



**Universitat**  
de les Illes Balears

## **TREBALL FI DE GRAU**

# **ANÀLISI DE REGULADORS EPIGENÈTICS IMPLICATS EN LA RESISTÈNCIA A FÀRMACS EN PACIENTS DE CÀNCER DE PRÒSTATA**

**Konstantin Josef Deingruber**

**Grau de Bioquímica**

**Facultat de Ciències**

**Any Acadèmic 2019-2020**



# ANÀLISI DE REGULADORS EPIGENÈTICS IMPLICATS EN LA RESISTÈNCIA A FÀRMACS EN PACIENTS DE CÀNCER DE PRÒSTATA

**Konstantin Josef Deingruber**

**Treball de Fi de Grau**

**Facultat de Ciències**

**Universitat de les Illes Balears**

**Any Acadèmic 2019-2020**

Paraules clau del treball:

Càncer de pròstata, CRPC, receptor d'andrògens, ADT, miRNA, WNT, regulador epigenètic, miR-205, miR-1301, biomarcador.

*Nom Tutor/Tutora del Treball : Antònia Obrador de Hevia*

S'autoritza la Universitat a incloure aquest treball en el Repositori Institucional per a la seva consulta en accés obert i difusió en línia, amb finalitats exclusivament acadèmiques i d'investigació

Autor		Tutor	
Sí	No	Sí	No
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



## Abstract | Resum

<b>1. Introducció</b>	<b>7</b>
1.1 El receptor d'androgen	8
1.2 La deprivació androgènica	9
1.3 Biomarcadors	9
1.3.1 Els nivells de PSA	10
1.4 Càncer de pròstata resistent a castració (CRPC)	10
<b>2. Reguladors epigenètics en càncer de pròstata</b>	<b>12</b>
2.1 miRNAs	13
2.2 Desregulació dels miRNAs en càncer	13
2.3 MiRNAs en càncer de pròstata	14
2.4 Mecanismes implicats en l'adquisició de resistències	14
<b>3. La via de WNT</b>	<b>15</b>
3.1 El paper de WNT en càncer de pròstata	16
3.2 El receptor d'andrògens i WNT	17
3.3 Resultats preliminars sobre la desregulació de la via WNT en CRPC	18
<b>4. Hipòtesis</b>	<b>19</b>
<b>5. Objectius</b>	<b>19</b>
<b>6. Materials i mètodes</b>	<b>19</b>
6.1 Recerca bibliogràfica	19
6.2 Línies cel·lulars	20
6.3 Mostres de pacients	21
6.4 Extracció d'RNA	21
6.5 Retrotranscripció	22
6.6 PCR i anàlisi estadístic	22
6.7 Aspectes ètico-legals	23
6.8 Obtenció de les dades prèvies per <i>microarray</i>	23
6.9 Bioinformàtica	23
<b>7. Resultats</b>	<b>24</b>
7.1 Estudi de validació de canvis d'expressió de miRNAs en línies cel·lulars de càncer de pròstata	24
7.2 Estudi de validació de canvis d'expressió de miRNAs en un grup de mostres independents de càncer de pròstata	25
<b>8. Estudi de perfils de miRNAs implicats en càncer de pròstata resistent a castració mitjançant anàlisi bioinformàtica</b>	<b>26</b>
8.1 hsa-miR-149-5p	27
8.2 hsa-miR-6737-5p	28
<b>9. Discussió</b>	<b>29</b>
9.1 Perspectives futures: la biòpsia líquida	30
<b>10. Conclusions</b>	<b>31</b>
<b>11. Bibliografia</b>	<b>32</b>

## Abreviacions

## Annex

## Abstract

---

Prostate cancer (PCa) is one of the most common cancer types, in men, worldwide. Proliferation and survival of prostate cells depend on the androgen receptor signalling pathway, a highly deregulated pathway in cancer. Therefore it is an important therapeutic target. Unfortunately, during hormone treatment, PCa progresses through various mechanisms to a castration resistant form (CRPC). miRNAs are epigenetic regulators with a key role in PCa. They promote cancer progression or drug resistance. In previous studies at IdISBa, a series of miRNAs and mRNAs differentially expressed between hormone-sensitive and CRPC patients were detected by *microarray* analysis. Among the most prominent were the miR-205 and the miR-1301. Both have targets in the WNT pathway, a deregulated pathway in cancer. A validation of the *microarray* was performed using the qPCR technique, first in the PC-3, DU-145 and 22Rv1 cell lines, and then in an independent set of patient samples obtained by prostatectomy and transurethral resection. Increased levels of miR-1301 expression was observed in all cell lines. No changes were observed for the miR-205. miR-1301 and miR-205 levels increased in patient samples. Additionally, non-Wnt-pathway miRNAs from the research group's array data were analyzed: miR-149-5p (upregulated miRNA in CRPC with a dual tumor-dependent role) and miR-6737-5p (downregulated miRNA in CRPC with an anti-tumor role by inhibiting MAPK signalling). miRNAs could be promising biomarkers detectable in liquid biopsies and good therapeutic targets in conjunction with their targeted pathways. Results from the present study can lead to the following conclusions: 1) It has been possible to validate miR-1301 in cell line samples as well as patient's samples; 2) Bioinformatics is a highly promising alternative tool for finding new miRNAs. Understanding the epigenome and specifically the miRnoma of prostate cancer will be crucial to be able to develop new drugs design reliable clinical methods of diagnosis for all stages of prostate cancer.

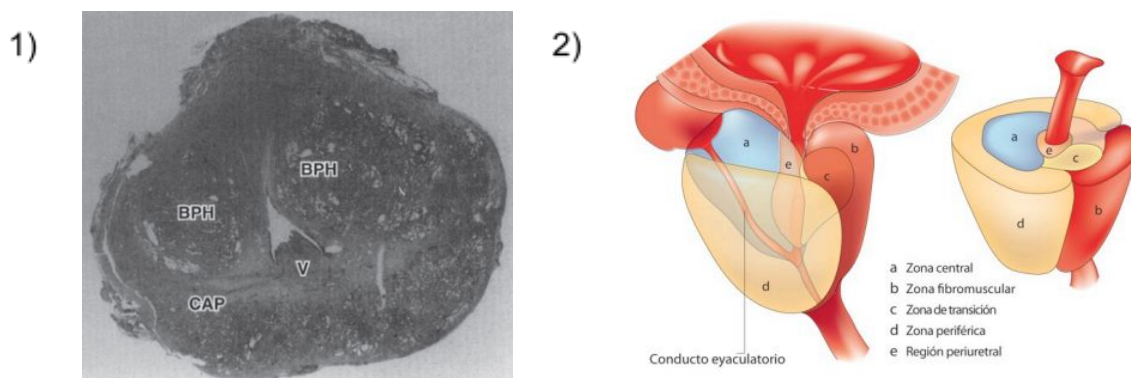
## Resum

---

En homes, el càncer de pròstata (PCa) és dels tipus més freqüents mundialment. La proliferació de les cèl·lules de la pròstata depèn de la via de senyalització del receptor d'andrògens, altament desregulada en càncer. Per això, el receptor d'andrògens és una important diana terapèutica. Durant la teràpia hormonal, el càncer progressa mitjançant diversos mecanismes, a un estadi resistent a la castració (CRPC). Els miRNA són reguladors epigenètics amb un paper clau en PCa. Poden afavorir la progressió del càncer o l'aparició de les resistències als fàrmacs. En estudis realitzats anteriorment a l'IdISBa, es van detectar amb un anàlisi de *microarrays* una sèrie de miRNA i mRNAs expressats de manera diferencial entre pacients hormona-sensible i CRPC (Entre els més destacats el miR-205 i el miR-1301). Alguns miRNAs destacats tenen dianes a la via de WNT, una via desregulada en PCa. Es va realitzar una validació del *microarray* mitjançant la tècnica de la qPCR, primer en les línies cel·lulars PC-3, DU-145 i 22Rv1, i llavors en un set independent de mostres de pacient obtingudes per prostatectomia i resecció transuretral. S'observa l'augment dels nivells d'expressió del miR-1301 en totes les línies cel·lulars. Per al miR-205 no es poden observar canvis. Els nivells de miR-1301 i miR-205 augmenten en mostres de pacients. Addicionalment, es van analitzar els miRNAs no relacionats amb la via de Wnt de les dades d'arrays del grup d'investigació. S'han escollit dos miRNA concrets a estudiar: miR-149-5p (sobreexpressat en CRPC, amb un paper dual, tumor-dependent) i miR-6737-5p (infraexpressat en CRPC, podria tenir un paper anti-tumoral actuant inhibint la senyalització de les MAPK). Com a resultat d'aquest treball, es pot concloure el següent: 1) S'ha pogut validar el miR-1301 tant en línies cel·lulars com en mostres de pacients; 2) La bioinformàtica és una eina alternativa altament prometedora per trobar nous miRNAs. Entendre el l'epigenoma i concretament el miRnoma del càncer de pròstata serà crucial per poder desenvolupar nous fàrmacs més potents amb la finalitat d'evitar les resistències i dissenyar mètodes clínics fiables de diagnòstic per tots els estadis del càncer de pròstata i millorar el pronòstic.

## 1. Introducció

La pròstata és una glàndula masculina, de la mida similar a una anou, que produeix líquid seminal per nodrir i transportar els espermatozoides. La pròstata consisteix en quatre zones; la zona fibromuscular anterior, la zona central, la zona perifèrica i la zona de transició periuretral (**fig.1**). Aproximadament un 70% dels carcinomes provenen de la zona perifèrica, no obstant, s'ha descrit que la zona de transició és especialment susceptible a produir hiperplàsies benignes (BPH). El càncer de pròstata (PCa) és un tipus de càncer, que presenta des de formes indolents fins a formes molt agressives; a més es caracteritza pel seu lent creixement. La progressió del càncer de pròstata s'inicia amb la formació d'una neoplàsia intraepitelial (PIN), que pot evolucionar a la forma avançada (AG-PIN), neoplàsia de grau elevat. A partir d'estadis en els que s'observa la invasió de l'epiteli cap a l'estroma s'anomena adenocarcinoma. Cal destacar que en els països amb un desenvolupament econòmic elevat, el 80% dels casos de càncer de pròstata es detecten en estadis localitzats, millorant el pronòstic del pacient. (1,2) En homes, aquest tipus de càncer és dels més recurrents a nivell mundial. A Estats Units, per exemple, representa el 9,9% de tots els nous casos reportats i suposa la segona causa més freqüent de mortalitat per càncer (*National Cancer Institute (13/02/2020)*). A Mallorca, aquest tipus de càncer passa a ser el més freqüent en homes a partir del 2006, superant el càncer de pulmó, i situant-se en la segona causa més freqüent de mortalitat (Informe de la Conselleria de Salut del Govern de les Illes Balears (2013)). Els únics factors de risc establerts són l'ètnia, l'historial familiar i l'edat. El principal sector de risc es troba comprès entre els 45 i els 84 anys presentant un pic important de risc als 65-74 anys (39,2% de tots els nous casos reportats). Altres factors, no establerts, són el sedentarisme, l'obesitat, el consum de tabac, l'exposició a contaminants químics i la dieta. La "western diet" es relaciona sovint amb el desenvolupament de càncer de pròstata per l'alta ingesta de calories així com la ingesta d'àcids grassos saturats i carn vermella. El seleni i la vitamina E (vitamina amb activitat antioxidant) es relacionen amb un menor risc de patir aquesta patologia. La dieta podria influir en el desenvolupament del càncer regulant el balanç oxidatiu del teixit de la pròstata. (3) Aquestes dades demostren la importància d'estudiar noves estratègies terapèutiques per millorar l'evolució i el diagnòstic dels pacients amb càncer de pròstata.



**Fig. 1 Zones de la pròstata.** 1) Zones on es produeixen patologies de manera més freqüent. **V:** vero montanum. **BPH:** hiperplàsia benigna de la pròstata. **CAP:** càncer de pròstata. 2) Esquema general de les zones que formen la pròstata. (1,2)

## 1.1 El receptor d'andrògens.

La proliferació i la supervivència de les cèl·lules del càncer de pròstata depenen majoritàriament de la via de senyalització del receptor d'andrògens (RA). És un factor de transcripció nuclear i un receptor per hormones esteroïdees de 110 kD; el seu gen es troba localitzat en el cromosoma Xq11-12, presenta 8 exons i comprèn 186.587 Kb. La seva estructura presenta similituds amb altres receptors d'esteroides com el de la progesterona, el d'estrògens, el de glucocorticoides i el dels tiroides. Presenta quatre dominis (**fig.2**): un lleugerament conservat d'unió al lligand (LBD), un altament conservat d'unió al DNA (DBD), un N-terminal poc conservat (NTD) i una regió frontissa entre els dominis LBD i DBD. Dins el domini NTD destaca la regió AF1 (*Activating factor 1*) formada per les unitats transcripcionals Tau-1 i Tau-5, indispensables per l'activitat transcripcional del RA. (4) Un pic activat per andrògens, el RA modula la transcripció de gens implicats en creixement i diferenciació de les cèl·lules epitelials de la pròstata (**fig.3**).

