



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Posgrado en Ciencias Farmacobiológicas

Evaluación de la vía antitumoral asociada a la activación de Toll-like Receptor 3 (TLR-3) y la expresión del receptor del ácido retinoico beta (RAR β) en células madre de próstata transformadas por exposición a arsenito de sodio

Tesis
Para obtener el grado de
Doctor en Ciencias Farmacobiológicas

Presenta:
M.C. Ildemar Alvarado Morales

Comité Tutorial

Directora: Dra. Claudia Escudero Lourdes

Tutor: Dra. Catalina Arenas Huertero

Tutor: Dra. Vanesa Olivares Illana

Tutor: Dra. Ruth Elena Soria Guerra

Asesor externo: Dr. Erik Tokar

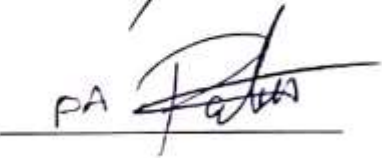
“El programa de Maestría o Doctorado en Ciencias Farmacobiológicas de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, registro 003383, en el Nivel 291236.

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 595473



Evaluación de la vía antitumoral asociada a la activación de Toll-like Receptor 3 (TLR-3) y la expresión del receptor del ácido retinoico beta (RAR β) en células madre de próstata transformadas por exposición a arsenito de sodio. by Ildemar Alvarado Morales is licensed under a [Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Integrantes del Jurado para el examen profesional

Presidenta	Dra. Catalina Arenas Huertero	
Sinodal	Dra. Vanesa Olivares Illana	
Sinodal	Dra. Ruth Elena Soria Guerra	
Sinodal	Dra. Claudia Escudero Lourdes	
Sinodal Externo	Dr. Cesar Enrique Rivas Santiago	



San Luis Potosí, S.L.P.
Noviembre, 2021

**Comité Académico del Posgrado
En Ciencias Farmacobiológicas
Facultad de Ciencias Químicas / UASLP
Presente.**

Por medio de la presente comunicamos que la tesis llevada a cabo por el alumno de Doctorado Ildemar Alvarado Morales, titulada "Evaluación de la vía antitumoral asociada a la activación de Toll-like Receptor 3 (TLR-3) y la expresión del receptor del ácido retinoico beta (RAR β) en células madre de próstata transformadas por exposición a arsenito de sodio", ha sido concluida y aprobada por el comité tutorial para dar inicio a los trámites correspondientes para su titulación, la cual tendrá lugar el próximo día 19 de Noviembre del presente año a las 9:00 hrs. en la sala Audiovisual de la Facultad.

ATENTAMENTE

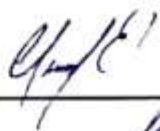
Dra. Claudia Escudero Lourdes
Director de Tesis

Dra. Catalina Arenas Huertero
Tutor

Dra. Vanessa Olivares Illana
Tutor

Dra. Ruth Soria Guerra
Tutor

Dr. Erick Tokar
Asesor externo











Agradecimientos:

Desde mi mas profundo pensar, me gustaría agradecer primero a la Dra. Claudia Escudero, por siempre representar una guía invaluable para todo este proyecto. Ha fungido como una mentora imprescindible en toda mi formación, además de contar con ella como amiga y muchas veces para decirle mis problemas. También a la Dra. Vanesa Olivares, pieza fundamental en el desarrollo de este trabajo, por sus consejos y comentarios. La Dra. Catalina Arenas, quien me ayudó a comprender diferentes cuestiones referentes a este proyecto. A la Dra. Ruth Soria, quien siempre tuvo comentarios acertados para la realización de este trabajo. También al Dr. Tokar, quien siempre me orientó en las diferentes partes de este proyecto. Tampoco puedo olvidar a la Dra. Elizabeth Reynaga, quien me enseñó muchas cosas para este proyecto, así como a diferentes compañeros que han pasado por el laboratorio.

También quiero agradecer a la Dra. Esther Layseca por su colaboración y disposición en ayudar a este proyecto.

Agradecer a muchos de los amigos que ya conocía y a muchos otros que casi acabo de conocer, que siempre me ayudaron y me dieron ánimos en este periodo de mi vida.

A mis dos padres Aeropajita Morales Carmen y Pedro Alvarado Melendrez y a mi hermana Ana María Alvarado Morales, que siempre han representado un lugar seguro donde puedo ir a recargar energías. Los amo siempre.

La Universidad Autónoma de San Luis y a la Facultad de Ciencias Químicas, la cual con todo su personal, tanto de investigación como administrativo, siempre han sido de lo mejor que he conocido y siempre me han ayudado mucho.

Y a todos los que de una forma directa o indirecta, voluntaria o involuntariamente me he cruzado en el camino, que han hecho que esta parte de mi vida haya sido feliz.

“Evaluación de la vía antitumoral asociada a la activación de Toll-like Receptor 3 (TLR-3) y la expresión del receptor del ácido retinoico beta (RAR β) en células madre de próstata transformadas por exposición a arsenito de sodio”

RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es la segunda causa de muertes anuales por cáncer en el mundo; la exposición a arsénico inorgánico (iAs) representa un factor de riesgo. Una estrategia terapéutica para el CaP avanzado involucra el uso del ácido 9-cis retinoico (A9cR) para inducir la diferenciación y muerte de las células madre cancerosas (CSC), ya que es reconocido que son éstas las responsables de la iniciación, progresión, metástasis y resistencia a fármacos en las neoplasias. El mecanismo de AR consiste en su unión a receptores, principalmente de tipo β (RAR β), el cual heterodimeriza con receptores α de AR (RXR) y activan la transcripción de genes asociados a la diferenciación, al control del ciclo celular y a la apoptosis. AR es utilizado en combinación con ácido poliinosóico:policitidílico (PIC), un agonista del Toll-like receptor 3 (TLR3), que induce la apoptosis celular. En células prostáticas la activación de TLR3 induce la re-expresión de RAR β a través de la expresión de miRNA's y la inhibición de las ADN metil-transferasas (DNMT's), impidiendo así la metilación del promotor de RAR β . En este trabajo evaluamos la vía anti-tumoral mediada por la activación de TLR3 y la expresión de RAR β , que fue descrita por Galli y colaboradores en 2014, en células madre y de epitelio que fueron transformadas hacia un fenotipo canceroso por exposición crónica a iAs.

Las células transformadas As-CSCs (células madre cancerosas de próstata) y CAsE-PE (células epiteliales cancerosas de próstata) mostraron menor expresión basal de TLR3 y de RAR β en comparación con sus respectivos controles no cancerosos WPE-Stem y RWPE-1, respectivamente. Las células transformadas por iAs también mostraron una expresión menor de los intermediarios de la vía de TLR3. De forma relevante, las células As-CSCs no fueron responsivas al tratamiento con PIC+A9cR en términos de incrementar RAR y disminuir los marcadores de células madre, mientras que CAsE-PE fue parcialmente responsiva. Estas observaciones apuntan a que la exposición a iAs puede afectar la expresión de TLR3 y degenerar

la vía antitumoral que normalmente es activada por la combinación PIC+9cRA en células madre y epiteliales de tejido prostático. Estos resultados sugieren que la terapia basada en la activación de TLR3 podría no ser una alternativa terapéutica efectiva en el cáncer asociado a arsénico inorgánico.

Palabras clave: TLR3, RAR β , Cáncer de próstata, Ácido retinoico, Poly (I:C), PIC, Arsénico.

Abstract

A therapeutic strategy for prostate cancer (PCa) involves the use of 9-cis-retinoic acid (9cRA) to induce cancer stem cells (CSCs) differentiation and apoptosis. Polyinosinic:polycytidylic acid (PIC) is a Toll-like receptor 3 (TLR3) agonist that induces tumor cells apoptosis after activation. PIC+9cRA combination activates retinoic acid receptor β (RAR β) re-expression, leading to CSC differentiation and growth arrest. Since inorganic arsenic (iAs) targets prostatic stem cells (SCs), we hypothesized that arsenic-transformed SCs (As-CSCs) show an impaired TLR3-associated anti-tumor pathway and, therefore, are unresponsive to PIC activation. We evaluated TLR3-mediated activation of anti-tumor pathway based in RAR β expression, on As-CSC and iAs-transformed epithelial cells (CAsE-PE). As-CSCs and CAsE-PE showed lower TLR3 and RAR β basal expression compared to their respective isogenic controls WPE-Stem and RWPE-1. Also, iAs transformants showed reduced expression of mediators in TLR3 pathway. Importantly, As-CSCs were irresponsive to PIC+9cRA in terms of increased RAR β and decreased SC-markers expression, while CAsE-PE, a heterogeneous cell line having a small SC population, were partially responsive. These observations indicate that iAs can impair TLR3 expression and anti-tumor pathway activated by PIC+9cRA in SCs and prostatic epithelial cells. These findings suggest that TLR3-activation based therapy may be an ineffective therapeutic alternative for iAs-associated PCa.

