PBS (1 ml) por un lateral para evitar su desprendimiento y sin tocar las muestras con las puntas. Posteriormente, se agitó suavemente.
- A continuación, se vertieron 600 μ l de TRIzol en el centro de cada pocillo y se utilizó una pipeta de 770 μ l para asegurar la recolección total del contenido. La mezcla fue pipeteada varias veces hasta obtener un aspecto mucoso y luego transferida a un eppendorf rotulado desecharable. Las muestras fueron colocadas en hielo y posteriormente almacenadas a -80 $^{\circ}$ C.
- Si las muestras estaban congeladas, fueron descongeladas continuamente; en caso contrario, se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente (RT). Luego, se añadieron 120 μ l de cloroformo a cada tubo con TRIzol. Para evitar la contaminación cruzada, se utilizaron las mismas puntas tocando solo las paredes del tubo. Se dejó reposar a RT entre 2-3 minutos y se centrifugó a 4 $^{\circ}$ C durante 15 minutos a 11,400 rpm.
- Dos alícuotas de glicógeno fueron extraídas de -20 $^{\circ}$ C, descongeladas y sometidas a un spin. Se prepararon tubos limpios "free RNase", a los que se añadió 1 μ l de glicógeno en el fondo. La fase acuosa transparente, que contenía el ARN, fue recogida con cuidado de no tocar la fase rosa. Se utilizó una doble punta y la recolección se realizó en volúmenes de 100-200 μ l, transfiriéndolos a los tubos con glicógeno.
- Los tubos con ARN fueron colocados en hielo. Se añadieron 300 μ l de isopropanol para precipitar y concentrar el ARN, mezclando la solución por inversión durante 20 segundos e incubando a RT por 10 minutos. Posteriormente, la mezcla fue centrifugada a 4 $^{\circ}$ C durante 10 minutos a 11,400 rpm.
- Se eliminó el sobrenadante con una pipeta p1000 de doble punta sin apurar demasiado. Luego, se realizó un lavado con etanol al 75 % frío, se agitó por inversión y se centrifugó a 4 $^{\circ}$ C durante 5 minutos a 9,000 rpm. El etanol fue eliminado y el pellet se secó al aire durante 3-4 minutos, eliminando las gotas con papel de filtro sin secar en exceso para evitar la transparencia del pellet.

Tratamiento con DNAsa

El pellet fue resuspendido en 8 μ l de H₂O DEPC y, en caso de que no se disolviera, fue colocado en hielo. Se añadió 1 μ l de buffer 10x para DNAsa (descongelado previamente en la mano y mantenido en hielo hasta su uso) y 1 μ l de DNAsa (stock -20 $^{\circ}$ C), depositándolo en el fondo del tubo antes de pipetear varias veces.

Las muestras fueron sometidas a un spin en la centrífuga y luego incubadas durante 30 minutos a 37 $^{\circ}$ C. Tras este tiempo, se realizó un nuevo spin y se colocaron en hielo. Se añadió 1 μ l de solución STOP, seguido de un spin, y se incubó durante 10 minutos a 65 $^{\circ}$ C. Posteriormente, las muestras fueron colocadas en hielo, se realizó otro spin y se cuantificó 1 μ l en el NanoDrop. Finalmente, las muestras fueron almacenadas a -80 $^{\circ}$ C.

Determinación de la concentración y calidad del ARN extraído. La concentración y calidad del ARN extraído fueron evaluadas utilizando NanoDrop.

B) Retrotranscripción de ARN mensajero (ARNm) a ADN copia (ADNc)

Las muestras fueron descongeladas y cuantificadas con el NanoDrop. Se prepararon los eppendorf rotulados con 11 μ l de agua y ARN. Luego, se realizó un spin en la centrífuga a 4 °C y se añadió 1 μ l de Random Primers, depositándolo en la pared del eppendorf para verificar su adición. Se realizó un spin para asegurarse de que el reactivo bajara completamente.

Se incubó la mezcla durante 5 minutos a 65 °C. Mientras tanto, la mezcla de reacción (MIX) fue preparada y mantenida en hielo. Después de la incubación, se realizó otro spin para recuperar lo evaporado y se añadió la MIX, resuspendiendo con la pipeta.

La mezcla fue incubada durante 5 minutos a RT y posteriormente a 42 °C durante 1 hora para la transcripción. Una vez finalizado el proceso, se incubó a 70 °C durante 5 minutos para desnaturizar la enzima. Así, el ADNc fue obtenido y almacenado en congelación.