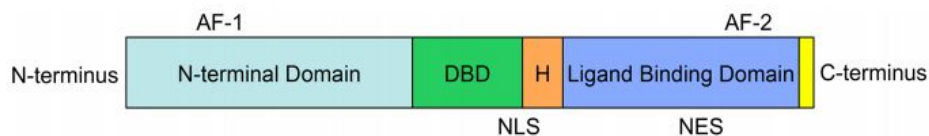
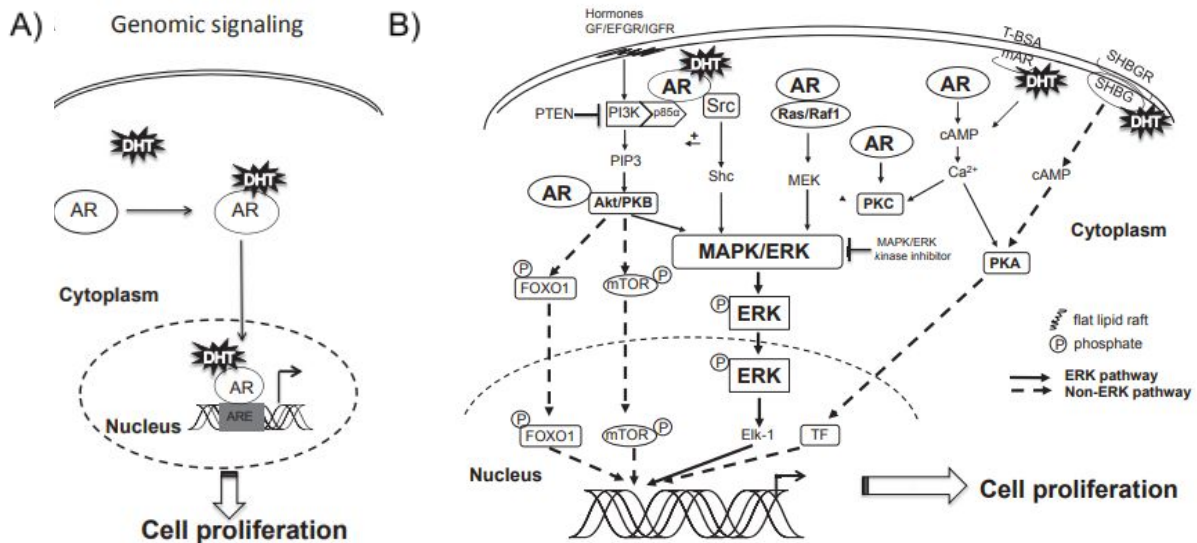


Fig. 2 Dominis funcionals del receptor d'androgen. (4)



**Fig. 3 Via de senyalització del receptor d'andrògens.** Quan el receptor d'andrògens està inactiu es troba en el citoplasma unit a un complex format per chaperones de shock tèrmic (Hsp70, Hsp40, Hop, Hsp90 i p23). La funció principal del complex és protegir al receptor de la proteòlisi. **A)** La unió del lligand, com pot ser la testosterona o la dihidrotestosterona (DHT) provoca la alliberació del receptor i indueix canvis conformationals que acaben amb l'heterodimerització i translocació al nucli. Un pic translocat actua sobre una sèrie de promotors o *enhancers* localitzats en els elements de resposta a andrògens (ARE) i recluta la maquinària necessària per la transcripció dels seus gens diana. S'ha observat que en absència d'andrògens, factors de creixement i varies citocines poden activar el RA. A més, el RA pot ser reclutat cap a la membrana, mitjançant caveolina 1, o anclat a través de la palmitoilació. **B)** Un pic es troba a la membrana pot interactuar amb proteïnes com Src, concretament amb el domini SH3, activant el seu domini cinasa. Aquesta activació llavors podria comportar la inducció de la via de senyalització MAPK/ERK Ras dependent, entre altres, com s'observa en la figura . (5)



## 1.2 La deprivació androgènica.

La teràpia de deprivació, anomenada castració, pot ser química, quan s'empren anàlegs de la hormona secretora de gonadotropines, o quirúrgica, quan es realitza una orquiectomia bilateral (extirpació dels testicles, on es produeix el 90% dels andrògens). Durant la teràpia farmacològica o química els objectius són dessensibilitzar el receptor usant una exposició continua als seus agonistes i/o bloquejar-lo mitjançant antagonistes. També existeixen altres estratègies complementàries com la inhibició d'enzims implicats en la síntesi d'andrògens (CYP17A1). Tot i que es disminueix la producció d'andrògens, poden persistir nivells baixos. Diversos estudis descriuen que els tumors de pròstata desenvolupen la capacitat de sintetitzar andrògens o expressar enzims per tal de transformar andrògens més febles a DHT. (6) En la **taula I** es poden veure alguns dels principals fàrmacs usats en la teràpia de deprivació androgènica (ADT, de l'anglès *androgen deprivation therapy*).

Taula I. Exemples de fàrmacs emprats en l'ADT.

Compost	Efecte	Naturalesa
Bicalutamida	Evita la unió de cofactors de RA i afecta a la seva activitat transcripcional.	Anti-androgen de PG NE
Flutamida	Unió competitiva al receptor evitant la unió d'andrògens.	Anti-androgen de PG NE
Nilutamida	Unió competitiva al receptor evitant la unió d'andrògens.	Anti-androgen de PG NE
Enzalutamida	Unió selectiva d'alta afinitat que inhibeix la translocació al nuclear.	Anti-androgen de SG NE
Apalutamida	Unió competitiva d'alta afinitat que disminueix la translocació al nuclear.	Anti-androgen de SG NE
Darolutamida	Unió de alta afinitat que disminueix la unió d'andrògens i la translocació al nucli.	Anti-androgen de SG NE
Galeterona	Inhibeix CYP17A1 suprimint la síntesi d'andrògens.	Anti-androgen esteroide
Abiraterona	Inhibeix CYP17A1 suprimint la síntesi d'andrògens.	Anti-androgen esteroide
Leuprolida	Agonista, s'uneix al receptor LHRH i impedeix la secreció de gonadotropines.	Pèptid sintètic
Degarelix	Antagonista, evita la unió de LHRH al seu receptor.	Pèptid sintètic
EPI-506	Inhibeix el domini NTD del RA i la interacció amb AF-1, per impedir l'activació.	Derivat de EPI-001

**RA:** receptor d'androgen. **PG:** primera generació. **NE:** no esteroide. **SG:** segona generació. L'abiraterona i enzalutamida (usats freqüentment) són compostos usats per evitar que la síntesi intratumoral d'andrògens causi el fracàs de la teràpia. (6)

## 1.3. Biomarcadors.

A dia d'avui és d'especial interès el desenvolupament de biomarcadors fiables i tests senzills que es puguin aplicar de manera rutinària a la clínica per valorar el pronòstic de la malaltia i la predicció de resposta a fàrmacs. Les anàlisis moleculars a partir de teixit tumoral que fan falta en molts casos per determinar el pronòstic en el context de metàstasi tenen una sèrie de limitacions importants com són el nombre de mostres disponibles, que es requereix de cirurgia o tècniques invasives per a la seva obtenció, a més de no representar tota l'heterogeneïtat del tumor. Ara mateix les principals eines per al diagnòstic són l'exploració rectal digital (DRE), l'antigen específic de pròstata (PSA), el valor de biòpsia de *Gleason* i les imatges obtingudes per ressonància magnètica (MRI). Entre tots es pot concloure que el grau de risc del pacient de no respondre al tractament es troba en un nivell baix, intermedi o alt. La ràtio de supervivència dels pacients que pertanyen al grau de risc alt és d'un 30% aproximadament. (7)

### 1.3.1 Els nivells de PSA.

El PSA (marcador validat en la pràctica clínica) és un gen dependent de RA, els seus nivells disminueixen al principi de la deprivació hormonal i el seu increment és senyal de la progressió del càncer. Els nivells líndars, es troben entorn als 4 ng/mL, però poden presentar diferències dependents de l'edat. Com a resposta, quan es supera aquest líndar s'indica la realització d'una biòpsia de teixit de pròstata. PSA no és una proteïna càncer específica, és una proteïna produïda en estat normal per les cèl·lules epitelials de la pròstata, a nivells similars o més elevats que en càncers. Nivells elevats de PSA en sèrum poden detectar-se no només en homes amb càncer de pròstata sinó també en casos de BPH i prostatitis. A més depèn de molts factors que poden elevar de manera transitòria els nivells com la retenció urinària, l'ejaculació i la biòpsia de pròstata. (8) S'ha vist que els valors de PSA sanguinis, no són un marcador fiable per preveure l'evolució del càncer de pròstata en tots els estadis, presenta baixa especificitat i una taxa elevada tant de falsos positius com de falsos negatius, comportant tota una sèrie de tractaments no necessaris en molts de casos. Només entorn al 22-26% dels pacients amb nivells elevats de PSA presenten càncer. Per altra banda entorn al 15% dels pacients amb nivells no significatius de PSA (menys de 4ng/mL) si acaben desenvolupant un càncer de pròstata. Igual que el valor de PSA el DRE també té una taxa considerable de falsos positius. (8) El problema principal dels falsos positius és que la biòpsia, tant realitzada de manera rectal com perineal, suposa una sèrie de complicacions a posteriori com són la incontinença o disfunció erèctil, infecció, sèpsies i hematúria. (7) Això crea la necessitat de trobar altres possibles biomarcadors. S'estan desenvolupant de manera intensiva tests no invasius per a la detecció de marcadors sanguinis (biòpsia líquida, tècnica no invasiva a partir de mostres de sang, orina i saliva) tant de DNA o RNA tumoral circulant com de miRNAs o exosomes.

### 1.4 Càncer de pròstata resistent a castració (CRPC).

Desafortunadament, el càncer de pròstata, en algun moment de la teràpia hormonal, progressa inevitablement a un estadi de càncer de pròstata resistent a la castració (CRPC, de l'anglès *Castration Resistant Prostate Cancer*). Aquesta forma del càncer és letal, i els pacients deixen de respondre a la deprivació d'andrògens. Els nivells sèrics de testosterona en pacients castrats són inferiors a 1'7 nmol/L. Canvis en aquests nivells poden indicar la progressió del càncer. (8) En aquest estadi els principals tractaments inclouen la quimioteràpia, usant el compost antimetabòlic docetaxel (**taula II**). Als darrers anys la immunoteràpia i estratègies dirigides contra les Hsp han sorgit com a mètodes complementaris altament prometedors. (9) Existeixen diversos mecanismes pels quals la cèl·lula pot adquirir la resistència a castració i molts no s'han elucidat completament a dia d'avui. Moltes línies d'investigació es centren en desenvolupar nous agents hormonals dirigits a frenar la via de senyalització del receptor d'andrògens present en pacients CRPC, com abiraterona o enzalutamida (**taula I**). Lamentablement, molts pacients no responen (aproximadament un 20-40% (10)) o acaben presentant resistència a aquests tractaments. A continuació es mostren algunes de les aberracions més freqüents presents en pacients amb CRPC:

**A) Síntesi intratumoral d'andrògens.** Sobreexpressió de CYP11A1 i CYP17A1, membres de la família de citocroms P450 que participen en la síntesi d'andrògens febles com són la DHEA (*dehydroepiandrosterone*) i la androstendiona. Aquests andrògens febles poden ser transformats en testosterona i DHT mitjançant enzims que també es troben sobreexpressats en el tumor com són les hidroxisteroide deshidrogenases (HSD3 $\beta$ 1, HSD3 $\beta$ 2 i AKR1C3) i les 5 $\alpha$ -reductases de tipus 2. (11)

**B) Mutacions puntuals del RA en el domini LBD.** Les mutacions en aquest domini comporten sovint la pèrdua d'especificitat del receptor. Mutacions al codó 701 (L701H) en l'exó D i al codó 877 (T877A) en l'exó H són freqüents en mCRPC (CRPC metastàtic) i augmenten l'especificitat del receptor a agonistes com estrògens o progestines. A més, les mutacions puntuals T878A i F878L s'han relacionat amb resistències als compostos abiraterona i enzalutamida respectivament. (11)

**C) Sobreexpressió del receptor d'andrògens i de les seves isoformes.** És de les aberracions més freqüents observades en pacients CRPC (30-50%). La sobreexpressió de RA permet al tumor respondre a baixes concentracions d'andrògens. S'ha relacionat amb la resistència a bicalutamida. (11). En pacients CRPC s'observa la sobreexpressió de diferents isoformes del receptor: AR-V1, AR-V567es, AR-V9, i AR-V7. (11) La variant AR-V7 està present en aproximadament el 75% dels pacients. (10) Entre les variacions més comuns trobem la pèrdua del domini LBD, un dels principals mecanismes de resistència a fàrmacs.

**D) Interacció amb coactivadors.** Els coactivadors com SRC1 (*steroid receptor coactivator*) poden interaccionar amb el receptor d'andrògens i augmentar la seva activitat a baixes concentracions d'andrògens. (11)

**E) Activació de factors d'inflamació.** S'ha descrit que la IL-6 (Interleucina 6) pot induir resistència a fàrmacs activant SRC-1, regulant l'expressió de gens com SHC, JAK-1 i GRB2 i inhibint l'apoptosi de cèl·lules CRPC. La IL-4 s'ha relacionat amb l'activació de coactivadors de RA com CNP/P300. Finalment, s'estableix una possible relació entre la IL-8 i el factor NF- $\kappa$ B, sovint sobreexpressat en CRPC, per tal de potenciar l'angiogènesi i metastasi activant la via SRC/FAK. (6)

**G) RNAs no codificants (ncRNA).** S'ha observat que els RNAs no codificants regulen la transcripció de molts gens en CRPC. MicroRNAs (miRNAs), per exemple, podrien participar en la regulació de molts processos com la diferenciació cel·lular i la proliferació. S'ha descrit que, entre altres, miR-1 i miR-20 regulen gens relacionats amb el metabolisme de la glucosa com G6PD, PGD i GPD, mentre que miR-185, miR-343 i miR-101 poden regular gens del metabolisme lipídic com SREBP, PPARA i COX-2, per tal de crear un micro-ambient idoni pel tumor. (9)

**H) Modificacions en la maquinària de reparació del DNA.** S'han observat diverses mutacions en components que participen en la reparació de dany al DNA com són BRCA 1/2 i la Poli (ADP-ribosa) polimerasa. (9)

**I) Expressió d'altres receptors similars.** RA i el receptor de glucocorticoides (RG) presenten els mateixos llocs d'unió a la cromatina podent així regular molts gens RA específics. S'ha observat que la expressió de RG es veu augmentada en els pacients que han rebut ADT. S'especula que RG podria substituir la senyalització del receptor d'andrògens i causar la resistència a enzalutamida. (6)

**J) Transició epitelial-mesènquima (EMT) i Hsp.** Diferents estudis descriuen l'activació, de la caderina E, caderina N, Snail i Twist (marcadors de l'EMT); per altra banda de HSP27 i HSP90, en resposta a l'ADT. Aquest fet fa pensar que aquestes dianes podrien tenir implicacions en l'adquisició de resistències. (9,10)

**Taula II. Característiques d'alguns dels fàrmacs més emprats en pacients CRPC.**

Compost	Efecte
Denosumab	ACM per restringir els efectes de la metastasi òssia.
233Ra	Tractament de la metastasi òssia.
Docetaxel	Antimitòtic quimioterapèutic.
Ganetespib, OGX-427	Inhibidors de Hsp27 i Hsp90 per tal de potenciar la quimioteràpia.
Pemetrexed	Antimitòtic per a pacients docetaxel resistents.
Cabazitaxel	Antimitòtic per a pacients docetaxel resistents.
Saikosaponin-d	Reverteix l'EMT i inhibeix l'expressió de MMP2/9 i WNT/ $\beta$ -catenina.

**ACM:** anticòs monoclonal. **MMP:** metaloproteasa de matriu. (6)

## 2. Reguladors epigenètics en càncer de pròstata

Els mecanismes pels quals es regeixen els canvis epigenètics i els seus efectes són els següents: metilació del DNA, modificacions de les histones (acetilacions, metilacions, sumoilitzacions i ubiquitinilitzacions entre altres), remodelació de la cromatina i l'acció RNAs no codificants (ncRNA). A la **taula III** es descriuen alguns exemples.

**Taula III. Reguladors epigenètics implicats en el càncer de pròstata.** (12)

Regulador	Efecte
NSD2	H3K36 dimetil transferasa, expressió elevada en mPCa. S'ha relacionat amb la tumorigènesi de PCa i la seva progressió.
SUV39H1	H3K9 trimetil transferasa. Promou la invasió.
PRMT5	H4R3 metiltransferasa. Inactivació de supressors tumorals i activació de gens diana de la senyalització RA dependent.
DNMT5	DNA metilasa. Relacionat amb la progressió a CRPC
SIRT1	Histona desacetilasa de RA. Relacionat amb el creixement tumoral.
SIRT2	Histona desacetilasa de RA. Relacionat amb la disminució a la sensibilitat a ADT. Es veu menys expressat en càncer de pròstata.
P300	Histona acetilasa. Promou l'expressió de gens RA dependents.
LSD1	H3K9 i H3K4 demetilasa. Relacionat amb CRPC i una menor supervivència. Resulta un important regulador de gens RA dependents.
JARID1C	H3K4 di/tri-demetilasa. Relacionat amb un menor èxit de la teràpia després de la prostatectomia.
JMJD3	H3K27 di/tri-metilasa. Relacionat amb la metastasi.