Keywords

TLR3, RAR β , Prostate cancer, Retinoic acid, Poly (I:C), PIC, Arsenic

ÍNDICE GENERAL:

1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVO GENERAL.....	6
3. MATERIAL Y MÉTODOS	7
3.1 Cultivos celulares.	7
3.1.2 Condiciones de tratamiento con PIC y AR.	7
3.2 Evaluación de la expresión de las proteínas TLR3, DNMT1, DNMT3A y RARβ.	8
3.3 Análisis PCR en tiempo real.....	9
3.4 Análisis de expresión de miR-29c, -148b, -152.	10
3.5 Análisis estadístico.....	11
4. RESULTADOS.....	12
4.1 La expresión de TLR3 disminuye en las células prostáticas transformadas malignamente con arsenito de sodio.	12
4.2 Las células As-CSCs y CAsE-PE mostraron una expresión alterada de miR-29c, -148b, -152, y DNMT1 y DNMT3a.	13
4.2.1. Las células As-CSCs y CAsE-PE también mostraron un aumento de la expresión génica DNMT1, DNMT3A y DNMT3B.	15
4.3 La expresión de RARβ está regulada a la baja en las células CAsE-PE y As-CSC.	17
4.4 Análisis de marcadores de diferenciación	19
5. DISCUSIÓN	21
6.-CONCLUSIÓN.....	25
7. REFERENCIAS.....	26
Anexos	32
1.- Artículos publicados derivados de esta tesis.....	32

“Evaluación de la vía antitumoral asociada a la activación de Toll-like Receptor 3 (TLR-3) y la expresión del receptor del ácido retinoico beta (RAR β) en células madre de próstata transformadas por exposición a arsenito de sodio”

1. INTRODUCCIÓN

Una de las estrategias propuestas como tratamiento concomitante de Cáncer de próstata (CaP) implica la activación de los receptores parecidos a Toll (Toll-like receptors, TLRs). Los TLRs son una familia de proteínas transmembrana que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) y activan la respuesta inmune innata y, posteriormente, la inmunidad adaptativa (Heidarzadeh et al., 2020). Por esta razón, diferentes agonistas de los TLRs se usan actualmente como adyuvantes para terapias contra el cáncer al activar los TLRs respectivos (Adams, 2009; Barton and Medzhitov, 2003).

Específicamente, la actividad antitumoral de TLR3 se logra a través de dos mecanismos independientes. Uno de ellos está relacionado con la activación de células inmunitarias especializadas y el otro implica principalmente la inducción de la apoptosis en las células cancerosas que expresan este receptor (Kawasaki and Kawai, 2014; Premkumar et al., 2010). Este receptor es activado tras la unión con su ligando, el cual corresponde al ARN bicatenario (dsRNA, por sus siglas en inglés) (Estornes et al., 2013). Este receptor se encuentra principalmente en compartimentos endosomales, aunque algunas células como las células dendríticas y epiteliales pueden expresarlo en la superficie celular (Estornes et al., 2013).

El ácido Poliinosínico:policitidílico (PIC) ha sido empleado como una opción terapéutica en el manejo de cáncer metastásico de próstata. Se trata de un compuesto sintético análogo al dsRNA, cuyo tamaño es aproximado a 8 Kb. Debido a las interacciones que ejerce con los receptores, TLR3 induce a las células neoplásicas hacia una vía apoptótica (Bernardo et al., 2013).

Los retinoides, como el retinol, la retina, la tretinoína (ácido transretinoico, ATRA), la alitretinoína (ácido 9-cis-retinoico), la isotretinoína (ácido 13-cis-retinoico) han sido ampliamente investigados para el tratamiento y la prevención del cáncer. Los

retinoides son una de las clases más estudiadas de fármacos quimiopreventivos para el CaP (Connolly et al., 2013). Desempeñan un papel clave en varias funciones vitales como la visión y el desarrollo, pero también ejercen acciones antiproliferativas. Los efectos antiproliferativos de los retinoides se basan en la regulación de muchos procesos biológicos, incluida la diferenciación, la proliferación celular y la apoptosis (Pasquali et al., 2006).

Los retinoides ejercen una variedad de acciones sobre las células cancerosas, a través de la interacción con sus receptores nucleares, los receptores de ácido retinoico (RAR) llamados RAR α , β y γ (Allenby et al., 1993). Los RAR forman complejos con los receptores X retinoicos (RXR) para formar heterodímeros RAR / RXR que se unen a los elementos sensibles al ácido retinoico (RARE) para activar la transcripción de genes (Bernardo et al., 2013).

Entre los tres RAR existentes, RAR β es bien conocido por sus capacidades supresoras de tumores en las células epiteliales, que está mediado por la detención del crecimiento y la inducción de la muerte celular programada (Bushue and Wan, 2010a). Esta último es crítico para la supervivencia de células tumorales debido al hecho de que las células madre cancerosas se sugieren como la fuerza motriz de la formación del tumor en la transformación maligna prostática inducida por iAs (Isayev et al., 2019).

El tratamiento con AR inhibe la expresión de genes de los grupos antes citados, este evento constituye el mecanismo por el cual se consigue la diferenciación de células madre dentro del tumor: disminución de la expresión de marcadores de SC, genes asociados a supervivencia, resistencia a tratamiento y a la formación de tumores (Modarai et al., 2018; Nguyen et al., 2016; Whitworth et al., 2012).

La estrategia que involucra la combinación de AR e inmunoterapia mediante la activación de TLR3 a través de PIC, actualmente representa una estrategia quimioterapéutica para diferentes tipos de cáncer (DeCicco et al., 2001).

Galli y colaboradores, en el año 2013 reportaron una vía alterna que se induce tras la activación de TLR3, en dos líneas celulares de próstata (DU145 y TRAMP-C1)

(Galli et al., 2013b). El mecanismo propuesto involucra que tras la interacción de TLR3 con su agonista PIC, la activación de una cascada de señalización que, adicionalmente a las vías proinflamatorias y proapoptóticas, induce eventos que conducen a la activación de la transcripción de diferentes microARN's (miRNA's), principalmente miR-29c, -148b y -152 que tienen como un posible blanco las ADN-Metil-Transferasas (DNMT). De acuerdo con Galli y colaboradores, la disminución en la traducción de DNMT1, DNMT3A y DNMT3B da lugar a su vez a la disminución en la metilación de sus genes blanco, incluyendo al promotor de RAR β . Por lo anterior, se puede esperar que una vez libre el promotor, la expresión relativa de RAR β tanto a nivel de ARN mensajero (mARN) como de proteína ser verá incrementada (Galli et al., 2013b).

Por otro lado, en diferentes tipos de tumores, la expresión del gen RAR β frecuentemente se observa silenciado por la metilación del promotor y la activación de los mecanismos que inducen la compactación de la cromatina al inicio de la carcinogénesis (González-Reyes et al., 2011). Por esta razón, la inducción de la re-expresión del gen RAR β se está utilizando ahora como una estrategia para el tratamiento del cáncer.

Experimentos *in vitro* han demostrado que iAs impulsa la sobreacumulación de células madre (SC) y células madre de cáncer (CSC) en células epiteliales de próstata (RWPE-1), mostrando mayor resistencia a los efectos tóxicos del propio iAs y conduciendo a la transformación maligna de las células epiteliales a las 30 semanas de exposición (Benbrahim-Tallaa and Waalkes, 2008a).

Tokar y colaboradores., demostraron en 2010 que las células madre derivadas de las RWPE-1 (WPE-Stem) tienen resistencia innata a la letalidad inducida por iAs y a la apoptosis, ya que muestran una menor expresión de los factores antiapoptóticos bcl-2 y Metalotioneina, en contraste con los factores antiapoptóticos (BAX, caspasas 3, 8, 7 y 9) (Tokar et al., 2010a). Estas células también muestran mayor expresión de genes relacionados con el estrés (como SOD1 y PRODH) en comparación con las células RWPE-1 (las células epiteliales parentales normales que contienen tres tipos de células madre, intermedias y diferenciadas) (Tokar et al., 2010c).

La vía de señalización deducida a partir de la información de Galli y colaboradores. 2013, en la que TLR3 induce la expresión de RAR β , esto mediante una vía alterna en que la expresión de miRNAs alteran la expresión de DNMTs, que a su vez pueden tener como un posible blanco la región promotora de RAR β . Por lo que la administración conjunta de ambos tratamientos puede tener una sinergia que mejore los efectos de ambos tratamientos, en comparación con su administración individual.