C) Cuantificación de transcritos mediante qPCR

Las muestras, primers y curva fueron descongelados en hielo. Las enzimas (SYBR, fluoróforo y polimerasa en la Master Mix) fueron retiradas del almacenamiento justo antes de su uso.

Se encendieron el instrumento, el ordenador y la lámpara del termociclador qPCR. Se abrió el programa Mxpro, seleccionando la opción **SYBR Green (with dissociation curve)**. Se esperó a que la lámpara se encendiera completamente (indicador en verde).

Se preparó una mezcla en un tubo eppendorf para cada secuencia, conteniendo primers, dNTPs, H_2O y la Master Mix. La mezcla fue calculada para un mínimo de dos reacciones (nunca una sola), incluyendo entre 3-4 pocillos adicionales para minimizar errores. Todo el procedimiento se realizó sobre hielo para preservar la temperatura.

La Master Mix y H_2O fueron añadidas a las muestras ya descongeladas. Luego, se agregaron los primers necesarios y se realizó un vórtex antes de su uso. La mezcla fue homogenizada con la pipeta, sometida a vórtex y spin.

Las placas de 96 pocillos cónicos fueron preparadas y se añadieron 19 μ l por pocillo, utilizando la misma punta para las muestras del mismo gen y evitando introducirla demasiado. Se realizó un doble pipeteo para garantizar la correcta transferencia del líquido. Durante este procedimiento, se evitó hablar debido a la presencia de compuestos sensibles.

Finalmente, los tubos fueron agitados, se tomó 1 μ l de cada muestra con el menor contacto posible y se inició el proceso de qPCR

Se utilizó una caja grande con hielo, junto con puntas (azules, amarillas y blancas) y PBS 1x. También se emplearon los siguientes reactivos: **Trizol Reagent, cloroformo, isopropanol, etanol al 75 % y glicógeno**.

El procedimiento fue realizado dentro de una campana extractora. Se prepararon tubos eppendorf de la siguiente manera:

- Se utilizaron **X tubos eppendorf (free RNase)** numerados del 1 al 24 para la recolección en Trizol.
- Se prepararon **X tubos eppendorf (free RNase)** correctamente marcados con la información correspondiente (tipo de células, fecha, tratamiento, etc.) para la recolección de la fase acuosa y su conservación.

Preparación de la MIX (8 μ l/muestra):

Para cada muestra, se preparó una mezcla que contenía:

- 4 μ l de Buffer
- 2 μ l de dNTPs (10 mM)
- 1 μ l de Ribolock* (para bloquear las ARNsas)
- 1 μ l de RetroTranscriptasa*

Además, se añadió una muestra extra por cada cinco procesadas para compensar posibles errores de pipeteo.

Precauciones tomadas:

- Las muestras, primers, agua, dNTPs y buffer fueron mantenidos en hielo.
- Los bloques térmicos fueron calentados a 65 °C y 42 °C, y posteriormente otro fue ajustado a 70 °C.
- Se preparó el mismo número de tubos que muestras, más uno extra para la MIX.
- Se realizaron los cálculos necesarios, considerando que una retrotranscripción normal requería entre 500-2000 ng de ARN (óptimo 1000 ng).

Ejemplo de cálculo realizado: Para una muestra con 50,5 ng de ARN en 1 μ l: 1000 ng ----- x μ l

El volumen total utilizado fue 11 μ l (ARN + agua). En caso de que los cálculos indicaran la necesidad de más de 11 μ l, se añadieron hasta 11 μ l de ARN sin agua, teniendo en cuenta esta modificación para la qPCR.

4.4.-Planificación de la investigación

Investigación realizada en tres sesiones presenciales en el Instituto Maimónides de Investigación Biomédica (IMIBIC) de Córdoba y sesiones on-line para la elaboración de los documentos.

- **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.

- **Sesiones online mediante documentos compartidos en Google-Drive**

Se trabajaron los documentos en forma plantilla en carpetas compartidas online. De esta manera todo el grupo trabaja en el desarrollo y van siguiendo las indicaciones de los tutores IES coordinadores.