## 2.1 miRNAs.

Els miRNAs són molècules d'RNA monocatenari, no codificants, d'uns 21-23 nucleòtids de longitud, que regulen l'expressió gènica unint-se totalment o parcialment a alguna molècula d'RNA missatger. La unió imperfecta a la regió no traduïda 3' del mRNA condueix a la repressió de la traducció de proteïnes. Els miRNAs impedeixen el reconeixement del CAP 5' per eIF4F i a més eviten la unió de la subunitat ribosomal 60S al complex de traducció. Els mecanismes concrets no estan del tot elucidats. La unió perfecta al mRNA, en canvi, indueix la divisió i degradació de mRNA mediat per RISC. Sovint aquest procés requereix a més d'Ago2. Els mRNAs silenciats s'incorporen als denominats cossos P on són emmagatzemats i degradats per una sèrie d'enzims com DCP1/DCP2, Xrn1, el complex format per Ccr4p/POP2p/Not i el mateix complex RISC. (3) Alguns estudis també descriuen els miRNAs com a activadors de la transcripció gènica. Per exemple, miR-205 podria actuar com a supressor del PCa regulant gens supressors de tumors (**taula IV**). Els mecanismes exactes pels quals els miRNAs medien l'activació gènica encara no estan clars. (3) A partir del 2008, es demostra que els miRNAs de tumors poden ser alliberats a la circulació sanguínia i estar presents tant en plasma com en sèrum, i altres biofluids de forma notablement estable. (7,8) Molts miRNAs són teixit i càncer específics i es troben implicats de forma important en diversos tipus com el pancreàtic, el de mama i el de pròstata. Cal destacar que avui en dia més de 4800 miRNAs humans s'han descrit i es poden consultar a bases de dades com miRBase (<http://www.mirbase.org>). (7)

## 2.2 Desregulació dels miRNAs en càncer.

**A) Delecions i amplificacions gèniques.** El 50% dels gens humans que codifiquen per miRNAs es situen en regions fràgils. Aquestes zones són susceptibles a sofrir amplificacions, delecions o translocacions. S'ha establert una relació entre l'amplificació dels gens que codifiquen per miRNAs i la resistència a fàrmacs. (13) **B) Modificació de les histones de gens que codifiquen per miRNAs.** Les histones es poden modificar químicament de moltes formes, entre les més destacades es troben l'acetilació i la metilació. Les acetilacions i desacetilacions d'histones catalitzades per HATs i HDACs es relacionen amb l'activació i inhibició de l'expressió gènica respectivament. La metilació, catalitzada majoritàriament per DNMTs, pot activar o silenciar l'expressió gènica segons els residus de les histones que es veuen afectats. (13) **C) Aberracions en els factors de transcripció.** Un dels factors de transcripció (FT), desregulats en càncer i implicats en la regulació de miRNAs és el supressor de tumors p53, que s'activa en resposta al dany en el DNA. Una de les dianes de p53 és el promotor del miRNA supressor de tumors miR-34. Altres FTs com Smad4, KLF9 i ETS-1 regulen miRNAs relacionats amb la resistència a fàrmacs (p.e miR-200, miR-21 i miR 320a) (13) **D) Desregulació de la biogènesi i el processament dels miRNA.** La desregulació d'enzims claus en la biogènesi i el processament dels miRNAs poden conduir a una expressió anormal i un perfil alterat de miRNAs. Entre aquests enzims es troben Drosha, Dicer1, el cofactor DGCR8 i TRBP2 i AGO. (14)

### 2.3 MiRNAs en càncer de pròstata.

Les aberracions a nivell epigenètic i transcripcional influeixen en l'expressió diferencial de miRNAs, alguns són sobreexpressats mentre que altres es veuen infraexpressats. El 30% de regions silenciades epigenèticament en càncer de pròstata contenen loci per miRNAs. S'observa que la majoria de miRNAs en càncer de pròstata són sobreexpressats. L'expressió d'alguns miRNAs podria servir per diferenciar teixit normal del cancerigen, tot i que existeix una gran controvèrsia a l'hora d'usar-los com a classificadors. Cal destacar que un sol miRNA pot tenir moltes dianes amplificant considerablement el seu potencial d'acció. (15) S'ha descrit que els miRNAs expressats de manera diferencial en els tumors són capaços de regular una sèrie de processos per tal d'afavorir la progressió del càncer de pròstata. A dia d'avui no s'han elucidat tots els mecanismes exactes.

La expressió diferencial de miRNAs participa en la modulació de l'autofàgia (p.e miR-32, miR-212 i miR-205); en la transició epitelial-mesènquima (p.e miR-205, miR-200c i miR-143), el creixement i la proliferació cel·lular (p.e miR-200c, miR-143, miR-185, miR-21 i miR-32); la migració i invasió (p.e miR-205, miR-146a i miR-185); en les cèl·lules mare canceroses (CSC) (p.e miR-200c, miR-320 i miR-128); i l'apoptosi (p.e miR-205, miR-185, miR-16, miR-21 i miR-34a). La sobreexpressió de miRNAs amb potencial tumorigènic i l'infraexpressió de miRNAs que regulen processos antitumorals (**taula IV**) podria explicar la poca resposta a alguns tractaments i l'adquisició d'un estat CRPC. (14)

### 2.4 Mecanismes implicats en l'adquisició de resistències.

**A) Regulació de la proliferació, l'apoptosi i del cicle cel·lular.** La capacitat dels miRNAs per regular gens clau implicats en la proliferació, en el cicle cel·lular i apoptosi es relaciona directament amb les resistències als fàrmacs, ja que el seu mecanisme sovint és l'aturada del cicle per induir la mort cel·lular. Un exemple és el miR-34a. La diana d'aquest miRNA és SIRT1. La sirtuina 1 en condicions normals afavoreix la proliferació inhibint p53, però exerceix un paper antitumoral quan p53 es troba mutat. S'ha descrit que la sobreexpressió d'aquest miRNA sensibilitza les cèl·lules de la pròstata al fàrmac PTX. (15)

**B) Regulació de gens de resposta a dany en el DNA.** Per reparar els danys en el DNA són necessaris enzims específics. S'ha observat que alguns enzims de la maquinària de reparació són regulables per miRNAs podent ser això un factor que reverteix o incrementa la resistència als fàrmacs. (15)

**C) Regulació a nivell metabòlic.** S'ha descrit que alguns miRNAs regulen els transportadors de fàrmacs impedit així la seva assimilació, a més poden modular els enzims que els metabolitzen i que poden activar-los en primer lloc. (15) A la **taula IV** observam alguns miRNA que podrien regular els processos descrits.

Taula IV. Exemples de miRNAs amb funcions pro i anti-tumorals.

miRNA	Mecanisme	Tipus
miR-21	Implicat en invasió i contribueix al fenotip resistent.	miRNA Oncogènic
miR-32	Inhibeixen l'apoptosi i promou la proliferació.	
miR-125b		
miR-141	Implicat en el fenotip mCRPC.	miRNA anti-oncogènic
miR-200b	Inhibeix el creixement i la invasió.	
miR-34a		
miR-224		
miR-30a		

La sobreexpressió de miRNAs amb potencial tumorigènic i la infreexpressió de miRNAs que regulen processos antitumorals podria explicar la poca resposta a alguns tractaments i l'adquisició d'un estat CRPC. (14)

### 3. La via de WNT

La via de WNT és una via de senyalització (**fig. 4**) que s'ha vist modulada per diferents miRNAs i que està implicada en el càncer de pròstata, altament conservada en eucariotes, que regula molts processos cel·lulars com la proliferació, supervivència, diferenciació i homeòstasi dels teixits, sobretot durant el desenvolupament embrionari i postnatal. S'ha descrit la desregulació d'aquesta via en varis càncers, entre altres el de pell, mama, fetge i pròstata. En mamífers existeixen 19 proteïnes WNT, totes presenten unes característiques comuns: un pèptid senyal per la secreció, molts de llocs de glicosilació i la interacció amb receptors de set passos transmembrana com són la família de Frizzled (FZD). A més, poden interaccionar amb co-receptors transmembrana com són RYK, ROR2 i LRP5/6. S'ha observat que en càncer de pròstata i en la seva progressió participen principalment les vies no canòniques. (16)

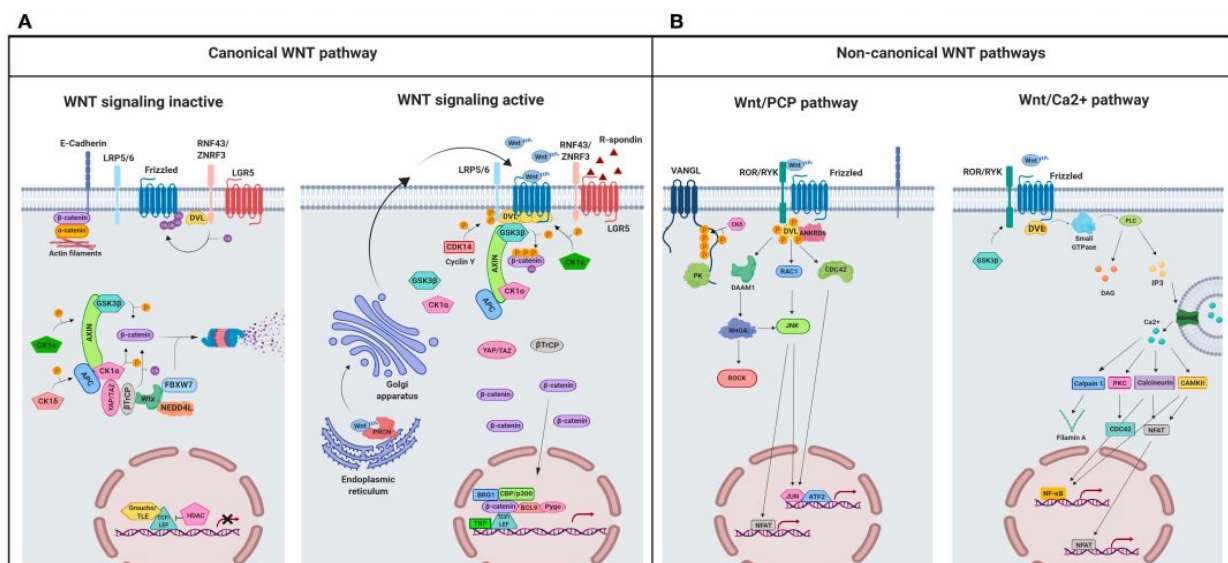


Fig. 4 Vies de senyalització de WNT. S'han descrit dos categories de senyalitzacions intracel·lulars activades per WNT: la via canònica i les vies no canòniques. (17)



En la via canònica el lligand Wnt s'uneix al seu receptor FZD. Existeixen repressors que poden evitar tant la unió (WIF1 i diferents proteïnes de la família de SRFP) com l'activació del receptor (DKK). Un pic unit, es recluta dishevelled (DVL) cap a la membrana. Es desactiva el complex de degradació de la  $\beta$ -catenina format per l'axina, glicogen sintasa cinasa (GSK3), la caseïna cinasa 1 (CK1) i la proteïna APC. L'axina és reclutada cap a la membrana i la resta de proteïnes del complex són fosforilades de manera que ja no es degrada la  $\beta$ -catenina i es pot acumular al citoplasma. Un pic s'acumula una concentració elevada, es transloca al nucli on podrà unir-se entre altres a la família transcripcional TCF/LEF (Factor de cèl·lules T/Factor de unió a *enhancers* limfoides), per tal de garantir la transcripció de gens diana de la via relacionats amb la proliferació, diferenciació i supervivència. (18) Les vies WNT no canòniques més ben caracteritzades inclouen la via WNT/Ca<sup>2+</sup>, i la via de polaritat plana (PCP).

Altres vies no canòniques inclouen la senyalització WNT/JNK i WNT/Rho. En la via WNT/Ca<sup>2+</sup>, la unió dels lligands, com Wnt5A, recluta DVL i proteïnes G, que activen la fosfolipasa C (PLC), en resposta es genera 1,2-diacilglicerol (DAG); L'1,2-DAG després activa la proteïna cinasa C (PKC) i l'inositol 1,4,5-trifosfat (IP3), provocant així l'alliberament de calci intracel·lular del reticle endoplasmàtic. S'activa la calcineurina (CNA) i la calmodulina (CAMKII), que augmenten l'expressió del factor nuclear de les cèl·lules T activades (NFAT), incrementant l'expressió de diversos gens en neurones, cèl·lules musculars cardíques i esquelètiques, pròstata i gens proinflamatoris en limfòcits. En la via WNT-PCP, els receptors FZD activen una cascada de senyalització que implica les petites GTPases Rho i Rac i la quinasa c-Jun N-terminal (JNK). A diferència de la senyalització no canònica regulada amb calci, la senyalització WNT/JNK utilitza circuits dependents del receptor ROR2. (18,19)

### 3.1 El paper de WNT en càncer de pròstata.

Entre algunes de les principals alteracions de la via de WNT que es troben sovint en càncer (**taula V**), destaquen les mutacions activadores del gen *CTNNB1*, que codifica per la  $\beta$ -catenina, i mutacions repressores del complex destructiu format entre d'altres per l'axina 1 i APC, augmentant així la senyalització WNT- $\beta$ -catenina. Aquestes mutacions són menys freqüents en càncer de pròstata localitzat, comparat amb altres tipus de càncer com el colorectal. Cal destacar que tot i que són menys freqüents aquestes alteracions s'observen de forma recurrent en pacients que presenten resistència a la castració. (16) Altres modificacions de la via inclouen *targets* de la  $\beta$ -catenina com la família TCF/LEF. Wu L. et al. descriuen que en tumors androgen independents LEF1 es troba sobreexpressat. (20) Cal recordar que, com esmentat anteriorment, TCF/LEF és una família clau per mediar els efectes de l'eix WNT- $\beta$ -catenina i poden tenir sèries implicacions en la progressió del càncer i la metastasi. (16) Als darrers anys s'ha estudiat especialment el rol de les vies no canòniques de WNT especialment en CRPC. S'ha descrit que l'expressió del lligand Wnt5A es troba incrementada en càncer de pròstata i podria estar implicat en processos d'invasió mediat pels receptors FZD2 i ROR2, a més de promoure la transició epitelial mesènquima (EMT) en càncer de pulmó i de mama mediat per la via FYN/STAT3. (18) No obstant, hi ha una gran controvèrsia respecte als efectes de Wnt5A, ja que en càncer de pròstata localitzat també s'han descrit efectes antitumorífics. (21)



S'ha observat que molts lligands de la via WNT es troben sobreexpressats en pacients després d'haver rebut la teràpia de deprivació androgènica. Entre els lligands identificats trobam WNT5B, WNT6, WNT10A i WNT16. (18) Altres com WNT2, WNT3A i WNT11 podrien veure's induïts per ERG. ERG freqüentment es fusiona amb TMPRSS2 (promotor que respon a andrògens) en càncer de pròstata. Aquesta fusió permet a l'oncogen ERG ser susceptible a l'activació per andrògens. Existeixen mutacions molt característiques del càncer de pròstata, varies d'elles afecten als components de la via de WNT, com per exemple, FZD6, GSK3B i WNT6. En un estudi de Rajan et al. es descriu que en 29/150 pacients, un conjunt de gens relacionats amb WNT es troben sobreexpressades després d'haver rebut la deprivació androgènica. Són similars els resultats obtinguts per Robinson et al. un any més tard, on 27/150 gens de la via de WNT presenten aberracions. (22) Alguns exemples de proteïnes sobreexpressades són FZD4 i FZD7. (23)

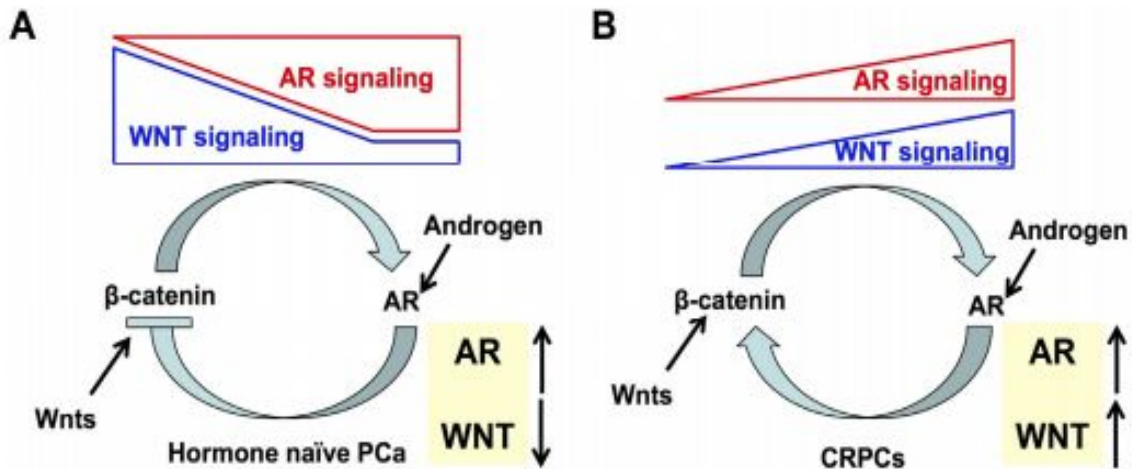
### 3.2 El receptor d'andrògens i WNT.