Escudero-Lourdes y Tokar, tras diferentes análisis preliminares, encontraron que la expresión de TLR3 es significativamente menor cantidad en las células madre de próstata WPE-stem en comparación con las células prostáticas diferenciadas RWPE-1; pero más importante aún, después de la transformación con arsenito de sodio, las células madre cancerosas (iAs-CSC) prácticamente no expresaron TLR3 o lo hacen mínimamente. Algo similar fue observado en las células diferenciadas y malignamente transformadas con arsenito de sodio (células CASPE), las cuales, se encontró que expresan significativamente menos TLR3, tanto a nivel de mRNA como de la proteína en comparación con las células RWPE-1. Adicionalmente, ambas células transformadas con iAs mostraron una significativamente menor expresión de los miR-29b, -29c, -148b y 152 que hacen blanco en las DNMTs, lo cual fue consistente con una expresión también significativamente incrementada de DNMT3A y b (datos no publicados).

La observación de que las células madre prostáticas, WPE-Stem, expresen una significativamente menor cantidad de TLR3 pudiera ser clínicamente relevante en la terapia antitumoral del CaP, ya que sugiere que en el grupo de pacientes con CaP asociado a iAs, una de las razones por las que los tumores pudieran ser menos sensibles a la terapia combinada de PIC+AR, es el hecho de que tanto las células epiteliales, pero más importantemente, las CSCs prostáticas, expresan niveles más bajos de TLR3 en comparación con células no transformadas.

Por otro lado, tanto las células completas como las SC que fueron transformadas malignamente por iAs, debido a que expresan significativamente menor cantidad de TLR3, pudieran ser menos, o incluso, no responsivas (en el caso de las As-CSC) a

esta terapia combinada de PIC y AR. Todo esto, aunado al hecho de que iAs induce la selección de SC durante la transformación maligna, podría contribuir al desarrollo de un tumor canceroso que no responde a la quimioterapia convencional, ni a la inmunoterapia basada en la activación de TLR3 a través del uso de la combinación de PIC y AR.

Estas observaciones podrían implicar que individuos que sufren de cáncer de próstata relacionado con la exposición a iAs, pudieran presentar una desventaja en la aplicación de una terapia basada en la combinación PIC+ AR, en comparación con individuos con cáncer no relacionado a la exposición a iAs.

Para analizar esta hipótesis, en este trabajo, como modelo de estudio *in vitro*, se emplearon las siguientes líneas celulares: 1) células epiteliales prostáticas inmortalizadas (RWPE-1), 2) células RWPE-1 malignamente transformadas por iAs (CAsE-PE); 3) células madre aisladas a partir de cultivos de RWPE-1 (WPE-Stem) y 4) células WPE-Stem transformadas por exposición a iAs (As-CSC). Todas las líneas anteriores fueron expuestas *in vitro* a PIC y AR (individualmente o en combinación) para evaluar la ruta antitumoral descrita por Galli y colaboradores, mediada por la activación de TLR3 y la inducción de la expresión de RAR β .

2. OBJETIVO GENERAL.

Evaluar las modificaciones en la vía antitumoral mediada por TLR3 a través de la exposición a PIC, AR y su combinación en células prostáticas epiteliales y madre transformadas con iAs (As-CSC y CAsPE).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos planteados, se emplearon cultivos *in vitro* de las cuatro diferentes líneas celulares mencionadas. Cada estudio fue realizado en triplicados biológicos de cada línea celular, para cada condición de tratamiento y de cultivos control no tratados.

3.1 Cultivos celulares.

Se utilizaron cuatro líneas celulares de epitelio prostático: células prostáticas diferenciadas (RWPE-1), células madre aisladas a partir de cultivos de RWPE-1 (WPE-Stem), células diferenciadas transformadas hacia el fenotipo maligno por exposición crónica (30 semanas) a 5uM de arsenito de sodio (CAsPE), y células madre con fenotipo maligno, transformadas por exposición durante 18 semanas a 5 uM de arsenito de sodio(As-CSC). Todas estas líneas celulares proceden del Instituto Nacional de Ciencias en Salud Ambiental (National Institute of Environmental Health Sciences, NIEHS), localizado en el Triangle Park, Durham, North Carolina, USA.

Las células se cultivaron en medio KSFM (GIBCO) suplementado con extracto de pituitaria bovina (EPB) (50 µg/mL) y factor de crecimiento epidérmico (FCE) (50 ng/mL) sin antibiótico, se incubaron a 37 ° C en una atmósfera humidificada que contenía 5% de dióxido de carbono. Sólo en el caso de las células WPE-Stem y As-CSC, se utilizaron frascos de cultivo recubiertos con una matriz compuesta por colágeno IV (25 µg/mL) (TREVIGEN) y fibronectina (25 µg/mL) (BD BIOCIENCES).

3.1.2 Condiciones de tratamiento con PIC y AR.

Todas las líneas celulares fueron cultivadas en cajas T-25 hasta alcanzar una confluencia de 90%. Por triplicado, las diferentes líneas celulares fueron expuestas a PIC (25 µg/mL); con AR (10 µM); o la combinación de PIC + AR. Para exponer las células, su respectivo tratamiento se preparó una solución que contiene los PIC, AR o su combinación (en la concentración antes mencionada) y medio KSFM, posteriormente se adicionaron 5mL de esta solución a cada caja de cultivo. Como control se utilizaron triplicados de cada una de las líneas sin exponer a ningún tratamiento (NT). La exposición a los diferentes tratamientos se realizó incubando

las células con su respectivo tratamiento a 37°C en cámara humidificada con 5% de CO₂. La exposición a tratamientos se realizó durante 6 horas para extracción de ARN total y de 24 horas para la extracción de proteínas.

3.2 Evaluación de la expresión de las proteínas TLR3, DNMT1, DNMT3A y RAR β .

Para realizar el aislamiento de las proteínas totales, se partió de cultivos celulares de las cuatro líneas celulares en su condición y también expuestas a tratamientos, a 90% de confluencia. Se retiró el medio de cultivo de cada una de las condiciones probadas y las células se lisaron con solución RIPA que fue adicionado a la monocapa celular (500 μ L) y PMSF (1mM) en frío, luego cada muestra se sonicó con pulsos de 5 segundos, en 10 ocasiones en hielo. Posteriormente la concentración total de las proteínas extraídas se determinó utilizando el ensayo de Bradford. La concentración de proteína de cada muestra se ajustó a 1 μ g/ μ L. Las muestras de proteína fueron utilizadas para determinar la expresión de TLR3 y RAR β en cada línea celular, mediante el ensayo de Western Blot (WB) que abajo se describe.

Para la separación de las proteínas celulares, se prepararon geles de acrilamida al 10%: Las muestras fueron colocadas en los pozos del gel y sometida a electroforesis a 180 V y 300 mAmps por una hora. Luego, se realizó una transferencia húmeda de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μ m) a 100 V y 300 mAmps durante 1 h.

Las membranas fueron colocadas en recipientes donde se adicionaron 15mL de solución de bloqueo que contiene leche descremada al 5% en TB 1x durante 1 hora en agitación constante. Después las membranas fueron incubadas a 4°C durante toda la noche con el anticuerpo primario anti-TLR3 (1:2000), anti-RAR β (1:2000) o β -actina (1:2000) (Abcam, Cambridge, CB2 0AX, Reino Unido). Después, las membranas se incubaron con anticuerpo secundario marcado con HRP durante 2 horas en agitación moderada. Las bandas correspondientes a las proteínas de interés se visualizaron incubando las membranas con el sustrato de HRP quimioluminiscente (Luminol®) seguido de la exposición a una película fotográfica

en cuarto oscuro. Como control para normalizar carga se empleó β -Actina. El análisis de densitometría de las bandas se realizó utilizando el software ImageJ.

3.3 Análisis PCR en tiempo real

Las muestras procedieron de cultivos de las 4 líneas celulares, a una confluencia de 90%; tanto las no tratadas como las expuestas a los tratamientos, fueron recuperadas con Tripsina al 0.025M. Un triplicado de cada línea celular se destinó a dos extracciones para obtener ARN mensajero y ARN enriquecido de microARN's. El botón celular obtenido por centrifugación posterior al tratamiento con tripsina fue tratado con reactivo TRIzol® (300 μ L por 1×10^6 células), para la extracción de ARN total.