- Preparación de un resumen/abstract
- Preparación de una memoria de investigación
- Preparación de un póster/panel
- Preparación de una presentación en diapositivas
- Preparación del texto de la exposición para la defensa en el congreso

5.- RESULTADOS

5.1.- CALIDAD DEL ARN

Tabla 1. Determinación de la concentración y calidad del ARN

Muestra	ng/μl	A260/A280	A260/A230	A260	A280
1	169,5	2,12	2,07	4,24	2,00
2	425,2	2,15	1,68	10,63	4,96
3	291,8	2,13	2,06	7,29	3,42
4	393,9	2,14	1,67	9,85	4,59
5	1136,9	2,13	2,13	28,42	13,37
6	771,2	2,12	2,11	19,28	9,10

Utilizando el Nanodrop se midió el nivel de concentración de las muestras de ARN (Tabla 1) y su pureza, ya que esto es necesario para determinar si eran válidas y realizar los cálculos de retrotranscripción. La relación A 260/A230 debe ser en torno a 2 y como se puede apreciar en la Tabla 1, todas lo cumplían. Los valores A260/A280 en torno a 3+2 y valores de la relación A260/A230 en torno a 2, nos indica que no contamina con solventes orgánicos (etanol, isopropanol...). Es por ello, que se concluyó una calidad y concentración adecuada del ARN extraído.

5.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN qPCR

Tabla 2. Ciclos obtenidos en qPCR

	DMSO			Everolimus		
	n1	n2	n3	n1	n2	n3
ACTB	17,85	17,42	17,25	18,05	17,61	17,75
	17,74	17,91	17,49	17,87	17,8	17,56
CNOT4	24,21	24,1	24	25,49	25,32	25,35
	24,35	24,22	23,9	25,6	25,37	25,27
RUVBL1	26,29	26,15	26,02	25,4	25,27	25,19
	26,17	26,2	26,11	25,55	25,3	25,28

Las unidades de medida representadas en esta tabla corresponden a los ciclos umbral (*Ct*) de una reacción de PCR en tiempo real. El valor *Ct* es el número de ciclos de amplificación necesarios para que la señal de fluorescencia supere el umbral predefinido. En esta **tabla 2** se muestran los valores *Ct* de tres genes (**ACTB**, **CNOT4**, y **RUVBL1**) en condiciones de **DMSO** (control) y **Everolimus** (Tratamiento) con tres réplicas biológicas (*n1*, *n2* y *n3*)

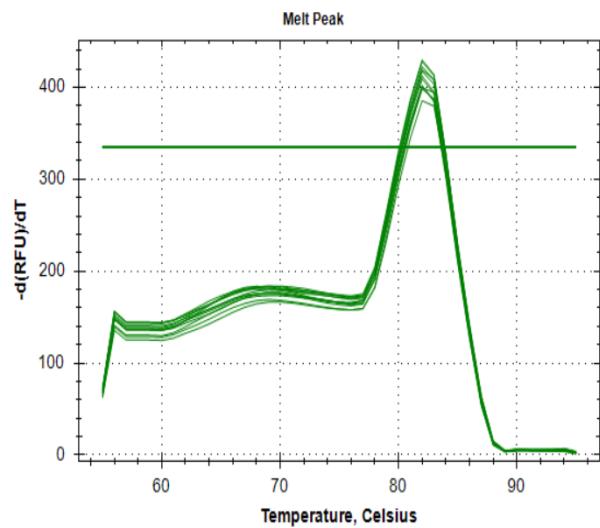
Tabla 3.- Niveles de expresión de los genes en porcentaje respecto a la temperatura (%)

	DMSO			Everolimus		
	<i>n1</i>	<i>n2</i>	<i>n3</i>	<i>n1</i>	<i>n2</i>	<i>n3</i>
ACTB	326266,17	364004,44	445677,11	289783,42	348872,56	361783,41
CNOT4	10444,38	11332,83	13076,89	4400,93	5042,13	5165,26
RUVBL1	2757,14	2860,68	3084,84	4619,20	5252,51	5437,22