S'ha demostrat que existeix una interacció entre RA i  $\beta$ -catenina, preferentment en el domini LBD del receptor d'andrògens en presència de DHT, o altres lligands androgènics, gràcies a una conformació alfa trobada en les repeticions armadillo de la  $\beta$ -catenina. La  $\beta$ -catenina s'uneix a la regió AF-2 de LBD modulant els efectes transcripcionals de RA de manera que els incrementa. Aquesta unió és dependent del residu de lisina K720. Els efectes d'aquesta interacció són variables ja que depenen de l'estadi concret en el que es trobi el pacient. (**fig. 8**). En cèl·lules LNCaP androgen dependent, el tractament amb andrògens reprimeix l'expressió de gens diana de l'eix WNT/ $\beta$ -catenina, mentre que la inhibició del RA incrementa aquesta via. Això es podria deure a una unió preferencial de la  $\beta$ -catenina amb el receptor d'andrògens que no amb dianes transcripcionals com TCF/LEF.

Estudiant la línia LNCaP-abl, androgen independent, es va observar que la transcripció de gens WNT/ $\beta$ -catenina es trobava potenciada. Per una banda en càncer de pròstata hormona sensible, la senyalització del receptor d'andrògens reprimeix la transcripció de gens  $\beta$ -catenin/TCF dependents; per altra banda WNT podria estar implicat en la progressió cap a un estadi resistent i hormona insensible. A més en LNCaP-abl, la inhibició de la via WNT/ $\beta$ -catenina restableix la sensibilitat a enzalutamida demostrant un alt potencial terapèutic d'aquesta via. El que sembla especialment interessant és que varis estudis suggereixen que els gens diana de la via WNT/ $\beta$ -catenina no són els mateixos en diferents estadis de la patologia. (18)

Taula V. Modificacions de WNT en càncer de pròstata. (16, 22)

Mecanismes proposats pels quals augmenta la senyalització de WNT en CRPC
Sobreexpressió de LEF1 (23)
Interacció AR/ $\beta$ -catenina (20,26)
Pèrdua d'antagonistes de WNT (26)
Sobreexpressió de receptor i lligands de WNT (20,26)
Mutacions que augmenten la localització nuclear de la $\beta$ -catenina (26)
Mutacions de <i>CTNNB1</i> , <i>APC</i> , <i>RNF3</i> , <i>RSPO2</i> (21,25)



**Fig. 5 Esquema simplificat de les interaccions AR-WNT.** (A) En PCa hormona sensible, la senyalització del receptor d'andrògens inhibeix la transcripció de gens diana de la  $\beta$ -catenina. En canvi la  $\beta$ -catenina incrementa la senyalització del RA. (B) En CRPC el RA i la via WNT/ $\beta$ -catenina estableixen s'afavoreixen mútuament en un ambient androgen independent. (18)

### 3.3 Resultats preliminars sobre la desregulació de la via WNT en CRPC.

Entre el 2014 i el 2016, a l'IdISBa es van realitzar una sèrie d'estudis relacionats amb el CRPC. Per una banda es van centrar en la via de WNT com a diana terapèutica i, per altra banda, es va analitzar l'expressió diferencial tant de miRNAs com de mRNAs de pacients en diferents estadis de la malaltia. Per això, es van obtenir mostres de dos grups de pacients: 1) hormono-sensibles (n=10) i 2) hormono-resistents (n=10); per tal de poder-los comparar. L'objectiu del treball era analitzar els mRNAs i els miRNAs diferencialment expressats entre aquests dos grups de pacients per tal d'identificar gens i miRNAs implicats en els processos de resistència a la teràpia hormonal. Aquest darrer estudi es va dur a terme mitjançant la tècnica del *microarray*. El que es va obtenir és una llista de miRNAs i mRNAs seleccionats per la seva implicació en la via de WNT, ordenats segons el seu *fold change* i el p-valor, expressats de manera diferencial entre els dos grups de pacients (**taula VI**). Aquestes dades ens proporcionen possibles dianes per a futurs estudis per tal de determinar els miRNAs més rellevants com a marcadors pronòstics de la malaltia.

Els següents miRNAs, entre altres, es troben més expressats en càncer de pròstata hormona-sensible que en l'estadi resistent a castració: miR-205-5p, miR-143-5p, miR-143-3p, miR-31-5p i miR-145-5p. Els següents miRNAs, entre altres, es troben més expressats en l'estadi resistent a castració que en càncer de pròstata hormona-sensible: miR-183-3p, miR-1301-3p, miR-4264, miR-3609 i miR-425-5p. Les dianes de miR-205-5p i de miR-1301-3p estan íntimament relacionades amb la via de Wnt ja que regulen l'expressió de SFRP1 i SFRP2 (reguladors de la via de WNT) i WNT5A (lligand de la via de WNT).

Taula VI. MiRNAs implicats en les resistències a fàrmacs.

Expressió en CRPC	miRNA	Diana	Via de senyalització
-	miR-143-5p	MAPK9, GSK3B, TCF3	WNT
+	miR-15b-5p	ROR1, MAPK9, LRP6, TCF3	
-	miR-31-5p	MAPK9, LRP6, CSNK1D	
+	miR-3609	WNT5A, SFRP2, GSK3B	
+	miR-1301-3p	SFRP1, SFRP2, ROR1, GSK3B	
-	miR-143-5p	AR, PIK3R1, PIAS3	RA
+	miR-1301-3p	AR, PIK3R1, GSK3B, NR2C2	
-	miR-205-5p	AR, PTEN, RNF4	
+	miR-4284	HDAC1, GSK3B, LIMK2	
+	miR-130b-3p	AR, PTEN	

(-): infraexpressió en CRPC. (+): sobreexpressió en CRPC. Els següents miRNAs presenten l'expressió diferencial més significativa entre pacients hormona-sensible i pacients amb CRPC.

#### 4. Hipòtesis

1. Determinats miRNAs i les seves dianes relacionades amb la via de WNT poden regular l'aparició de resistències als tractaments.
2. Els nivells d'expressió de determinats miRNAs i els seus mRNAs diana poden ser bons marcadors pronòstics en càncer de pròstata resistent a la castració.

#### 5. Objectius

1. Realitzar la validació dels resultats obtinguts amb *microarray* mitjançant la tècnica de la qPCR, tant en línies cel·lulars com en un set de mostres de pacients independent.
2. Analitzar les dades obtingudes prèviament pel grup d'investigació amb la finalitat de trobar possibles miRNAs i mRNAs relacionats amb vies de senyalització diferents a la via de WNT, implicades en la resistència a la castració.

#### 6. Materials i mètodes

Es tracta de un treball mixt format per recerca bibliogràfica, treball experimental i anàlisi de dades utilitzant eines bioinformàtiques.

##### 6.1 Recerca bibliogràfica.

Es va realitzar una recerca primària usant els criteris i les paraules claus representades a la **taula VII**. Després del cribratge inicial, es va procedir a la lectura dels 56 articles restants. D'aquests 56 alguns es van descartar per presentar informació repetida o similitud a altres articles de més actualitat. S'han usat 23 articles per realitzar la part bibliogràfica del treball.

**Taula VII. Metodologia emprada per la recerca bibliogràfica.**

Paraules clau	Sense filtre	TCG	Revisió	DP	Títol d'interès
"Prostate cancer and Wnt"	699	434	432	49	10
"Prostate cancer and miRNA"	322	208	39	39	10
"Prostate cancer and liquid biopsy"	298	154	132	v42	6
"Advanced prostate cancer"	18397	7471	1576	700	13
"Prostate cancer epigenetics"	1971	1255	214	104	8
"Prostate cancer diagnosis and miRNA"	448	448	72	46	5
"ADT and prostate cancer"	52	52	6	3	3
"molecular mechanisms of prostate cancer resistance acquisition"	2781	1372	265	3	1
<b>Total</b>	<b>24968</b>	<b>11394</b>	<b>2736</b>	<b>986</b>	<b>56</b>

Es va realitzar una recerca primària usant Pubmed i les paraules claus següents: "Prostate cancer and Wnt", "Prostate cancer and miRNA", "Prostate cancer and liquid biopsy", "Advanced prostate cancer", "Prostate cancer epigenetics", "Prostate cancer diagnosis and miRNA" "molecular mechanisms of prostate cancer resistance acquisition", "ADT and prostate cancer". Es van obtenir 24.968 entrades. Per tal d'agilitzar el procés d'obtenció d'informació i reduir notablement la n de articles inicial, es van aplicar els següents filtres i criteris; Es varen descartar totes aquelles entrades que eren d'accés limitat. S'usaren les entrades amb text complet i gratuït (TCG) (n=11.394). En segon lloc es va donar preferència a les revisions per tal de poder obtenir una gran quantitat d'informació resumida en una n baixa (n=2736) De les primeres dues paraules claus únicament es van tenir en compte aquells que van ser publicats (DP) dintre dels darrers 10 anys (n=88), de la resta es van tenir en compte els publicats dintre dels darrers 5 anys (n=898). Una vegada acabat el cribratge inicial es va passar a revisar els títols de les 986 publicacions, descartant aquells irrelevants, poc relacionats o repetits. Dels 56 restants es va mirar el resum i en cas de considerar-ho adient el document complet. Es descartaren aquells amb contingut poc rellevant o massa similars amb altres documents més actualitzats. Finalment s'han tingut en compte 23 articles per realitzar la part bibliogràfica del treball.

## 6.2 Línies cel·lulars.

Es va estudiar l'expressió de miR-1301-3p i miR-205-5p en 4 línies cel·lulars: PC-3 (ATCC® CRL-1435™), DU-145 (ATCC® HTB-81™), 22Rv1 (ATCC® CRL-2505™) i LNCaP (ATCC® CRL-1740™). Les primeres tres es van usar com a model representatiu del càncer de pròstata resistent a castració, mentre que LNCaP es va usar com a control homona-sensible. Les principals característiques s'han resumit en la **taula VIII**. Es van emprar els següents medis de cultiu: F-12NutMix, L-glutamina per les PC-3; medi EMEM per les DU-145; RPMI-1640 per les 22Rv1 i LNCaP. A més, tots els medis es van preparar enriquits amb un 10% de sèrum fetal boví i una mescla d'antibiòtics de penicil·lina i estreptomicina (1%).

Taula VIII. Característiques principals de les línies cel·lulars emprades.

Línea celular	RA	BRCA1	BRCA2	APC	CTNNB1	Origen	Tipus tumoral
PC-3	mut	mut	mut	mut	wt	Metàstasi òssia	AI/ANS
DU-145	mut	wt	mut	wt	wt	Metàstasi òssia	AI/ANS
22Rv1	wt	wt	mut	wt	wt	Tumor primari	AI/AS
LNCaP	wt	mut	mut	wt	mut	Metàstasi nòdul limfàtic	AD

Estan descrites les mutacions de sanger més rellevants que presenta cada línia. El focus està en el RA (el receptor d'andrògens), BRCA 1 i 2 (gens supressors de tumors), APC (gen supressor de tumors) i CTNNB1 (relacionat amb la  $\beta$ -catenina). **mut**: mutat. **wt**: fenotip salvatge (wild-type). **AI**: independent d'andrògens. **ANS**: no sensible als andrògens. **AS**: sensible als andrògens. **AD**: androgen dependent.

### 6.3 Mostres de pacients.

Per a la validació de dades prèvies de *microarrays*, es van seleccionar 5 pacients hormona-sensibles i 5 pacients resistents a castració. Per a motius de limitació temporal, només es van poder realitzar determinacions dels 5 pacients resistents a castració. Es va estudiar l'expressió de miR-1301-3p i miR-205-5p a partir de mostres en parafina obtingudes de pacients seleccionats (**taula IX**), concretament pacients amb càncer de pròstata resistent a castració (n=5). La línia cel·lular LNCaP fou usada com a control hormona-sensible.

Taula IX. Característiques principals dels pacients emprats per realitzar la validació.

Pacient	Grup	Edat (Anys)	PSA [ng/ $\mu$ l]	Gleason	Metàstasi	Exitus
MP-24	CRPC	63	24	3+4 = 7/10	1	0
MP-25	CRPC	70	-	4+5 = 9/10	1	1
MP-26	CRPC	69	53	4+3	1	0
MP-27	CRPC	60	33	3+4 = 7	1	1
MP-28	CRPC	68	5,15	5+4 = 9	0	1

### 6.4 Extracció d'RNA.

**A) Línies cel·lulars:** Es va realitzar l'extracció d'RNA total partint de 1 mL de llisat de cèl·lules en trizol seguint el protocol *PureLink™ RNA MiniKit* de la casa comercial *Thermo Fisher Scientific®*. Per a l'extracció d'RNA, primer es va fer una separació de fases. Es van afegir 200  $\mu$ L de cloroform per cada mL de trizol. Després es va centrifugar obtenint 3 fases: una fase on hi ha l'RNA, una interfase i una fase orgànica on hi ha les proteïnes i el DNA. Es van afegir 600  $\mu$ L d'etanol al 70% a la fase aquosa. El sobrenedant es transfereix a les columnes o mitjançant continus rentats amb *Wash Buffer I* i *Wash Buffer II*, i continues centrifugacions s'aïllarà l'RNA. L'RNA purificat final s'elueix amb 30  $\mu$ L d'aigua lliure de RNAases a una eppendorf. Posterior a l'extracció es va quantificar l'RNA mitjançant l'espectrofotòmetre *SYNERGY microplate reader* (*BioTek*) i s'anotaren les ràtios per tal de quantificar l'RNA obtingut.