La reacción de transcripción reversa se empleó para obtener muestras de ADN complementario (cADN) a partir del ARN de cadena simple obtenido en los procesos de extracción. A partir de cada línea celular y condición probada, se realizó una reacción de retrotranscripción (RT) para preparar el ADN complementario (ADNc) a partir del ARN total. La mezcla de PCR en tiempo real contenía 1 μ g de ARN, 0,2 μ L de cebadores aleatorios (2,5 μ g/ μ L), 0,8 μ L de agua DEPC, 1 μ L de dNTP (10 mM), 4 μ L de tampón 5X RT, 2 μ L de DTT, 1 μ L de RNase OUT y 1 μ L de SuperScript II, Volumen final 20 μ L. Las reacciones RT se realizaron utilizando los siguientes parámetros: 25°C durante 10 min, 42°C por 50 min y 72°C por 15 min. Se realizó PCR en tiempo real en el termociclador ABI 7500 (Applied Biosystems) utilizando 100ng de ADNc para analizar la expresión de CD44, CD133, DNMT1 y DNMT3A. Cada reacción de PCR se realizó en un total de 10 μ L. La reacción consistió en 3 μ L de agua, 5 μ L de solución Sybr Green Master Mix, 0,5 μ L de cada cebador (Forward y Reverse) y 1 μ L de ADNc. Las secuencias de cebadores se muestran en el cuadro 1. El gen de referencia utilizado fue el ARNr 18s. El protocolo de termociclado estándar consistía en 95 ° C durante 10 min, 95 ° C durante 2 min, 40 ° C durante 15 s y 72 ° C durante 1 min, durante 40 ciclos. El análisis de expresión se realizó en el programa High-Resolution Melt (HRM) Software v2.0 (Applied Biosystems). Los cambios en la expresión relativa (a 18s rARN) se calcularon utilizando el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Cuadro 1. Secuencias de oligonucleótidos usados en la PCR.

Cebador	Secuencias
18s	FW 5'-TCGGTCTTATTTTGCTGGTTT-3'
	RV 5'-ATCGCTAGTTGGCATGGTTT-3'
CD44	FW 5'-GAATGTAACCTCCGCTACG-3'
	RV 5'-GAGAGAGAGCCAGGAGACCA-3'
CD133	FW 5'-AATTCTAATACGACTCACTATAGGGAA-3'
	RV 5'-GAACAGGGATGATGTTGGGTCTCA-3'
DNMT1	FW 5'-ACCGCTTCTACTTCCTCGAGGCCTA-3'
	RV 5'-GTTGCAGTCCTCTGTGAACACTGTGG-3'
DNMT3A	FW 5'-GCCGAATTGTGTCTTGGTGGATGACA-3'
	RV 5'-CCTGGTGGGAATGCACTGCAGAAGGA-3'
TLR3	FW 5'-CAGTACATCGAGTTCTTGGTTTCAA-3'
	RV 5'-GAGAAATGTTCCCAGACCCAATC-3'
RAR β	FW 5'-AAGTGAGTTGTTTAGAGGTAGGAGGG-3'
	RV 5'-TAATTACCTAATCCAAATAATCATTACC-3'

3.4 Análisis de expresión de miR-29c, -148b, -152.

El aislamiento y purificación de miRNAs proveniente de las células en suspensión, se llevó a cabo utilizando el sistema comercial de columnas de afinidad miRNeasy de QIAGEN, siguiendo el protocolo descrito por el proveedor. La reacción de retrotranscripción se preparó de acuerdo con las instrucciones provistas por el proveedor del sistema comercial miScript® II Kit de QIAGEN. Posteriormente a la adición de la muestra y su homogenización, la preparación fue mantenida en hielo y se llevó al termociclador, la programación para la RT fue de : 60 minutos a 37°C; 5 minutos a 95°C; se homogenizó gentilmente y se pasó a hielo. Posterior a ello, se

tomaron 5 µL de la solución final y se diluyeron 1:10 para su posterior empleo en PCR en tiempo real (el resto se resguardó a -20°C).

Las secuencias de cebadores empleados para aparearse específicamente y amplificar los miRNAs de interés por PCR tiempo real, se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Secuencias de oligonucleótidos para miRNAs

Cebadores	Secuencia
hsa-miR-29b-3p	5'-UAGCACCAUUUGAAAUCAGUGUU
hsa-miR-29b-1-5p	5'-GCUGGUUUCAUAUGGUGGUUUAGA
hsa-miR-29c-3p	5'-UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA
hsa-miR-29c-5p	5'-UGACCGAUUUCUCCUGGUGUUC
hsa-miR-148b-3p	5'-UCAGUGCAUCACAGAACUUUGU
hsa-miR-148b-5p	5'-AAGUUCUGUUAUACACUCAGGC
hsa-miR-152-3p	5'-UCAGUGCAUGACAGAACUUGG
hsa-miR-152-5p	5'-AGGUUCUGUGAUACACUCCGACU
RNU6	5'-CGCAAGGATGACACGCAAAT

Cada reacción se preparó añadiendo 5 µL de QuantiTech Sybr Green, 1 µL de miScript Universal Primer, 1 µL de miRNA primer (10 µM), 2µL de agua y 1 µL de cADN. El programa del termociclador consistió en 95 ° C durante 15 minutos, posteriormente 40 ciclos de 94 ° C durante 5 s, 55 ° C por 30 s, 70 ° C por 30 s. Como control interno de la expresión, se incluyó el gen RNU6. Se utilizó un ABI 7500 con el programa HRM Software v2.0.

3.5 Análisis estadístico.

Todos los datos se presentan como media ± desviación estándar de tres replicas técnicas y biológicas. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando una prueba de t-Student para el análisis de dos grupos y de ANOVA de una vía con un test post-hoc de Tukey para en análisis de tres o más grupos. Un valor de $p \leq 0,05$ se consideró significativo.

4. RESULTADOS

4.1 La expresión de TLR3 disminuye en las células prostáticas transformadas malignamente con arsenito de sodio.

Para determinar la expresión relativa de TLR3, se realizó un análisis por WB en las células diferenciadas de epitelio prostático (RWPE-1), células RWPE-1 transformadas por iAs (CAsPE), en las células madre de epitelio prostático (WPE-Stem) y células WPE-Stem transformadas por iAs (As-CSC). Dichas líneas celulares fueron expuestas durante 48 horas a PIC, AR solos o en combinación (PIC+AR).

La expresión relativa de TLR3 en células RWPE-1 y CAsE-PE que no fueron tratadas, fueron tomadas como la expresión basal de la proteína. Los resultados mostraron que en las células CAsE-PE la expresión relativa basal de TLR3 es significativamente menor con respecto a las células RWPE-1, no transformadas malignamente (Figura 1). Lo mismo se observó en células As-CSC, en las que la expresión relativa basal TLR3 fue significativamente menor que la observada en

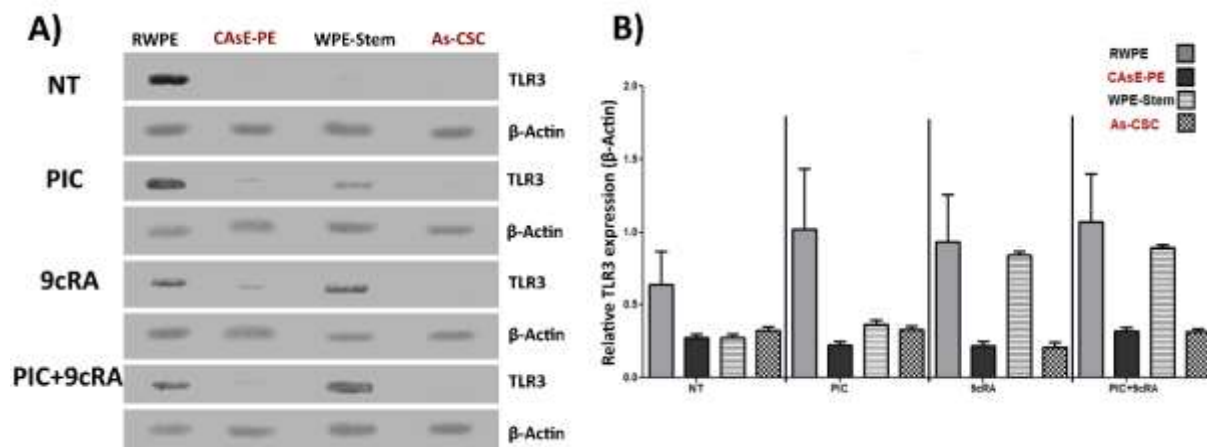


Figura 1. Expresión relativa de TLR3 en RWPE-1, CAsE-PE, WPE-Stem y As-CSC y post-exposición a tratamientos. Se trataron células RWPE-1, CAsE-PE, WP-Stem y As-CSC con 25 μ g / mL de PIC durante 24 horas, con 10 μ M de 9cRA o su combinación PIC + 9cRA. La expresión se determinó mediante análisis de WB. Se representaron tablas representativas de RWPE y CAsE-PE en su condición sin tratar (NT), condición con PIC, condición con 9cRA y su combinación. A) Bandas de proteína TLR3 analizadas por WB B) Análisis densitométrico de la expresión relativa de TLR3, con respecto a β -Actina. $n=3$, * $-p \leq 0.05$ en comparación con su control.