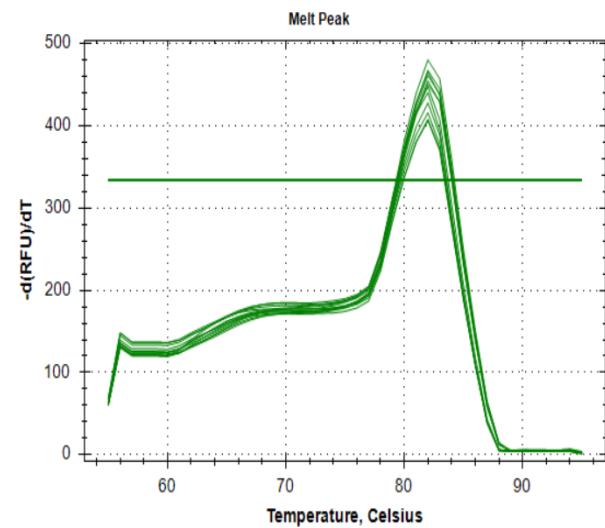
n1, n2, n3: réplicas biológicas idénticas. DMSO: control. Everolimus: tratamiento. Inhibidor potente del crecimiento y proliferación de las células del tumor. ACTB: Gen utilizado como control que no cambia su expresión a esa temperatura. CNOT4 y RUVBL1: genes ensayados. En la tabla 3, la unidad de medida está expresada en valores relativos de expresión génica (%), calculados en función de la temperatura.