**B) Mostres de pacients:** Es va realitzar l'extracció de l'RNA total a partir de talls de mostres parafinades, concretament 3 talls de 20µm seguint el protocol de la casa comercial *Thermo Fisher Scientific*® i usant el kit RecoverAll™ Total nucleic acid isolation de *ambion*®. Es va afegir 1 mL del reactiu citrus i es van realitzar una sèrie de centrifugacions i incubacions. Al precipitat resultant es va afegir 1 mL d'etanol 100%, es va centrifugar i repetir el procés. El precipitat es va assecar amb un concentrador. Es van realitzar una sèrie d'incubacions amb *Digestion Buffer* i 4 µL de proteasa. Posterior a l'extracció es va quantificar l'RNA mitjançant espectrofotòmetre *SYNERGY microplate reader (BioTek)* i s'anotaren les ràtios per tal de quantificar l'RNA obtingut.

## 6.5 Retrotranscripció.

Totes les mostres es van diluir per tenir una concentració de 5ng/µL. L'RNA total es va retrotranscriure a cDNA seguint el protocol de *Thermo Fisher Scientific*® amb els reactius comprats a *Qiagen N.V.* El volum final de la reacció és de 10 µL. Les condicions de la PCR es representen a la **Taula X**.

Taula X. Protocol de transcripció inversa.

Pas	Temperatura	Temps
Transcripció inversa	42°C	60 min
Inactivació de la reacció	95°C	5 min
Emmagatzematge	4°C	∞

## 6.6 PCR i anàlisi estadístic.

La detecció de l'expressió dels miR-205 i miR-1301 es va dur a terme amb una qPCR (Eco Real Time, BIO-RAD), i reactius comprats a *Qiagen N.V.* Es va aplicar una dilució 1/20 del cDNA. Totes les mostres es van processar per duplicat. El volum final de reacció fou de 10 µL, 7 µL de master mix de PCR i 3 µL del cDNA diluït. Es va emprar el fluorocrom SYBR Green (SYBR Green PCR Kit (600) (339346) i el miR-3940-5p per al *housekeeping*. Es van usar els següents primers de Bionova: hsa-miR-3940-5p (LNA PCR primer set, UniRT (339306) (YP02114897), hsa-miR-1301-3p (LNA PCR primer set, UniRT (339306) (YP0211482) i hsa-miR-205-5p (LNA PCR primer set, UniRT (339306) (YP00204487). Per cada línia cel·lular es va realitzar una n=2. Els càlculs s'han realitzat seguint la següent fórmula (24) Pfaffl M. W. (2001):

$$A) \text{Log2Ratio} = \text{Log2} (2^{-dDcq})$$

$$dDcq = ((cq \text{ miRNA Linea C.} - cq \text{ miRNA 3940}) - (cq \text{ miRNA Lncap} - cq \text{ miRNA 3940}))$$

Les dades es van representar usant els Log2Ratios de l'expressió relativa a LNCaP. Les desviacions es representen en forma de SEM (desviació estàndard de la mitja) sempre i quan no s'indiqui el contrari. Les condicions de la PCR es representen a la **Taula XI**.

Taula XI. Protocol de la PCR.

Pas (Nombre de cicles = 40)	Temperatura	Temps
Temperatura d'inici de PCR	95°C	2 min
Desnaturalització	95°C	10 s
<i>Annealing</i>	56°C	1 min
Corba de melting	60-95°C	-

### 6.7 Aspectes ètico-legals.

El projecte inclou tres aspectes ètics importants; la participació de pacients, l'ús de mostres biològiques i el processament de dades personals. Les dades dels pacients van ser identificades amb un codi numèric. Els anàlisis de les mostres biològiques es va limitar estrictament als objectius d'investigació. Els resultats no van ser comunicats fora de l'àmbit del projecte. El consentiment informat del pacient va ser obtingut seguint els procediments locals. Els consentiments informats per a mostres biològiques van ser aprovats pel comitè d'ètica de les Illes Balears (CEIC-IB). L'estudi es va realitzar de conformitat amb els principis de la Declaració d'Hèlsinki.

### 6.8 Obtenció de les dades prèvies per *microarray*.

Es varen obtenir mostres de pacients hormona-sensible per prostatectomia (n=10) i mostres de pacients CRPC per resecció transuretral de la pròstata (RTU) (n=10) (veure **annex 2** ). Els pacients tenien una mitja de 63 anys. Es va seleccionar el teixit tumoral de les mostres obtingudes i es va aïllar tot l'ARN. Es va detectar l'expressió diferencial de miRNAs i mRNAs amb *arrays* d'expressió *Affymetrix* (*GeneChip miRNA 4.0* i *GeneChip Clariom S human arrays*). Procediment general de l'anàlisi: 1) Control de qualitat per les dades crues. 2) Normalització de les dades 3) Filtratge no específic. 4) Identificació dels miRNAs diferencialment expressats. (paquet *limma* Smyth (2005)) 5) Anotació dels resultats. 6) Comparació CPRC vs CPHS. Els resultats es van ordenar de major a menor diferència per el seu *fold-change*. Els miRNA expressats diferencialment es veuen a la **taula VI**. Per controlar el % de falsos positius es van ajustar els p-valors amb el mètode de Benjamini i Hochberg Benjamini & Hochberg (1995).

### 6.9 Bioinformàtica.

Es van analitzar els miRNAs no relacionats amb la via de Wnt de les dades *d'arrays* del grup d'investigació. Es van consultar les següents bases de dades: miRWalk, miRanda, miRDB, RNA22 i TargetScan. Es van seleccionar miRNAs que corresponen únicament a l'espècie humana: **A)** 1 miRNAs i 1 snoRNA sobreexpressats (hsa-miR-149-5p i U78) **B)** 2 miRNAs infraexpressats (hsa-miR-205-5p i hsa-miR-6737-5p). Es van analitzar el hsa-miR-149-5p i hsa-miR-6737-5p, i anotar els mRNA diana predits almenys per tres bases de dades diferents. Finalment es va realitzar una cerca bibliogràfica per descobrir en quina via de senyalització estaven implicats. L'anàlisi de les vies de senyalització es va realitzar amb Reactome (25)

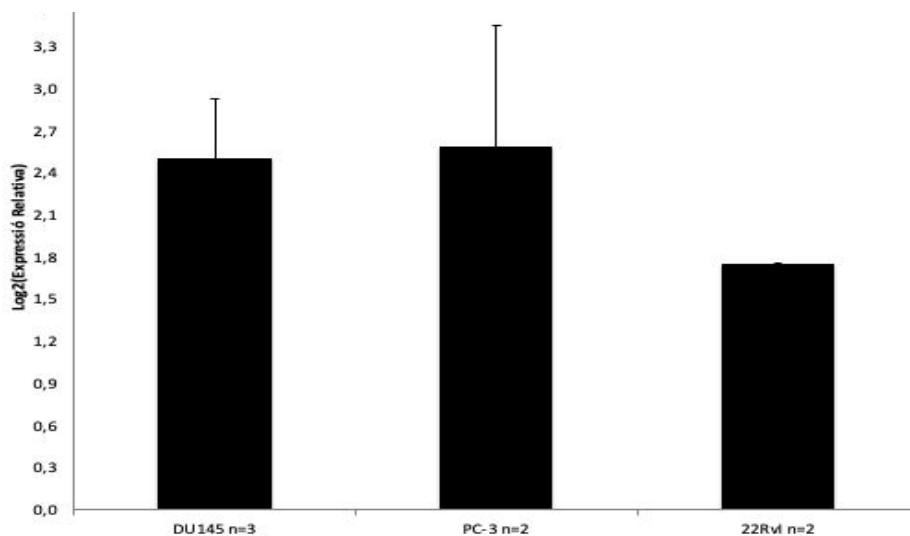


## 7. Resultats

Els miRNAs són molècules d'RNA monocatenari que regulen l'expressió gènica i tenen un paper important en el càncer de pròstata. Els miR-1301 i miR-205 s'han identificat com a possibles implicats en l'adquisició d'un estat CRPC regulant factors clau en la via de WNT, una via amb clares implicacions en càncer de pròstata. Per validar els resultats obtinguts prèviament per la tècnica del *microarray* del grup d'investigació es va estudiar l'expressió diferencial d'aquests miRNAs mitjançant la tècnica de la qPCR, comparant dos grups: grup CRPC i grup control (hormona-sensible), primer en línies cel·lulars i llavors en un nou set independent de mostres obtingudes per prostatectomia i resecció transuretral.

### 7.1 Estudi de validació de canvis d'expressió de miRNAs en línies cel·lulars de càncer de pròstata.

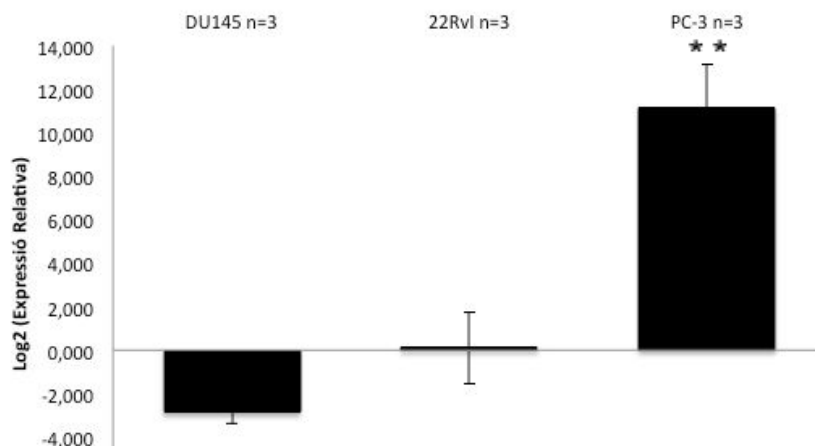
Per tal de validar els resultats obtinguts prèviament pel grup d'investigació, es van emprar les línies cel·lulars DU-145, PC-3 i 22Rv1 (veure **Annex 1** i **taula IX**). Aquestes línies es van seleccionar per la seva hormona-insensibilitat i representaven el grup CRPC. Els valors van expressar el canvi positiu o negatiu respecte a la línia cel·lular control LNCaP. Es va poder observar l'augment en els nivells d'expressió del miR-1301 (**fig.6**) en les línies cel·lulars DU-145, PC-3 i 22Rv1. No es va poder afirmar que l'expressió fou significativament més alta (confirmat amb el test de la t-student amb un p-valor<0,05).



**Fig.6 Expressió relativa del miR-1301 en les línies DU-145, PC-3 i 22Rv1 obtingudes a partir de qPCR amb SYBR green.** Cada valor representava la mitjana  $\pm$  S.E.M. Les tres línies cel·lulars eren hormona-insensibles i es van usar com a model de CRPC. Es va representar el canvi positiu o negatiu de l'expressió d'aquestes línies respecte la control LNCaP, que es va emprar com a model de hormona-sensible. p-valors de 0,411; 0,432; 0,104 (PC-3, 22Rv1, DU-145 respectivament).

Per al miR-205 no es va poder observar una tendència clara en totes les línies cel·lulars (**fig. 7**). En la línia DU-145 l'expressió del miRNA va disminuir respecte a la línia cel·lular control. La línia 22Rv1 no va sofrir cap canvi. Es va observar un augment dels nivells de miR-205 en PC-3.



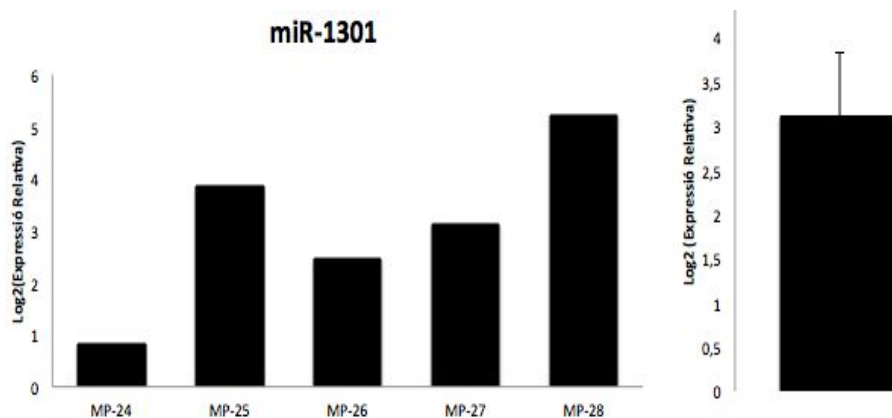


**Fig. 7 Expressió relativa del miR-205 en les línies DU-145, PC-3 i 22Rv1 obtingudes a partir de qPCR amb SYBR green.** Cada valor representava la mitjana  $\pm$  S.E.M. Les tres línies cel·lulars eren hormona-insensibles i es van usar com a model de CRPC. Es va representar el canvi positiu o negatiu de l'expressió d'aquestes línies respecte la control LNCaP, que es va emprar com a model de hormona-sensible. Valors significatius es consideren els que tenen un p-valor $<$ 0,05. P-valors de 0,0038; 0,91; 0,120. (PC-3, 22Rv1, DU-145 respectivament)

Aquests resultats impliquen que s'ha replicat el resultat obtingut pels *microarrays* en el cas del miR-1303, però no en el cas del miR-205. Això pot ser degut a que les línies cel·lulars no siguin suficientment representatives de les mostres de pacients o que s'ha realitzat en un nombre de mostres petit.

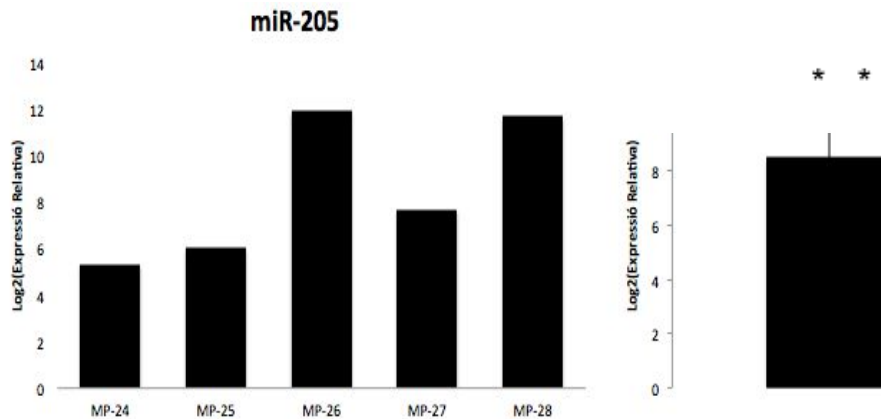
## 7.2 Estudi de validació de canvis d'expressió de miRNAs en un grup de mostres independents de càncer de pròstata.

Per tal de validar els resultats amb mostres més representatives es va seleccionar un set de pacients independents amb les mateixes característiques i es va analitzar segons els procediments explicats en l'apartat de metodologia. Es va poder observar una tendència generalitzada d'augment dels nivells d'expressió del miR-1301 (**fig. 8**) en totes les mostres de pacient analitzades. Es valida doncs el resultat previ obtinguts en el *microarray*.