WPE-Stem. Otra observación importante es que WPE-Stem mostró una expresión significativamente menor de TLR3 con respecto a las células diferenciadas RWPE-1 (Figura 1). Por otro lado, después de ser tratados con PIC, solo RWPE-1 y WPE-Stem mostraron un aumento significativo en la expresión de TLR3, en contraste con las células transformadas CAsE-PE y As-CSC. Del mismo modo, la exposición a 9cRA no mostró un aumento en la expresión relativa de TLR3 en células CAsE-PE y As-CSC con respecto a estas mismas células sin tratamiento, así como con respecto a sus controles RWPE-1 y WPE-Stem, que mostraron una tendencia a aumentar la expresión TLR3 (Figura 1B). En CAsE-PE y As-CSC expuestos a PIC+9cRA, la expresión relativa de TLR3 se observa reducida en comparación con RWPE-1 y WPE-Stem respectivamente (Figura 1A y 1B).

4.2 Las células As-CSCs y CAsE-PE mostraron una expresión alterada de miR-29c, -148b, -152, y DNMT1 y DNMT3a.

La observación de que la expresión de TLR3 está disminuida en CAsE-PE y As-CSC, así como la incapacidad de PIC solo o en combinación con 9cRA para aumentar su expresión, sugiere una alteración en la vía antitumoral inducida por TLR3 descrita por Galli y colaboradores (2014) en las células de nuestro estudio, posterior a la unión de PIC con TLR3. Para evaluar esta posibilidad, se analizó la expresión basal (sin tratamiento) de miR-29c, 148b, -152, en RWPE-1, WPE-Stem, CAsE-PE y As-CSC. También se evaluó su expresión posterior a haber sido expuestos a PIC, 9cRA o su combinación. Los resultados mostraron que la expresión relativa basal de miR-29c, -148b y -152 fue significativamente menor en las células CAsE-PE y As-CSC en comparación con sus células control RWPE-1 y WPE-Stem (Figura 2A). A diferencia de las células RWPE-1, las células CAsE-PE expuestas a PIC no cambiaron la expresión relativa de miR-29c, que se dirige a DNMT3A. Se encontraron resultados similares en células AS-CSC expuestas a la expresión PIC (Figura 2B). La expresión de los miR-148b y miR-152 (que se tienen como uno de sus blancos posibles al mensajero DNMT1 y DNMT3A respectivamente) no mostraron cambio después de que CAsE-PE o As-CSC fueron expuestos a PIC. En este análisis, la exposición a PIC no mostró efecto sobre las células WPE-Stem con respecto a la expresión de miR148b, tanto en comparación

con su expresión basal y también en comparación con RWPE-1 (Figura 2A y 2B). La exposición a 9cRA sola, indujo una disminución en la expresión de miR-29c y miR-148b en WPE-Stem en comparación con las condiciones basales, así mismo

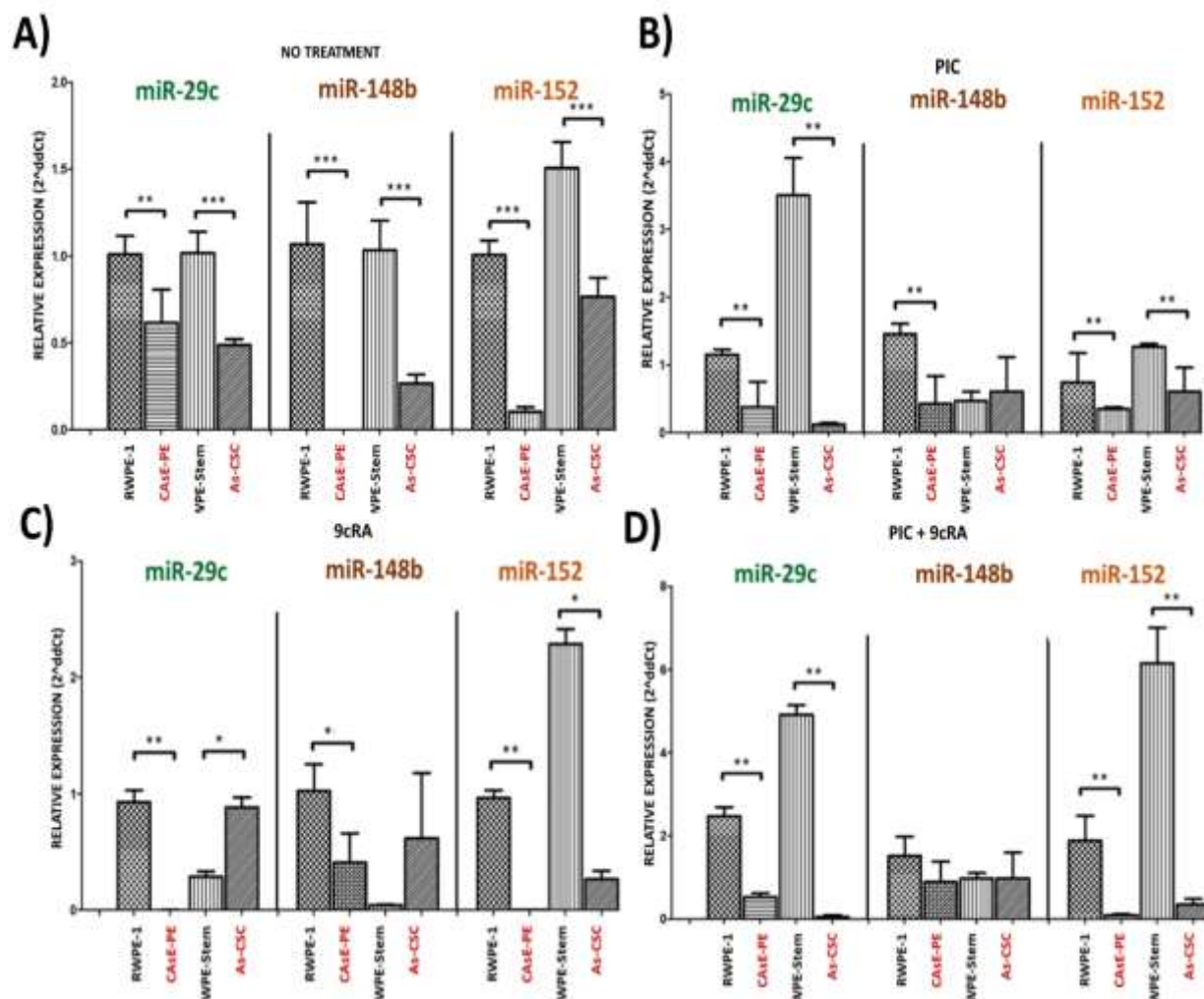


Figura 2. Expresión relativa de miR-29c, -148b, -152 en células RWPE-1, CAsE-PE, WPE-Stem y As-CSC. A) Expresión de DNMT1 y DNMT3A sin tratamiento, en B) expuestos a PIC (25µg / mL), en C) expuestos a 9cRA (10µM), y en D) con PIC + 9cRA. Los resultados se determinaron mediante análisis de expresión con $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por triplicado y con respecto al gen de la β -actina. Datos con n-3, * - $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.025$ en comparación con su control.

este tratamiento no cambió la expresión de ninguno de los miRNAs analizados en RWPE-1, CAsE-PE o As-CSC en comparación con las condiciones basales (Figura 2C). Cuando las células CAsE-PE y As-CSC fueron expuestas a PIC+9cRA, la expresión de miR-29c, -148b y -152 no cambiaron en comparación con sus

respectivas células control en donde se observó un incremento significativo. Por el contrario, la expresión de miR-29c y -152 se redujo con respecto a sus células control. Aunado a ello miR-148b, no mostró modificación en todas las líneas celulares con respecto a su condición basal después de la exposición a PIC o 9cRA (Figura 2D).

De acuerdo con la secuencia propuesta, la disminución de la expresión de TLR3 observada en las células CAsE-PE y As-CSC tiene un impacto directo en la capacidad de PIC para activar la vía antitumoral. Esto fue corroborado por una disminución observada de la expresión de miR-29c, -148b y -152 en estas células transformadas con iAs, en comparación con RWPE-1 y WPE-Stem, respectivamente, incluso cuando se expone a PIC+9cRA.

4.2.1. Las células As-CSCs y CAsE-PE también mostraron un aumento de la expresión génica DNMT1, DNMT3A y DNMT3B.

Los resultados descritos en las secciones anteriores indicaron que CAsE-PE y As-CSC, muestran una disminución de la expresión basal de TLR3, así como una disminución de la expresión de miR-29c, -148b y -152, que parece no modificarse después de la exposición a PIC, 9cRA o su combinación.