5.3.- CURVAS MELTING

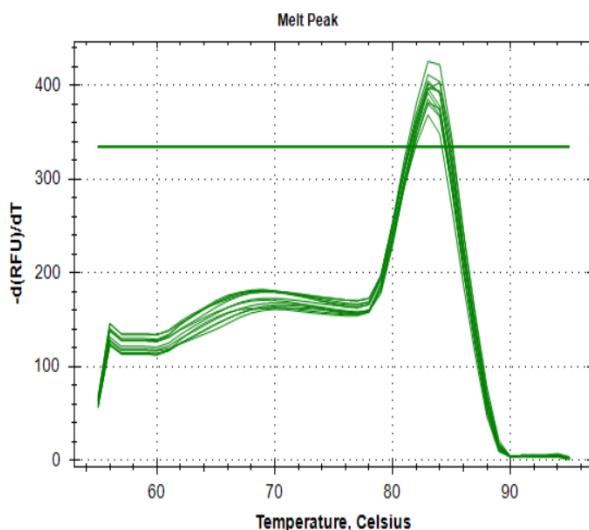
A



B

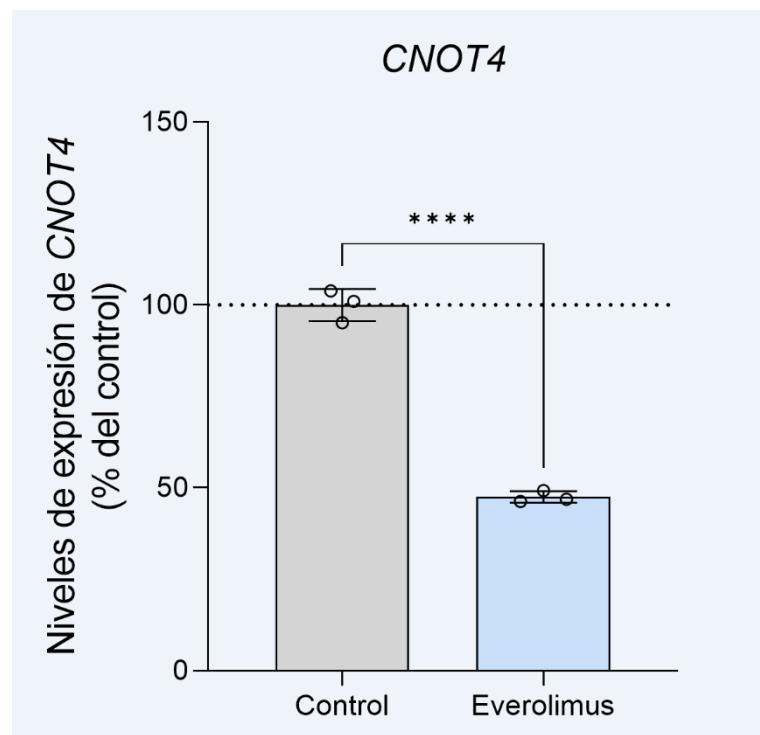


C



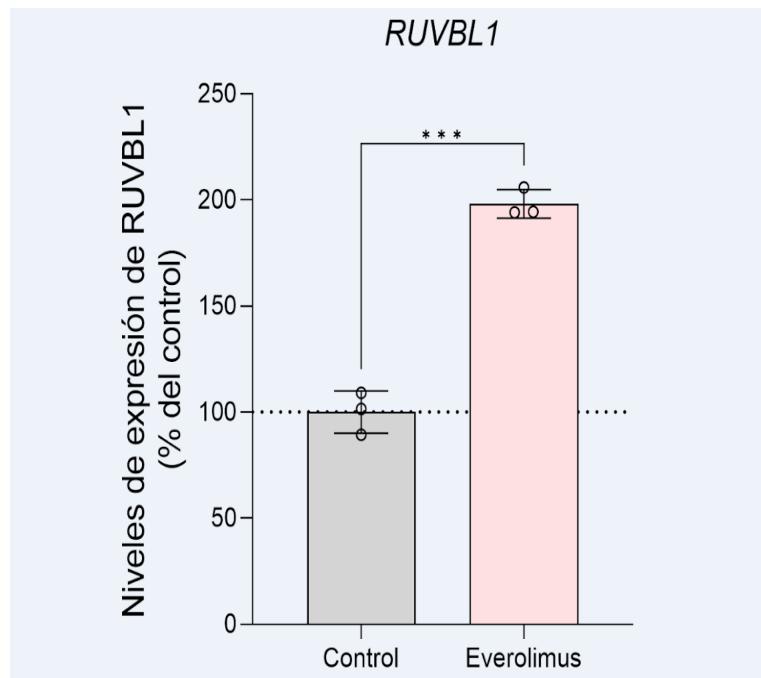
Como se puede comprobar en la Gráfica 1, todos los genes mostraron un único pico de temperatura melting en torno a 80°C. Ello nos indica que los primers que se han usado en la qPCR de cada gen son específicos.

5.3.- NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES



Gráfica 2: Niveles de expresión del gen CNOT4 en condiciones de DMSO (control) y en tratamiento con Everolimus. Se indica el error de medida (barra de error) de las tres medidas realizadas

De esta gráfica se concluye que el tratamiento con Everolimus reduce significativamente la expresión del gen CNOT4 en comparación con el control. Esto indica que Everolimus podría estar inhibiendo la expresión de CNOT4, lo que podría afectar su función en la célula.



Gráfica 2: Niveles de expresión del gen RUVBL1 en condiciones de DMSO (control) y en tratamiento con Everolimus. Se indica el error de medida (barra de error) de las tres medidas realizadas

De esta gráfica se puede concluir que el tratamiento con Everolimus aumenta significativamente la expresión del gen RUVBL1 en comparación con el control.

Esto sugiere que Everolimus podría inducir la activación de RUVBL1, lo que podría estar relacionado con sus efectos celulares.

Como conclusión general: el tratamiento con Everolimus modula diferencialmente la expresión de estos genes, aumentando RUVBL1 y disminuyendo CNOT4. Esto sugiere que el fármaco podría estar regulando procesos celulares específicos relacionados con la proliferación.

5.4.- TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Para realizar la comparación de los niveles de expresión de los genes *CNOT4* y *RUVBL1* entre ambas condiciones (control y tratamiento con Everolimus), se realizó una prueba de normalidad de los conjuntos de datos obtenidos mediante el test de Shapiro-Wilk. Tras demostrar que los conjuntos de datos siguen una distribución normal, se realizó una prueba t de Student para cada uno de ambos genes, estableciendo los niveles de significancia: no significativo (p -valor $> 0,05$), * (p -valor $< 0,05$), ** (p -valor $< 0,01$), *** (p -valor $< 0,001$), **** (p -valor $< 0,0001$). Los resultados de la prueba t de Student se indican en cada una de las gráficas de expresión.

6.-DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio proporcionan una visión valiosa sobre la eficacia del proceso de extracción de ARN, retrotranscripción y PCR cuantitativa en la medición de la expresión génica en líneas de cáncer de próstata. En particular, el análisis de los genes CNOT4 y RUVBL1, ambos involucrados en el proceso de NMD (Nonsense-Mediated Decay), ha revelado efectos interesantes respecto al tratamiento con Everolimus.

En primer lugar, la disminución observada en la expresión de CNOT4 en las líneas de cáncer de próstata tratadas con Everolimus coincide con lo descrito en estudios previos, donde se ha indicado que la modulación de esta proteína podría tener implicaciones importantes en la regulación del NMD. Este hallazgo sugiere que Everolimus podría estar ejerciendo un efecto específico sobre las rutas de procesamiento y eliminación de ARN defectuoso, lo cual podría tener repercusiones en la progresión del cáncer.