**Fig. 8 Expressió relativa del miR-1301 en mostres de pacient CRPC (prostatectomia n=5) obtingudes a partir de qPCR amb SYBR green.** Es van representar els valors per cada pacient i la mitja grupal  $\pm$  S.E.M. Es va representar el canvi positiu o negatiu de l'expressió respecte a la línia cel·lular control LNCaP, que es va emprar com a model de hormona-sensible. (p-valor = 0,118)

No es va poder afirmar que la mitja de les expressions fou significativament més elevada que la del control hormona-sensible (confirmat amb el test de la t-student amb un p-valor<0,05, p-valor=0,118) Es va observar un augment generalitzat dels nivells d'expressió del miR-205 (**fig.9**) en totes les mostres de pacient analitzades. La mitja de les expressions va ser significativament més elevada que la del control hormona-sensible (confirmat amb el test de la t-student amb un p-valor<0,05, p-valor=0,002) Així, de la mateixa manera que els resultats observats amb les línies cel·lulars, aquests experiments han permès confirmar les dades obtingudes amb els *microarrays* per al miR-1301, però no per al miR-205.



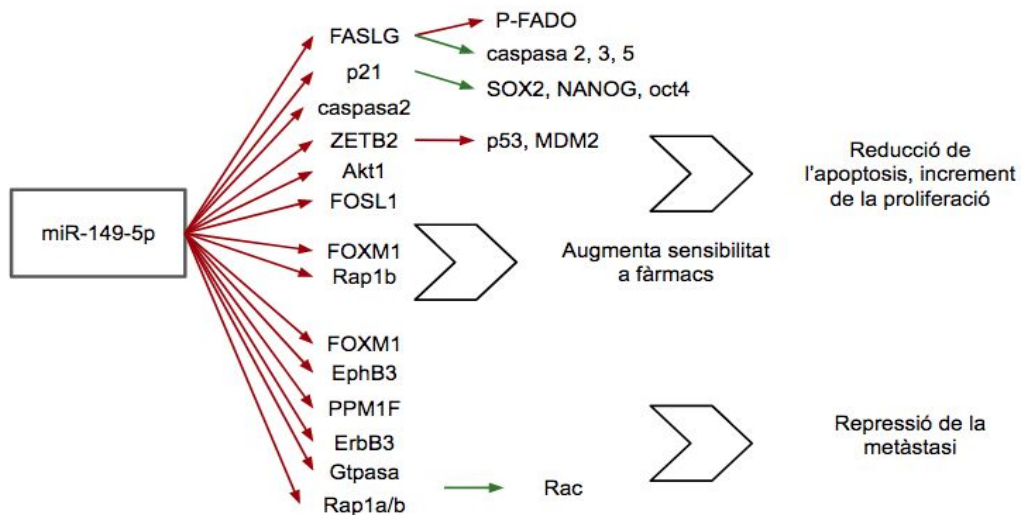
**Fig. 9** Expressió relativa del miR-205 en mostres de pacient CRPC (prostatectomia n=5) obtingudes a partir de qPCR amb SYBR green. Es representen els valors per cada pacient i la mitja grupal  $\pm$  S.E.M. Es representa el canvi positiu o negatiu de l'expressió respecte a la línia cel·lular control LNCaP, que s'empra com a model de hormona-sensible.

## 8. Estudi de perfils de miRNAs implicats en càncer de pròstata resistent a castració mitjançant anàlisi bioinformàtica.

La validació de dades obtingudes amb *microarrays* es va centrar en l'estudi de miRNAs implicats en la via de WNT. Ara bé, aquests experiments previs del grup d'investigació es podien analitzar des d'un punt de vista més ampli, incloent tots els miRNA i no només els que es troben implicats en la via de senyalització WNT. Per aquest motiu, es va realitzar una anàlisi bioinformàtica addicional. Seguint les indicacions de l'apartat 6.9 s'ha realitzat un anàlisi dels miRNA seleccionats (sense implicacions conegudes en la via de WNT). S'han escollit com a dianes dels miRNA aquells gens predits almenys a tres bases de dades (miRWalk, miRDB i Target Scan). S'ha consultat Reactome per esbrinar en quines vies estaven implicats els gens predits. Com a resultat d'aquesta anàlisi, es van trobar tota una sèrie de miRNAs diferencialment expressats entre els dos grups de pacients. De tot aquest llistat, es van seleccionar els miRNAs hsa-miR-149-5p i hsa-miR-6737-5p per a estudiar la seva possible implicació en el càncer de pròstata resistent a castració.

## 8.1 hsa-miR-149-5p.

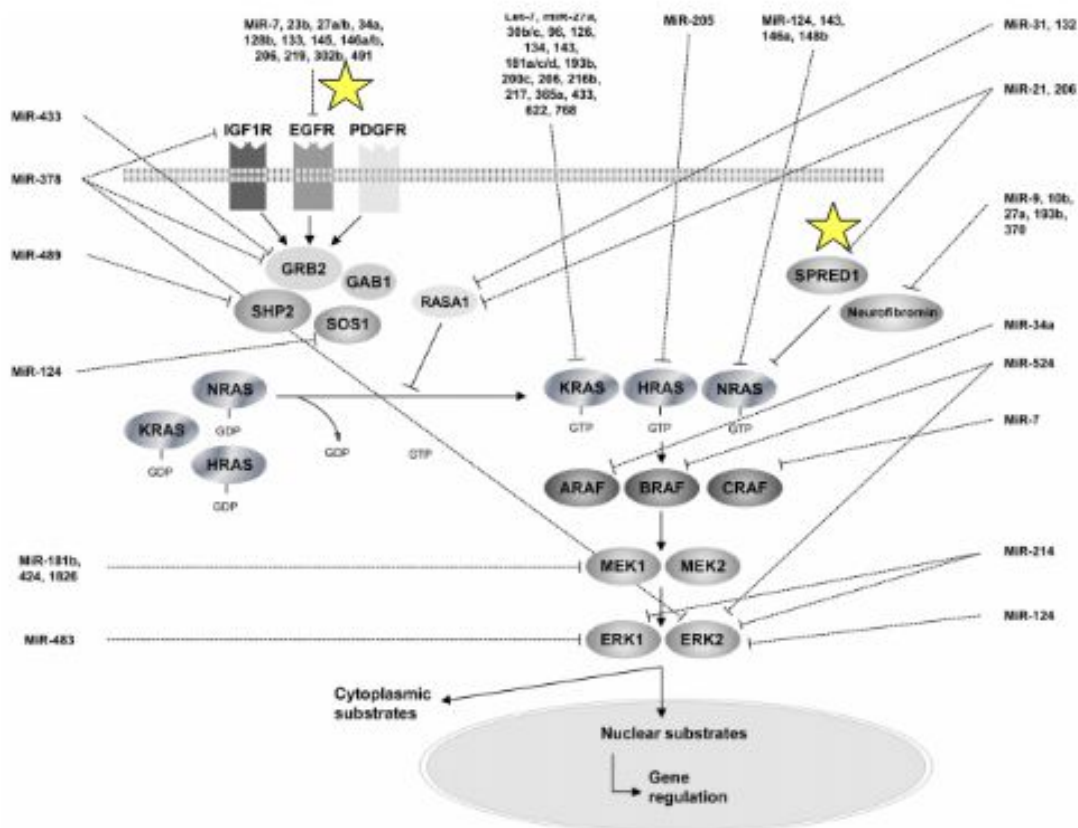
El miR-149-5p (UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC) humà es troba codificat per un exó en 2q37.3. Presenta dues formes: miR-149-5p i miR-149-3p, la primera és més freqüent. L'estructura presenta diferències importants indicant possibles funcions diferents. (25) Les dianes del miR-149-5p es troben a l'**annex 3** (n=168). La sobreexpressió de miR-149-5p s'ha observat en varis càncers, com càncer de pulmó i càncer de pròstata, a més es relaciona amb un pronòstic pitjor. Altres estudis indiquen que la seva expressió es veu disminuïda en càncers, com el de mama o el colorectal. Això fa evident un paper dual, tumor-dependent d'aquest miRNA. (26) Algunes de les vies descrites en les que participa miR-149-5p són la via ERBB, la via de senyalització de la insulina, la via de MAPK i les vies de senyalització mediades per citocines quimiotàctiques. Aquestes vies promouen la proliferació i el creixement tumoral. S'ha descrit que aquest miRNA disminueix l'apoptosi, per exemple, regulant negativament el lligand FAS (FASLG). Altres estudis en canvi també descriuen que la sobreexpressió de miR-149-5p contribueix a la supressió de la migració i sensibilització a fàrmacs. Alguns mecanismes d'actuació simplificats s'observen en la **fig. 10** (26) Reactome, per altra banda, ha pogut reconèixer 131/168 dianes, proposa que les principals vies en les que estan implicades (p-valor<0,05) les dianes del miR-149-5p són: l'activació de PUMA i la seva translocació a la mitocòndria (p-valor=0,001), l'activació de les proteïnes *BH3-only* (p-valor=0,004), senyalització oncogènica mediada per MAPK (p-valor=0.006), aparició de la resistència a sorafenib i imatinib (p-valor=0,026) i la transcripció de gens apoptòtics mediada per FOXO (p-valor=0,028). Tots aquests processos tenen un paper en càncer.



**Fig. 10 Vies regulades pel miR-149-5p.** El miR-149-5p té un paper dual en càncer. Per una banda s'ha relacionat amb la reducció de l'apoptosi i un conseqüent increment en la proliferació cel·lular. Però per altra banda també participa en augmentar la sensibilitat a fàrmacs i la repressió de la metastasi. Això ens du a pensar que estarà sotmès a un regulació molt específica i que aquesta podria ser estadi dependent. **FASLG:** La via extrínseca de l'apoptosi o l'anomenada apoptosi mediada per receptors, és aquella iniciada un pic un lligand de mort cel·lular s'uneix al seu receptor, per exemple Fas (CD95) (receptor) i FasL (lligand). L'acció del miR-149-5p disminueix la via intrínseca que participa en la mort cel·lular podent ser un possible mecanisme de resistència als tractaments. **p21:** Es tracta d'un dels gens expressats per p53, activat en resposta a l'estrès cel·lular. L'activació de p21 produeix una aturada en el cicle cel·lular ja que inhibeix els complexos ciclina-CDK necessaris per la progressió. El silenciament de p21 permet continuar amb l'expressió de gens relacionats amb la proliferació i diferenciació cel·lular com *SOX2*, *OCT4* i *NANOG*. (26)

## 8.2 hsa-miR-6737-5p.

El miR-6737 humà (UUGGGGUGGUCGGCCUGGAG) es troba codificat en el cromosoma 1q21.3. Les dianes d'aquest miRNA es representen a l'annex 4 (n=422). La literatura sobre aquest miRNA en càncer és escassa. Reactome ha pogut reconèixer 320/422 dianes, proposa que les principals vies en les que estan implicades (p-valor<0,05) les dianes del miR-6737-5p són: la transcripció de receptors nuclears (p-valor=0,005) i la dissociació dels complexos IAP-caspasa mediada per Smac (Diablo) (p-valor=0,019), aparició de la resistència a sorafenib i imatinib (p-valor=0,026) i la transcripció de gens apoptòtics mediada per FOXO (p-valor=0,028). Tots aquests processos tenen un paper en càncer. EGFR i SPRED també són dianes d'aquest miRNA. miR-6737-5p podria tenir un paper en la via de MAPK/RAS. La via de MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) integra tota una sèrie de senyals extracel·lulars per tal de promoure respostes que controlen el creixement cel·lular, la supervivència i la diferenciació. Freqüentment aquesta via es troba desregulada en càncer. (27) S'ha vist que hi ha aberracions a diferents nivells d'aquesta via, els miRNAs podrien estar implicats (**fig. 11**) La via Ras-MAPK s'inicia quan un factor de creixement s'uneix a receptors de la superfície cel·lular (RTKs). La unió promou la dimerització d'EGFR, la autofosforilació dels seus residus de tirosina i es generen senyals proliferatives. (27) Sembla interessant que EGFR és una diana de miR-6737-5p.



**Fig. 11 Aberracions a diferents nivells de la via MAPK-RAS amb miRNAs implicats.** Una representació general de la via de les MAPK i els diferents miRNAs que interactuen a diferents nivells de la via. La pèrdua d'un miRNA que silencia EGFR, com miR-6737-5p, miR128b o miR-205 és equivalent a tenir més expressió de EGFR. SPRED3 de la família de les proteïnes "Sprouty" també és diana de miR-6737-5p. S'ha descrit que la família SPRED inhibeix la via RAS-MAPK. (27)

Per tant es podria tractar d'un miRNA supressor de tumors. La via de MAPK-RAS també es troba entre les identificades per al miR-149-59 (per exemple les dianes: *RAP1A*, *DUSP16*, *CLCN6* i *BCL2L11*).

## 9. Discussió

---

**A) miR-1301.** Els resultats obtinguts en línies cel·lulars i en mostres de pacients apunten a que les dades obtingudes amb els *microarrays* són correctes. No s'han obtingut resultats significatius en les línies cel·lulars, segurament degut a la petita mida mostral. Un altre estudi en el que observem una tendència similar del miR-1301 en PC-3 i DU145 es va realitzar per Xian-Lu Song et al. (28) Els resultats obtinguts en les mostres de pacients són significatius però s'han d'interpretar tenint en compte que s'han referenciat a una línia cel·lular i no a un grup de pacients hormona-sensibles. miR-1301 es troba sobreexpressar en càncer de pròstata hormona-insensible. Xian-Lu Song et al. (28) entre altres descriuen com miR-1301 a través de les seves dianes es capaç d'activar la via de WNT, per exemple incrementant l'expressió de  $\beta$ -catenina nuclear. Entre els seus *targets* es troben la GSK3B i SFRP1. La via de WNT com hem vist té un paper important en la progressió cap a un estadi CRPC, a través de diferents mecanismes, com per exemple la interacció amb el receptor d'andrògens.

**B) miR-205.** Els resultats obtinguts tant en línies cel·lulars com en mostres de pacients difereixen notablement de les dades obtingudes amb els *microarrays*, per tant per aquest miRNA no es poden validar els resultats. Els resultats obtinguts suggereixen una tendència del miR-205 de ser sobreexpressat en pacients CRPC. Cal destacar que la literatura científica dóna suport al que veiem reflectit en les dades obtingudes amb els *microarrays* i suggereix una infraexpressió del miRNA amb paper tumor-supressor. Cal destacar que tant en línies cel·lulars com en mostres de pacients no es pot validar el mateix miRNA diana, això ens du a pensar que podria ser que les línies cel·lulars no siguin prou representatives de les mostres de pacients inicials i pot ser una n de 5 mostres de pacients no sigui suficient per a validar aquest miRNA. Per tal de validar-ho, s'haurien de fer determinacions en un nombre més elevat de mostres de pacients. La línia a les que es referencia cada grup de pacients o línia cel·lular CRPC és LNCaP. En general, usar una línia cel·lular en lloc de mostres de pacients com a control pot veure's com una limitació del experiment, que en el cas d'aquest treball no s'ha pogut millorar degut a les limitacions temporals de l'estat actual.