Con base en la vía antitumoral descrita por Galli y colaboradores, el siguiente paso a analizar fue la expresión de DNMTs, tanto basal como después de la exposición a PIC, 9cRA y la combinación. El análisis de CAsE-PE y As-CSC exhibió un aumento de la expresión basal de DNMT1 y DNMT3A con respecto a las células madre RWPE-1 y WPE- no transformadas (Figura 3A), lo que podría implicar que, incluso antes de exponer a los tratamientos, la vía antitumoral descrita por Galli y colaboradores ya muestra un deterioro importante en la expresión de las moléculas intermediarias relacionadas. Cuando todas las líneas celulares fueron expuestas a PIC, la expresión de DNMT1 y DNMT3A disminuyó significativamente en las células CAsE-PE en comparación con sus niveles basales. Sin embargo, dicha disminución de la expresión no fue suficiente para alcanzar los bajos niveles de expresión basal

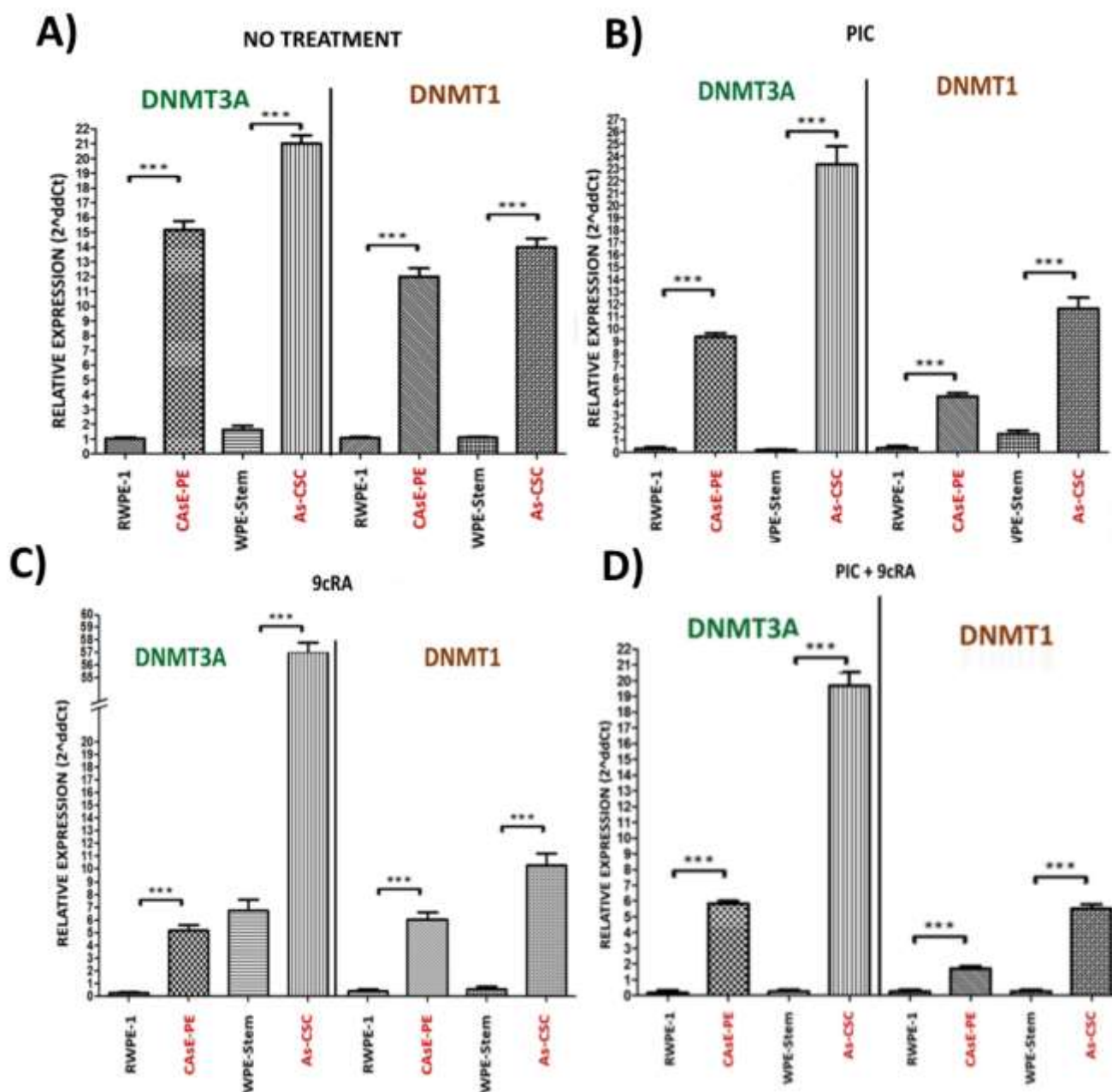


Figura 3. Expresión relativa de DNMT1 y DNMT3A en células RWPE-1, CAse-PE, WPE-Stem y As-CSC. A) Expresión de DNMT1 y DNMT3A sin tratamiento, en B) expuestos a PIC (25µg / mL), en C) expuestos a 9cRA (10µM), y en D) con PIC + 9cRA. Los resultados se determinaron mediante análisis de expresión con $2^{-\Delta\Delta Ct}$ por triplicado y con respecto al gen de la β -actina. Datos con $n=3$, * $-p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.025$ en comparación con su control.

de DNMT1 y DNMT3A observados en RWPE-1. Para las células As-CSC, el tratamiento con PIC no mostró ningún cambio en ninguno de los DNMT analizados,

esto en comparación con el nivel basal que se encontraba ya de por sí incrementado y a las células WPE-Stem (Figura 3B). Estas modificaciones inducidas por PIC en la expresión de DNMTs observadas en CAsE-PE, (que se compone principalmente de células diferenciadas y una proporción de células madre), pero no en As-CSCs con respecto a las condiciones basales, sugieren que el fenotipo de célula madre juega un papel clave en la capacidad tumoral para responder a este tratamiento.

La exposición a 9cRA también condujo a una disminución de la expresión de DNMT1 y DNMT3A con respecto a su condición basal en todas las líneas celulares, pese a ello, en las células CAsE-PE la disminución en la expresión de DNMT no es tan baja como lo observado en RWPE-1 (Figura 3C). Y para As-CSCs, la expresión de DNMT1 y DNMT3A no cambió después de la exposición a 9cRA en comparación con su condición basal y con WPE-Stem (Figura 3C).

Cuando se expusieron a PIC+9cRA, las células CAsE-PE y As-CSC, mostraron un aumento de la expresión de DNMT1 y DNMT3A con respecto a RWPE-1 y WPE-Stem correspondientemente, sin embargo, también se observó una tendencia a disminuir en comparación con su condición no tratada, pero aun así, no alcanzaron los niveles basales mostrados por sus controles correspondientes. (Figura 3D).

4.3 La expresión de RAR β está regulada a la baja en las células CAsE-PE y As-CSC.

El promotor del gen RAR β se encuentra comúnmente metilado en el cáncer a través de la acción de los DNMTs (Yaqinuddin et al., 2009) lo que lleva a una disminución en la transcripción del gen RAR β y en consecuencia, en la proteína. Entonces, un aumento de la expresión de DNMTs puede a su vez tener un impacto negativo en la expresión de RAR β y en la respuesta al tratamiento con 9cRA, especialmente en la expresión de genes regulados por RAR β .