Por otro lado, el aumento de la expresión de RUVBL1 es un resultado que no se había descrito ampliamente en estudios anteriores sobre el tratamiento con Everolimus. La sobreexpresión de este gen podría indicar una posible activación de mecanismos compensatorios o de adaptación celular, en un intento de regular el estrés genómico y promover la supervivencia celular en condiciones de tratamiento. Este fenómeno podría ser un área prometedora para futuras investigaciones, ya que sugiere que el tratamiento con Everolimus no solo actúa a través de la inhibición de una vía, sino que también podría inducir una serie de respuestas celulares que aún no se entienden completamente.

A pesar de estos resultados prometedores, es importante señalar algunas limitaciones de este estudio. En primer lugar, la muestra de líneas celulares de cáncer de próstata utilizada podría no reflejar completamente la heterogeneidad clínica de los pacientes. Además, aunque hemos medido la expresión de dos genes clave en el proceso de NMD, la interacción entre estos y otras proteínas podría ser más compleja de lo que los resultados actuales sugieren.

En cuanto a las implicaciones, los resultados de este estudio abren la puerta a investigaciones futuras sobre cómo Everolimus podría influir en el NMD y otros mecanismos de respuesta celular en el cáncer de próstata. Sería relevante explorar si estos efectos se mantienen en modelos animales o en estudios clínicos y cómo podrían integrarse con otros tratamientos terapéuticos en la lucha contra el cáncer.

En resumen, el tratamiento con Everolimus muestra un impacto significativo sobre la expresión de los genes involucrados en el NMD en líneas de cáncer de próstata, sugiriendo un posible papel en la modulación de este proceso y en la respuesta celular ante el tratamiento.

7.-CONCLUSIONES

- El tratamiento con Everolimus disminuye la expresión de CNOT4 en líneas de cáncer de próstata, mientras que, por otro lado, este tratamiento aumenta la expresión del gen RUVBL1.
- En conclusión, el tratamiento con Everolimus en cáncer de próstata podría modular la expresión y funcionamiento del NMD, aunque sería necesario explorar los distintos mecanismos con los que se podría alterar el efecto del NMD y su relación con el cáncer de próstata.

8.- AGRADECIMIENTOS

Nos gustaría agradecer a todas aquellas personas que nos han guiado durante el proyecto y sin las cuales no hubiéramos tenido éxito.

Al investigador Ignacio Gil Duque por su dedicación, esfuerzo y paciencia, que ha hecho posible el proyecto y nos ha enseñado el trabajo en el laboratorio además de guiar nuestra investigación.

A la junta de Andalucía y al proyecto del ministerio de Ciencia Innovación y universidades con código: PID2022-1381850B-100

A las profesoras coordinadoras, Mabel García Larrea y Elena León Rodríguez, quienes nos han acompañado durante las diferentes sesiones y han organizado nuestro trabajo.

Al Instituto Maimónides de Investigación Biomédica, donde hemos realizado nuestras prácticas y nos han acogido como a cualquiera de sus investigadores.

Al IES Fidiana por estructurar el proyecto y proporcionarnos una plaza en él. También al Centro Zalima y al IES Fidiana por fomentar la participación de los jóvenes en la ciencia.

Al Proyecto Fidiciencia 3.0, *Proyecto de Innovación Educativa y Desarrollo Curricular de la Junata de Andalucía*, que nos ha permitido crecer como futuros miembros de la comunidad científica.

Al grupo GC27 “OncObesidad y Metabolismo”, del IMIBIC

9.- BIBLIOGRAFÍA

- <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata>
- Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12, 31-46, doi:10.1158/2159-8290.Cd-21-1059 (2022).
- Jiménez-Vacas, J. M. et al. Spliceosome component SF3B1 as novel prognostic biomarker and therapeutic target for prostate cancer. *Transl Res* 212, 89-103, doi:10.1016/j.trsl.2019.07.001 (2019).

- Bonnal SC, López-Oreja I, Valcárcel J. Roles and mechanisms of alternative splicing in cancer - implications for care. *Nat Rev Clin Oncol.* 2020;17(8):457-474. doi:10.1038/s41571-020-0350-x.
- Tan, K., Stupack, D. G., & Wilkinson, M. F. (2022). Nonsense-mediated RNA decay: an emerging modulator of malignancy. *Nature Reviews. Cancer*, 22(8), 437-451. <https://doi.org/10.1038/s41568-022-00481-2>.