**C) miR-149.** El miR-149 es troba sobreexpressat en càncer de pròstata CRPC. S'ha realitzat un recerca en bases de dades per tal de trobar les seves dianes entre les quals estan *RASD2*, *TCF12*, *BCL2L2*, *FASLG*, *TNFRSF19*, *IL6*, *IGF2BP1*, *TP63* i *EIF5*. Un pic analitzat en quines vies es troben implicades les seves dianes podem afirmar que aquest miRNA actúa principalment regulant les vies de mort cel·lular, més concretament les anti-apoptòtiques. Regulant l'apoptosi podria estar implicat en l'aparició de resistències a fàrmacs. Per altra banda, s'ha descrit en altres estudis que el miR-149 també presenta propietats antitumorals. Això fa evident el paper dual i tumor-dependent d'aquest miRNA. Fan falta més estudis per tal de veure el paper concret d'aquest miRNA en càncer de pròstata i en l'adquisició de resistència als fàrmacs.

**D) miR-6737.** El miR-6737 es troba infraexpressat en càncer de pròstata CRPC. S'ha realitzat un recerca en bases de dades per tal de trobar les seves dianes entre les quals estan *EGFR*, *HIP1*, *IGF2*, *IFFO2*, *KSR2*, *MMP42*, *MAP1A*, *MAX*, *MAPKAPK2*. No es tracta d'un miRNA molt descrit. Un pic analitzat en quines vies es troben implicades les seves dianes proposam que aquest miRNA sobretot actua regulant la via de les RAS-MAPK. La via de RAS-MAPK es troba desregulada en molts càncers i no sembla estrany que també podria tenir un paper en càncer de pròstata. La via de MAPK (RAS-RAF-MEK-ERK) integra tota una sèrie de senyals extracel·lulars per tal de promoure respostes que controlen el creixement cel·lular, la supervivència i la diferenciació, podent ajudar a superar els efectes de determinats fàrmacs. Fan falta més estudis per tal de veure el paper concret d'aquest miRNA en càncer de pròstata i en l'adquisició de resistència als fàrmacs.

### **9.1 Perspectives futures: la biòpsia líquida.**

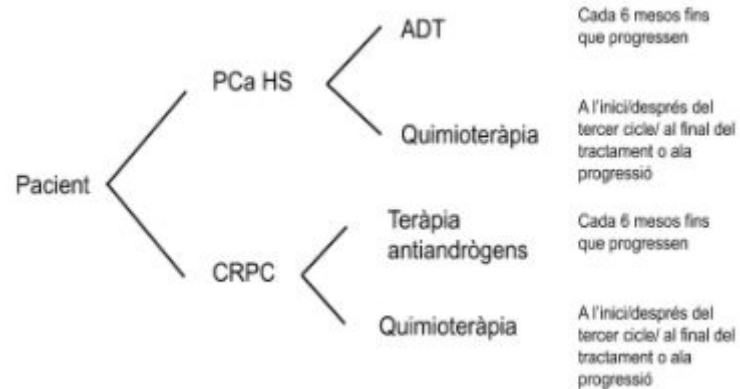
Els miRNAs extracel·lulars es poden trobar en una gran varietat de biofluids humans com són la sang, l'orina, la llet materna, el líquid amniòtic, les llàgrimes i el líquid pleural. La saliva i la llet materna, entre altres, presenten el contingut més elevat de miRNAs lliures mentre que l'orina en conté considerablement menys. Alguns miRNAs són biofluid específics. Diferents estudis descriuen que aquests miRNAs accedeixen a l'espai extracel·lular units a proteïnes com Argonaute2 o lipoproteïnes de alta densitat (HDL), o majoritàriament dins les anomenades EVs (de l'anglès *extracellular vesicle*). EV fa referència a quasi qualsevol vesícula amb una bicapa lipídica que pugui ser secretada a l'espai extracel·lular, entre les principals: exosomes, microvesícules i cossos apoptòtics. Les EV contenen gran varietat d'RNAs no codificants com miRNAs, snoRNAs, tRNA, piRNA i rRNA. S'ha vist que l'exportació d'alguns miRNA és altament selectiva podent ser un mètode per diferenciar càncer localitzat de metastàtic. A part de poder caracteritzar millor el càncer també es podria usar aquesta tècnica per associar els miRNAs lliures amb la resposta a la teràpia. Un cas concret són els pacients CRPC que no responen al compost docetaxel. Aquests pacients presenten nivells elevats dels membres de la família miR-200 mentre que els de la miR-17 es troben disminuïts en plasma i sèrum (abans de la teràpia amb docetaxel). Identificar miRNAs concrets amb la biòpsia líquida podria ajudar a identificar pacients que respondran a certs tractaments o no. (8)

Cal destacar que la biòpsia líquida presenta tota una sèrie d'avantatges sobre els mètodes de biòpsia sòlida tradicional. Es tracta d'un mètode no invasiu que permet la detecció sistèmica a temps real de DNA lliure, cèl·lules tumorals circulants i miRNAs. Evita les possibles complicacions que hem descrit en relació amb la biòpsia sòlida. D'aquesta manera es pot millorar el seguiment del pacient i respondre més ràpidament a petits canvis. (7) Per aquests motius, la identificació de miRNAs que puguin ser bons marcadors pronòstics o predictius de resposta com els candidats seleccionats amb aquest estudi, pot ser una primera passa per tal de validar-los en biòpsia líquida i comprovar la seva utilitat clínica. Al laboratori, ja s'estan recollint mostres de pacients de manera prospectiva per a validar aquests miRNAs en biòpsia líquida.



A continuació, s'explica l'esquema de recollida de mostres de biòpsia líquida pels pacients amb càncer de pròstata que s'està portant a terme a un estudi de l'IdISBa (fig.12).

**Fig.12 Esquema de recollida de mostres de biòpsia líquida pels pacients amb càncer de pròstata.** Càncer de pròstata hormonosensible (PCa HS): a l'inici del tractament (ja sigui ADT o quimioteràpia). A) Si és ADT cada 6 mesos fins que progressen. B) Si és quimioteràpia, a l'inici/després del tercer cicle/ al final del tractament o a la progressió. Càncer de pròstata resistent a la castració: a l'inici del tractament (ja sigui amb antiandrògens o quimioteràpia). A) Si és antiandrògens cada 6 mesos fins que progressen. B) Si és quimioteràpia, a l'inici/després del tercer cicle/al final del tractament o a la progressió.



## 10. Conclusions

Els miRNAs podrien ser bons biomarcadors. El miR-1301 es troba expressat de manera diferencial en línies cel·lulars i mostres de pacients CRPC comparat amb un control hormona-sensible (augmenta la seva expressió en CRPC). Podria ser un possible candidat per tal de predir l'evolució del pacient i si respon als tractaments. Un mètode per detectar aquest miRNA i altres podria ser la biòpsia líquida, aquesta presenta una àmplia gamma d'avantatges comparat amb els mètodes invasius tradicionals. Tot i que els estudis atribueixen als miRNAs certa estabilitat (a la degradació) en sèrum i plasma, s'han observat fluctuacions importants en els nivells detectats post-processament de mostres de sang. (7) Altres factors a tenir en compte a l'hora de processar mostres són la contaminació per plaquetes i la possible hemòlisis. Això destaca la importància d'estandarditzar els procediments d'obtenció de mostres i del processament per tal d'homogeneïtzar els estudis. No hem pogut observar tendències concloents per al miR-205, tot i que s'han observat en altres estudis. Ambdós miRNAs tenen entre les seves dianes efectors o reguladors de la via de WNT i altres que regulen la via de senyalització d'andrògens. Com hem descrit, la via de WNT es troba altament desregulada en càncer de pròstata podent tenir un paper clau en la progressió i adquisició de resistències als fàrmacs. Fan falta més estudis posteriors per tal d'esbrinar si l'efecte que exerceixen aquests miRNAs en la via de WNT presenta un paper directe en l'adquisició de resistències. Entre les eines més potents de l'investigador modern es troba la bioinformàtica, que li dona accés tant a bases de dades immenses com a eines per tal d'interpretar els resultats. Aquesta és una forma per tal de trobar nous miRNAs prometedors i poder realitzar primers estudis a posteriori. Entendre l'epigenoma i concretament el miRnoma del càncer de pròstata serà crucial per poder desenvolupar nous fàrmacs més potents amb la finalitat d'evitar les resistències i dissenyar mètodes clínics fiables de diagnòstic per a tots els estadis del càncer de pròstata i millorar-ne el pronòstic.

## 11. Bibliografía

---

1. Resumen DE Hiperplasia Prostática - 30501003 - UAN - StuDocu [Internet]. [cited 2020 Jun8]. Available from: <https://www.studocu.com/gt/document/universidad-antonio-narino/fisiologia-i/resumenes/resumen-de-hiperplasia-prostática/6042635/view>
2. Gann P. H. (2002). Risk factors for prostate cancer. *Reviews in urology*, 4 Suppl 5(Suppl 5), S3–S10.
3. Salido-Guadarrama I., Rangel-Escareño C., García-Tobilla P., Solórzano-Rosales S. M-OH y RDM. Papel de los andrógenos en el desarrollo del cáncer de próstata: Un estudio sobre miRNAs.
4. Davey, R. A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *The Clinical biochemist. Reviews*, 37(1), 3–15.
5. Liao, R. S., Ma, S., Miao, L., Li, R., Yin, Y., & Raj, G. V. (2013). Androgen receptor-mediated non-genomic regulation of prostate cancer cell proliferation. *Translational andrology and urology*, 2(3), 187–196. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2223-4683.2013.09.07>
6. Rice, M. A., Malhotra, S. V., & Stoyanova, T. (2019). Second-Generation Antiandrogens: From Discovery to Standard of Care in Castration Resistant Prostate Cancer. *Frontiers in oncology*, 9, 801. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00801>
7. Munteanu, V. C., Munteanu, R. A., Onaciu, A., Berindan-Neagoe, I., Petrut, B., & Coman, I. (2020). MiRNA-Based Inspired Approach in Diagnosis of Prostate Cancer. *Medicina (Kaunas, Lithuania)*, 56(2), 94. <https://doi.org/10.3390/medicina56020094>
8. Endzeliņš, E., Melne, V., Kalniņa, Z., Lietuvietis, V., Riekstiņa, U., Llorente, A., & Linē, A. (2016). Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: a systematic review. *Molecular cancer*, 15(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0523-5>
9. Takayama, K. I., Misawa, A., & Inoue, S. (2017). Significance of microRNAs in Androgen Signaling and Prostate Cancer Progression. *Cancers*, 9(8), 102. <https://doi.org/10.3390/cancers9080102>
10. Huang, Y., Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G. (2018). Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncology letters*, 15(5), 6063–6076. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8123>
11. Wang, K., Ruan, H., Xu, T., Liu, L., Liu, D., Yang, H., Zhang, X., & Chen, K. (2018). Recent advances on the progressive mechanism and therapy in castration-resistant prostate cancer. *OncoTargets and therapy*, 11, 3167–3178. <https://doi.org/10.2147/OTT.S159777>
12. Ruggero, K., Farran-Matas, S., Martinez-Tebar, A., & Aytes, A. (2018). Epigenetic Regulation in Prostate Cancer Progression. *Current molecular biology reports*, 4(2), 101–115. <https://doi.org/10.1007/s40610-018-0095-9>
13. Si, W., Shen, J., Zheng, H., & Fan, W. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical epigenetics*, 11(1), 25. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0587-8>
14. Razdan, A., de Souza, P., & Roberts, T. L. (2018). Role of MicroRNAs in Treatment Response in Prostate Cancer. *Current cancer drug targets*, 18(10), 929–944. <https://doi.org/10.2174/1568009618666180315160125>
15. Kim, W. T., & Kim, W. J. (2013). MicroRNAs in prostate cancer. *Prostate international*, 1(1), 3–9. <https://doi.org/10.12954/PI.12011>
16. Sandsmark, E., Hansen, A. F., Selnæs, K. M., Bertilsson, H., Bofin, A. M., Wright, A. J., Viset, T., Richardsen, E., Drabløs, F., Bathen, T. F., Tessem, M. B., & Rye, M. B.