Se realizaron análisis de RT-PCR, WB y densitometría para proteínas totales para evaluar la expresión de RAR β en todas las líneas celulares, tanto basales como después de la exposición a PIC, 9cRA y la combinación. En condiciones basales, las células CAsE-PE exhibieron una expresión significativamente menor de RAR β

en comparación con RWPE-1 en las mismas condiciones. Es por ello que, cuando estas células fueron expuestas a PIC, 9cRA, y su combinación, no se observó un aumento significativo en la expresión de RAR β con respecto a RWPE-1 y también con respecto a su propia condición basal (de CAsE-PE) (Figura 4). En cuanto a As-CSC, la expresión relativa basal de RAR β no mostró ninguna diferencia con respecto a la observada en WPE-Stem. Por el contrario, cuando ambas líneas

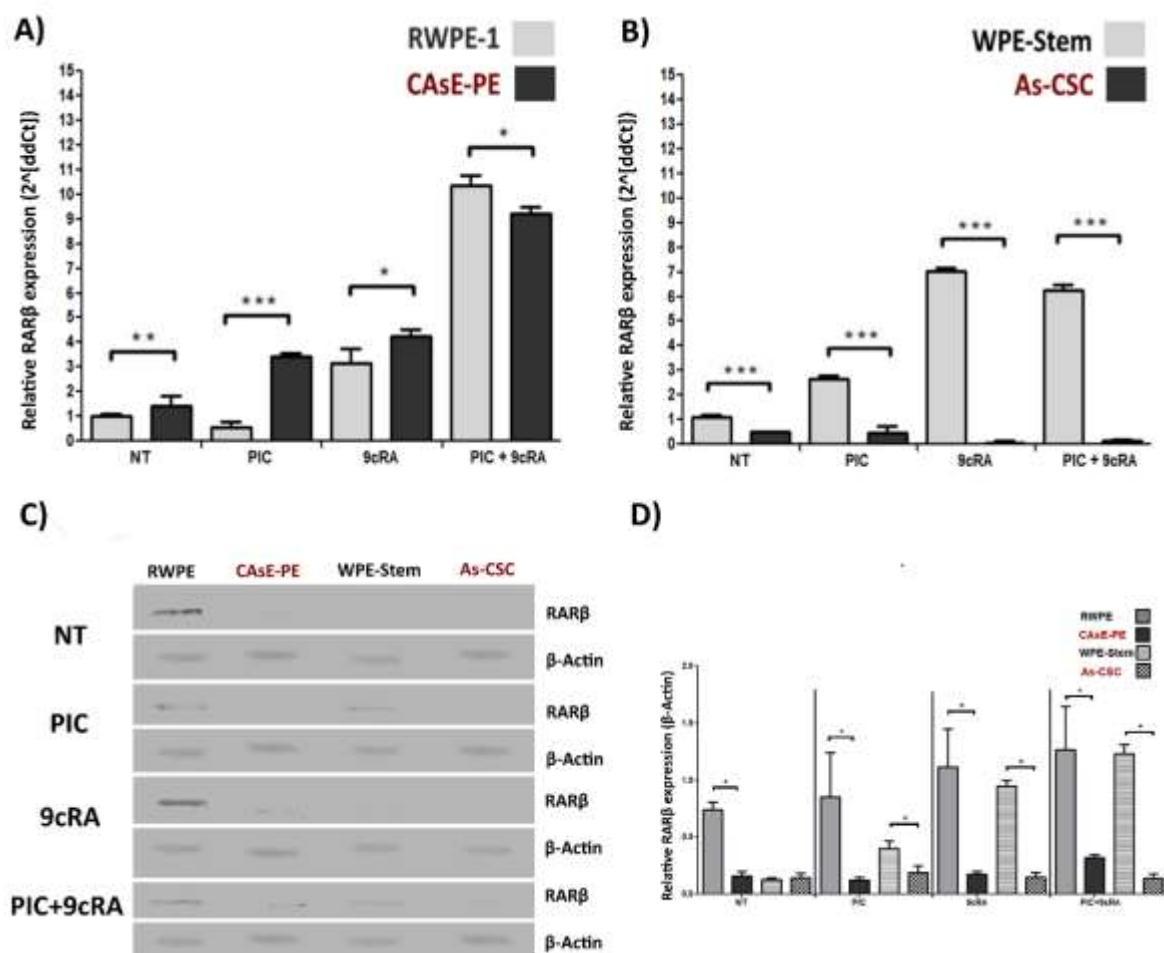


Figura 4. Expresión basal relativa de RAR β en RWPE-1, CAsE-PE, WPE-Stem y As-CSC y post-exposición a tratamientos. Se trataron células RWPE-1, CAsE-PE, WP-Stem y As-CSC con 25 g / mL de PIC durante 24 horas, con 10 μ M de 9cRA o su combinación PIC + 9cRA. La expresión se determinó mediante análisis de WB. Se representaron tablas representativas de RWPE y CAsE-PE en su condición sin tratar (NT), condición con PIC, condición con 9cRA y su combinación. A) Expresión relativa de ARNm de RAR β en RWPE-1 y CAsE-PE B) Expresión relativa de ARNm de RAR β en WPE-Stem y As-CSC C) Bandas de proteína RAR β analizadas por WB D) Análisis densitométrico de la expresión relativa de TLR3, con respecto a β - Actina. n-3, * -p $\leq$ 0.05 en comparación con su control.

fueron expuestas a tratamientos (PIC, 9cRA y su combinación), As-CSC no modificó la expresión relativa de RAR β , en comparación con WPE-Stem células que mostraron un ligero pero significativo incremento en la expresión de RAR β (Figura 4). Estas observaciones son consistentes con el aumento reportado previamente en células DU-145 respecto a la expresión de DNMTs, lo que sugiere un papel crítico de la metilación en el silenciamiento del gen RAR β (Galli et al., 2013b).

4.4 Análisis de marcadores de diferenciación

Debido a la alteración en la vía antitumoral mediada por la activación de TLR3 observada en experimentos anteriores, se realizó un análisis de la expresión de los marcadores SC para determinar la capacidad de PIC, 9cRA o la combinación para inducir un cambio en la expresión de los marcadores SC en células transformadas por iAs. Analizamos la expresión relativa de genes asociados a SC como CD44, CD133 y SOX2 en condiciones basales y después de la exposición a PIC, 9cRA y PIC+9cRA. A nivel basal, la expresión de estos genes en CAsE-PE se observa incrementado significativamente con respecto a RWPE-1; Las células As-CSC también mostraron aumento significativo en la expresión de CD44, CD133 y SOX2 con respecto a WPE-Stem (Figura 5A).

Cuando las células CAsE-PE fueron expuestas a PIC+9cRA, la expresión relativa de CD44 se redujo a niveles similares a los observados en RWPE-1. As-CSC expuesto a PIC+9cRA mostró una disminución de la expresión de CD44 en comparación con su expresión basal, pero su expresión se observó incrementada con respecto a WPE-Stem (Figura 5B). Estos resultados fueron consistentes con los análisis anteriores, donde las células transformadas con iAs, mostraron una menor expresión basal de TLR3 en contraste con las células no cancerosas, que se asoció con alteración de la expresión de miRNAs, DNMT1 y DNMT3A. El estado de estas últimas proteínas también se correlacionó con la expresión de la proteína RAR β y esto a su vez con la expresión de los marcadores de SC.