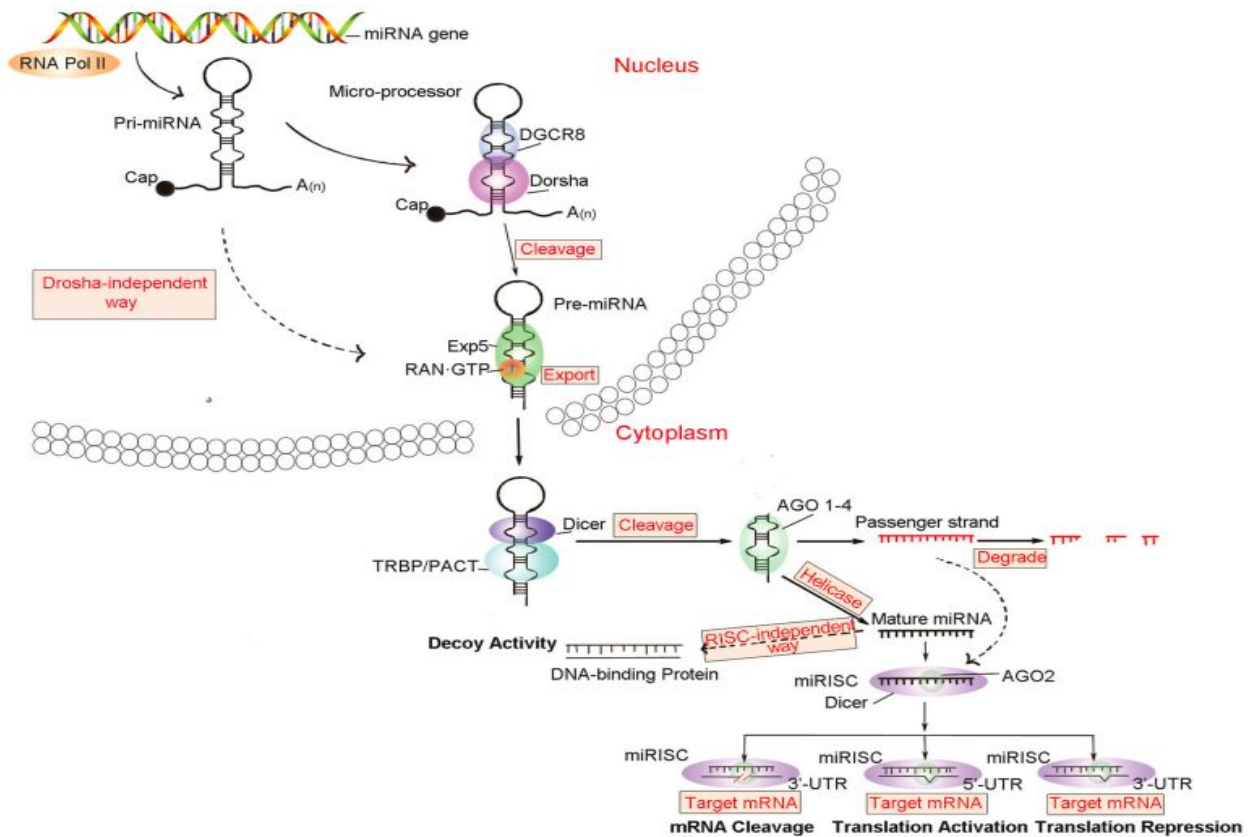


- (2017). A novel non-canonical Wnt signature for prostate cancer aggressiveness. *Oncotarget*, 8(6), 9572–9586. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14161>
17. Murillo-Garzón, V., & Kypka, R. (2017). WNT signalling in prostate cancer. *Nature reviews. Urology*, 14(11), 683–696. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.144>
  18. Pakula, H., Xiang, D., & Li, Z. (2017). A Tale of Two Signals: AR and WNT in Development and Tumorigenesis of Prostate and Mammary Gland. *Cancers*, 9(2), 14. <https://doi.org/10.3390/cancers9020014>
  19. Martin-Orozco, E., Sanchez-Fernandez, A., Ortiz-Parra, I., & Ayala-San Nicolas, M. (2019). WNT Signaling in Tumors: The Way to Evade Drugs and Immunity. *Frontiers in immunology*, 10, 2854. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02854>
  20. Wu, L., Zhao, J. C., Kim, J., Jin, H. J., Wang, C. Y., & Yu, J. (2013). ERG is a critical regulator of Wnt/LEF1 signaling in prostate cancer. *Cancer research*, 73(19), 6068–6079. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-0882>
  21. Syed Khaja, A. S., Helczynski, L., Edsjö, A., Ehrnström, R., Lindgren, A., Ulmert, D., Andersson, T., & Bjartell, A. (2011). Elevated level of Wnt5a protein in localized prostate cancer tissue is associated with better outcome. *PloS one*, 6(10), e26539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026539>
  22. Robinson, D., Van Allen, E. M., Wu, Y. M., Schultz, N., Lonigro, R. J., Mosquera, J. M., Montgomery, B., Taplin, M. E., Pritchard, C. C., Attard, G., Beltran, H., Abida, W., Bradley, R. K., Vinson, J., Cao, X., Vats, P., Kunju, L. P., Hussain, M., Feng, F. Y., Tomlins, S. A., ... Chinnaiyan, A. M. (2015). Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell*, 161(5), 1215–1228. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.001>
  23. Yokoyama, N. N., Shao, S., Hoang, B. H., Mercola, D., & Zi, X. (2014). Wnt signaling in castration-resistant prostate cancer: implications for therapy. *American journal of clinical and experimental urology*, 2(1), 27–44.
  24. Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
  25. Fabregat, A., Sidiropoulos, K., Viteri, G., Marin-Garcia, P., Ping, P., Stein, L., D'Eustachio, P., & Hermjakob, H. (2018). Reactome diagram viewer: data structures and strategies to boost performance. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 34(7), 1208–1214. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx752>
  26. He, Y., Yu, D., Zhu, L., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2018). miR-149 in Human Cancer: A Systemic Review. *Journal of Cancer*, 9(2), 375–388. <https://doi.org/10.7150/jca.21044>
  27. Masliah-Planchon, J., Garinet, S., & Pasmant, E. (2016). RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget*, 7(25), 38892–38907. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6476>
  28. Song, X. L., Huang, B., Zhou, B. W., Wang, C., Liao, Z. W., Yu, Y., & Zhao, S. C. (2018). miR-1301-3p promotes prostate cancer stem cell expansion by targeting SFRP1 and GSK3 $\beta$ . *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 99, 369–374. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.086>

## ABREVIACIONES

**SHC** Src homology 2 domain containing  
**NF- $\kappa$ B** Nuclear factor of kappa light polypeptide  
**JAK-1** Janus Kinase 1  
**GRB2** Growth factor receptor-bound protein 2  
**SRC-1** Steroid receptor coactivator-1  
**G6PD** Glucose-6-phosphate dehydrogenase  
**PGD** 6-phosphogluconate dehydrogenase  
**GPD** Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase  
**SREBP** Sterol regulatory element-binding protein  
**PPARA** Peroxisome Proliferator Activated Receptor Alpha  
**COX2** Cyclooxygenase-2  
**BRCA1** Breast Cancer 1  
**HAT** Histone Acetylase  
**HDAC** Histone deacetylase  
**DNMT** DNA methyltransferase  
**ROR929** RAR-related orphan receptors 929  
**FZD** Frizzled  
**PTX** Paclitaxel  
**WNT** Wingless/Int1  
**AGO** Argonaute  
**SRFP** Secreted frizzled-related protein  
**DKK** Dickkopf  
**SOX2** Sex determining Region Y-box 2  
**Akt1** Ak strain transforming  
**FASLG** Apoptosis antigen 1 ligand

## ANNEX



**Annex 1. Mecanismes de la biogènesis de miRNAs i la regulació genètica.** Les línies contínues representen les vies clàssiques i les altres les no-clàssiques. (13)

**Annex 2. Característiques dels pacients usats en l'apartat 6.8**

Pacient	Grup	Edat [anys]	PSA [ng/μl]	Gleason	Metàstasi	Exitus
MP_02	CPHS	63	17	5	0	0
MP_03	CPHS	67	11,32	7	0	0
MP_04	CPHS	63	10,2		0	0
MP_05	CPHS	61	7,25	6	0	0
MP_06	CPHS	64	18	6	0	0
MP_07	CPHS	60	27,8	7	1	0
MP_08	CPHS	74	16,9	8	1	1
MP_09	CPHS	72	18,8	9	1	1
MP_11	CPHS	69	10,74	7	1	1
MP_12	CPHS	46	10,8	7	0	0
MP_14	CPRC	74	19	8	1	1
MP_15	CPRC	61	21	6	1	1
MP_16	CPRC	60	46	8	1	1
MP_17	CPRC	50	133	8	1	1
MP_18	CPRC	76	28,5	9	1	
MP_19	CPRC	69	1,41	7	1	0
MP_20	CPRC	64		5	1	1
MP_21	CPRC	58	314	10	1	0
MP_22	CPRC	58			1	1
MP_23	CPRC	60	33	7	0	0

AAK1	CABP7	DCLRE1B	GIT1	LMBR1L	PANX1	RAB3B	SH3PXD2A	TCEANC2	ZBTB2
AAR2	CACHD1	DCTN2	GPR137	LOX	PDE1B	RAB3IL1	SHMT2	TCF12	ZBTB4
ACACB	CACNA1C	DMRTA2	GPR88	LSM11	PDGFRA	RAB43	SHROOM2	TCTA	ZNF335
ADAT1	CACNG4	DNAJC18	GUCY1A2	LUC7L3	PDS5A	RAD51D	SLC25A42	TGFB2	ZNF385D
ADCYAP1R1	CBX5	DUSP16	HMGCR	M6PR	PEA15	RAP1A	SLC35B1	TMEM135	ZNF445
AMOTL2	CCDC97	EIF3L	HMOX2	MARCKSL1	PHACTR4	RAP1B	SLC4A4	TMEM234	ZNF597
APBA1	CCNT1	EIF5	IFFO2	MCAT	PHLDB1	RASD2	SLC6A8	TNFRSF19	ZNF704
APPL2	CDK17	ELP5	IGF2BP1	MLEC	PHLPP2	REPS2	SLCO3A1	TNKS	ZNF74
ARHGAP19	CHRM1	ENC1	IGFBP5	MRPL3	PIP4K2B	RIMS4	SNCAIP	TNPO1	
ARHGEF39	CLCN5	EPB41L1	IL6	MSRB3	PLAG1	RNF11	SNCB	TNRC18	
ARPC4	CLCN6	EPHB3	IQSEC2	MXD1	PLEKHA6	RNF138	SNTB2	TP63	
ASB4	CMTM3	EXT1	ISY1-RAB43	N4BP3	PLEKHA8	RNF2	SNX18	TRABD2B	
ATP2A2	CNIH4	FAM126B	JAKMIP2	NDST1	POLDIP2	RNF220	SOCS6	TRIM55	
ATRN	CNNM1	FAM167A	KAT7	NEUROD4	POU2F2	RPS6KL1	SORT1	TSPAN14	
AVL9	CNTNAP2	FAM168B	KCNN3	NFIB	PRIMA1	RSBN1L	SRF	UBFD1	
BAIAP2L1	COL22A1	FASLG	KCNS1	NFIX	PRR15L	RSC1A1	ST3GAL1	UBTD2	
BBC3	CREBL2	FBXL16	KIF2A	NRP2	PSKH1	S1PR2	STARD3	UNC5D	
BCL2L11	CRTC2	FZD5	KLHL3	NXPB3	PTCD1	SEMA4G	STX17	UQCC1	
BCL2L2	CTDSPL	GAB2	KMT2D	PAK3	PURB	SEMA6C	SYT2	WT1	
BRPF3	CYB5B	GFPT1	KXD1	PAN2	R3HDM4	SGTA	TBC1D22B	YWHAZ	

**Annex 3. Dianes del hsa-miR-149-5p.** Mitjançant l'anàlisi de les bases de dades mirWalk, miRDB i TargetScan s'han trobat un total de 168 dianes possibles.

ABHD10	ARRB1	CALB2	CIITA	CYB5R3	DSC3	FCRLA	GRAMD4	HTR3C	KIF21B	MAPKAPK2
ACBD3	ASB6	CAPN6	CISD3	CYBRD1	DUOX2	FGD4	GRIN2A	HTR3D	KIN	MARC1
ACLY	ASIC1	CASP9	CKM	CYP8B1	ECH1	FGL2	GRM6	IFFO2	KLF12	MAX
ACSM2A	ASIC3	CBX7	CLEC2D	DAGLA	EFNB2	FOX11	GTDC1	IGF2	KLF2	MCCD1
ACTR1A	ATP1B2	CC2D1A	CLIC4	DBNL	EGFR	FOXP3	GUCD1	IGFBP5	KREMEN1	MCU
AFF3	ATP2A2	CCDC149	CLIP3	DCLRE1C	ELF4	FSTL4	HAUS5	IGLON5	KRT5	MDGA2
AGAP1	AVPR1A	CCNY	CNTN3	DDA1	ELP3	FZD8	HCLS1	IL5RA	KSR2	MDM4
AGK	B3GALT5	CCR7	COL11A2	DDX19A	EML4	GABBR1	HECTD4	IQGAP3	LCE2C	MCF2D
AK7	B3GNT2	CCT8L2	COL5A3	DDX19B	EPHA1	GCA	HECW1	IQSEC2	LDB3	MEOX1
AMER1	B3GNT6	CD101	CPLX2	DEFB132	ERAP1	GCDH	HELZ2	IQSEC3	LEF1	MET
AMER2	BCAM	CDC42BPA	CPNE3	DLK1	ERC1	GFAP	HGS	ITPKC	LEPROT	METRN
ANKFY1	BRI3BP	CEACAM19	CPNE5	DERL3	FABP2	GIMAP5	HIP1	ITPRIPL2	LHX2	MFGE8
ANKRD52	C16orf58	CELF1	CREB3L1	DGKA	FAM107A	GNG4	HIST2H2BF	IYD	LIMD2	MIER2
ANP32B	C1QTNF1	CELF2	CRTC1	DHRX	FAM155B	GNGT2	HMG2A	JMJD8	LMO4	MMP16
AP4S1	C20orf27	CFL1	CSAG1	DIABLO	FAM219A	GNL1	HMG3B	JPH2	LMOD1	MMP24
APC2	C3orf56	CHD6	CT45A1	DNAJB4	FAM234A	GOLGA1	HNRNPA1	KCNC4	LRCH1	MROH6
APOL6	C8orf86	CHL1	CT45A2	DNAJC8	FBXL18	GPR55	HOMER1	KCNH1	LRP1	MRPL19
AQP2	C9orf116	CHPF	CT45A5	DNASE1L1	FBXL20	GPR6	HRK	KIAA0319	LYPD8	MUC17
ARF3	CABLES2	CHST1	CT45A6	DNM3	FBXO46	GPR82	HSD17B14	KIAA0513	MAP1A	MYO18A
ARPP19	CACNG2	CHST9	CUX1	DRD5	FCER2	GPRC5A	HSPB6	KIAA1211	MAP3K13	MYO1D
MYOZ3	NSD1	PIAS2	PPP1R3G	RBMS2	SH3PXD2A	SOX12	TIMM10B	TRPV3	ZBTB7A	ZSCAN25
N4BP3	NUDT4	PIGG	PPP1R7	RCC2	SH3TC2	SPRED3	TIMM17B	TSPEAR	ZBTB7B	ZSCAN5B
NABP1	NUMBL	PIGL	PPP1R9B	RCOR1	SIX3	SPRR3	TMCC1	TTBK1	ZC3H12A	
NACC1	NXPB3	PIK3CA	PPP3CB	RCOR3	SLC12A7	SPRY1	TMCC3	TTYH3	ZC3H4	
NAP1L5	NXPB4	PIP4K2B	PPP6C	RD3	SLC13A5	SRCAP	TMED10	UBE2QL1	ZCCHC24	
NCDN	OAS2	PIWIL3	PRAF2	RHOH	SLC24A4	SRGN	TMEM150A	UBE2W	ZDHHC3	
NCOA7	OCRL	PIWIL4	PRIMA1	RIMS2	SLC25A23	SSBP3	TMEM216	UGDH	ZDHHC8	
NCR3LG1	ONECUT2	PLA2G2F	PRODH	RNASEH2C	SLC25A4	SSH1	TMEM222	UPK2	ZFHX2	
NEBL	OPA3	PLAA	PRPF4	RNF185	SLC27A5	STX1B	TMEM233	UQCR10	ZKSCAN5	
NFASC	OTOA	PLCG2	PRRG1	RNF43	SLC2A14	SYK	TMEM242	UQCRH	ZMYND10	
NFIC	P2RX2	PLEKHH1	PRUNE2	RS1	SLC36A1	SYN1	TMEM255A	USP4	ZNF302	
NFIX	PARM1	PLTP	PTPRN2	S100A1	SLC46A1	SYNGAP1	TMEM70	VAC14	ZNF345	
NKAIN1	PATZ1	PLXNA4	R3HDM1	S100A7A	SLC48A1	SYT2	TMIE	VPS25	ZNF395	
NME4	PAX1	PML	R3HDM4	SARDH	SLC8A2	SYT5	TNNI1	VPS35	ZNF418	
NOVA2	PBLD	PODXL	RAB37	SCN2B	SLITRK5	SYT7	TOM1L2	VSX2	ZNF451	
NPTXR	PENK	POLR2D	RAB5C	SCNM1	SMG5	TBC1D2B	TOR2A	WFIKN2	ZNF529	
NR3C1	PGPEP1	POTEF	RABL3	SEMA4G	SMPD4	TCF21	TP53	WIPF2	ZNF579	
NRIP2	PHC1	POTEM	RALGPS1	SGCD	SMR3B	TCTA	TPP1	WIZ	ZNF592	
NRN1	PHF8	POU2F3	RALGPS2	SGSM2	SMURF1	TFAP4	TRIM28	WNT4	ZNF609	
NRXN2	PHYHIP	PPP1R16B	RANBP17	SH3GLB2	SNX30	TGM2	TRIQK	XPO4	ZNF774	

**Annex 4. Dianes del hsa-miR-6737-5p.** Mitjançant l'anàlisi de les bases de dades mirWalk, miRDB i TargetScan s'han trobat un total de 422 dianes possibles.