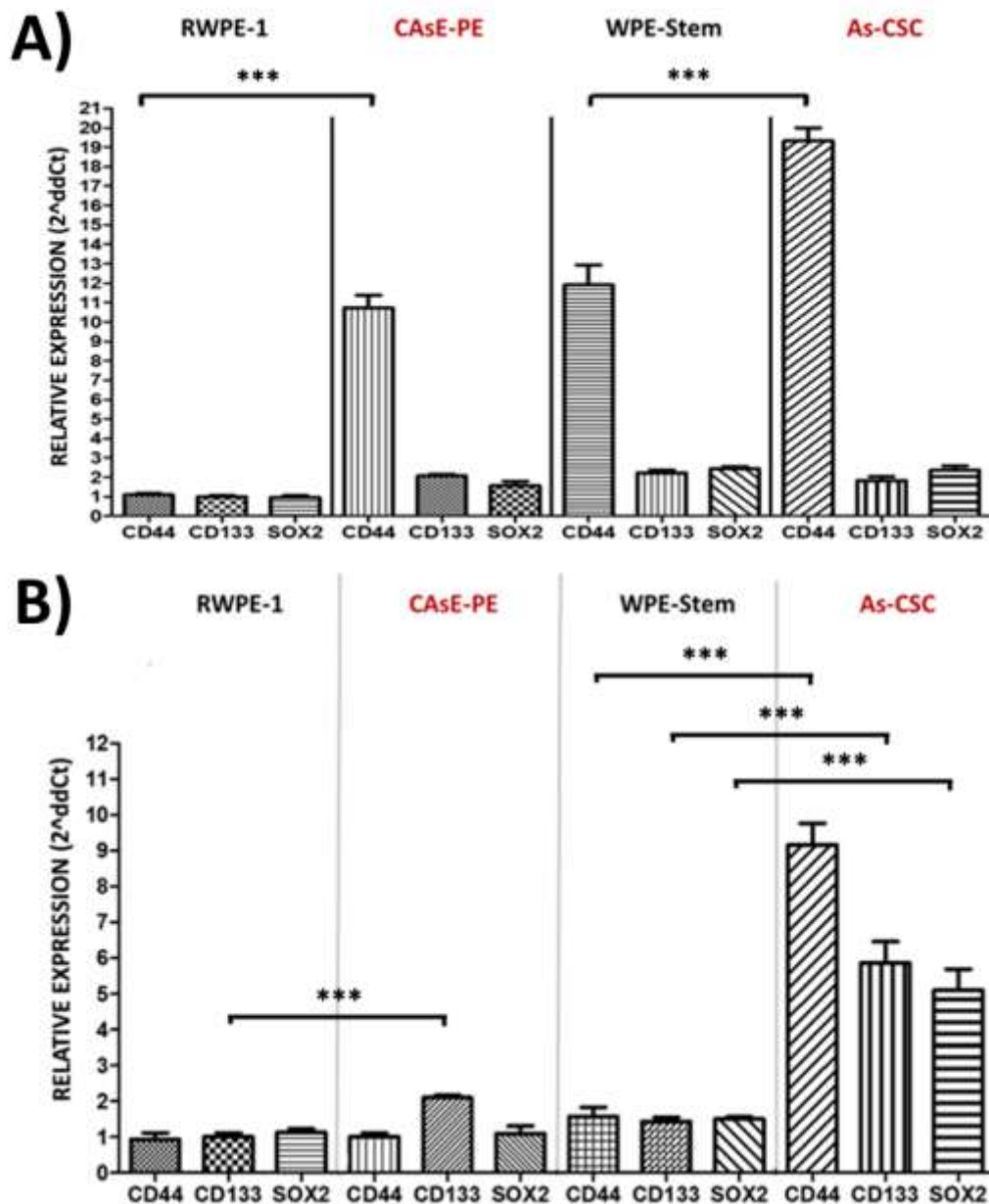


Figura 5. Expresión relativa de CD44, CD133 y SOX2 en RWPE-1, CAsE-PE, WPE-Stem y As-CSC con respecto a la β -actina. Se trataron células RWPE-1, CAsE-PE, WPE-Stem y As-CSC con 25 g / mL de PIC durante 6 horas, con 10 μ M de 9cRA o su combinación PIC + 9cRA. La expresión se determinó mediante análisis de expresión con $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se representaron tablas representativas de RWPE-1, CAsE-PE, WPE-Stem y As-CSC en su condición sin tratar (NT), condición con PIC, condición con 9cRA y su combinación. n-3, * - $p \leq 0.05$, ** $p \leq 0.025$ en comparación con su control.

5. DISCUSIÓN

El ácido retinoico (AR) y otros retinoides han sido empleados como estrategia terapéutica en el caso de CaP en estados avanzados (Pasquali et al., 2006). Sin embargo, RAR β que es un intermediario clave en la vía antitumoral de la combinación PIC+9cRA (Bernardo et al., 2013), se ha encontrado silenciado en casos de CaP, lo cual podría estar ocurriendo como parte del proceso de transformación tumoral (Belinsky, 2005; Swisshelm et al., 1994; Xu, 2007). Las poblaciones celulares objetivo de la terapia basada en AR son las SCs y CSCs, dado que están implicadas en la recidiva del tumor; por lo tanto, se requieren de estrategias que favorezcan la reexpresión de RAR β (Park et al., 2019). Una aproximación propuesta en el tratamiento de CaP resistente a la castración, es el uso de PIC (agonista de TLR3), en conjunto con retinoides tal como 9cRA, ambos en concomitancia con la terapia convencional (Le Naour et al., 2020; Podrazil et al., 2015). Esta estrategia está basada en reportes que muestran que la activación de TLR3 por PIC hace sinergia con 9cRA activando diferentes vías que inducen la reexpresión de RAR β en líneas celulares de cáncer de próstata y mama (Galli et al., 2013a). De forma relevante, 9cRA indirectamente aumenta la expresión de TLR3 por controlar expresión y actividad de factores de transcripción (Bernardo et al., 2013; Kolla et al., 1996). Críticamente iAs induce sobreacumulación de SC y CSC *in vitro* e *in vivo*, sugiriendo que estas juegan un papel crítico en el desarrollo de cáncer asociado a la exposición a iAs (Benbrahim-Tallaa and Waalkes, 2008b; Tokar et al., 2010b).

Tokar y colaboradores en 2010 demostraron que la exposición continua de células WPE-Stem a arsenito de sodio 5 μ M durante 18 semanas provocó una rápida adquisición del fenotipo de las CSC en comparación con las células RWPE-1, que se transforman después de 30 semanas de exposición. Las WPE-Stem transformadas (As-CSC) son altamente invasivas y proliferativas, secretan grandes cantidades de metaloproteinasa-9 y forman tumores agresivos cuando se heterotrasplantan en ratones. Estas células también re-expresan genes relacionados con la autorrenovación (p63, ABCG2, BMI-1, SHH, OCT-4, NOTCH-1) mientras que la expresión del supresor de tumores PTEN se redujo (Tokar et al., 2010b).

Tales observaciones despertaron nuestro interés en evaluar la expresión de TLR3, así como el estado de los intermediarios de la vía antitumoral asociada a este, la cual lleva a la reexpresión de RAR β y la diferenciación de SC en líneas de células madre y epiteliales transformadas *in vitro* con iAs. Hasta donde se sabe, no existen trabajos previos que evalúe esta vía antitumoral completa asociada a TLR3 en el CaP asociado a la exposición a iAs.

Primero, se evaluó el nivel de expresión basal de varios intermediarios de la vía (TLR3, miR-29c, miR-148b, miR-152, RAR β , DNMT1, DNMT3A, SOX2, CD44 y CD133) en células de control y en células transformadas con iAs. En general, CAsE-PE y As-CSC transformados con iAs muestran una menor expresión basal de TLR3, miR-29c, miR-148b, miR-152, RAR β , pero mayor expresión de DNMT1, DNMT3A, SOX2, CD44 y CD133 en comparación con sus controles respectivos, RWPE-1 y WPE-Stem. Estudios anteriores han demostrado que las líneas celulares de CaP, DU-145, LNCaP y PC3 expresan cantidades similares de TLR3, aunque no incluyeron una línea celular de control (Galli et al., 2010; Paone et al., 2010).

La expresión basal de miR-29c, miR-148b y miR-152 fue menor en las líneas celulares transformadas con iAs, en comparación con sus respectivos controles. Estos resultados son consistentes con informes que muestran que estos miARN se reducen significativamente en células PC3 y LNCaP, en comparación con células de próstata no tumorales de tejidos sanos, o con células de queratinocitos humanos inmortalizadas con HaCaT (Feng et al., 2019; Li et al., 2018; Sengupta et al., 2018; Zhu et al., 2013, 2014). Además, nuestras observaciones son consistentes con los informes que indican que los niveles de expresión de DNMT1 y DNMT3 en DU145 y PC3 están significativamente elevados en comparación con RWPE-1 (Galli et al., 2013c; Lee et al., 2016). A diferencia de RWPE-1 y WPE-Stem, las células CAsE-PE y As-CSC no respondieron al tratamiento con PIC, 9cRA o PIC + 9cRA en términos de expresión de TLR3. Esta observación sugiere que una población objetivo clave en el tratamiento de CaP (SC / CSC), podría responder menos a la activación de la vía antitumoral basada en la activación de TLR3 con su ligando sintético PIC. En un estudio de Galli y colaboradores, las células DU-145 mostraron

un aumento de la expresión de TLR3 después de la activación cuando las células se trataron con 9cRA (10 μ M) y PIC (25 μ g/mL) durante 48 horas. Se realizaron observaciones similares en la línea celular prostática murina transformada, TRAMP, y en la línea celular de cáncer de mama, MDA-MB-231 (Galli et al., 2013b). El mismo estudio mostró que la expresión de miR-29c, -148b y -152 aumentó después de la interacción de TLR3 con PIC (25 μ g/mL) durante 6 horas en DU-145 (Galli et al., 2013b). En el presente trabajo, las células CAsE-PE y As-CSC expuestas a PIC, 9cRA o su combinación no mostraron cambios en la expresión de miR-29c, -148b y -152 en comparación con RWPE-1 y WPE-Stem. También se ha informado de una disminución similar en los niveles de expresión de miRNAs asociados con la regulación de DNMT en SC transformadas de otros tejidos. Por ejemplo, los CSC de osteosarcoma (3AB-OS-CSC), exhiben una expresión basal relativa de miR-29 disminuida en comparación con su línea celular fuente 3AB-OS (Di Fiore et al., 2014). En otro estudio, la expresión de miR-152 fue significativamente menor en células de carcinoma hepático con propiedades similares a CSC (CD133 +) en comparación con sus contrapartes de control (Huang et al., 2015). Los posibles objetivos para miR-29c y miR-148b/-152 incluyen DNMT3A y un DNMT1 correspondientemente (Morita et al., 2013; Sengupta et al., 2018). Aunque las células CAsE-PE muestran una menor expresión de TLR3, la exposición de estas células a PIC, 9cRA o su combinación (PIC + 9cRA) mostró una expresión relativa disminuida de DNMT1 y DNMT3A. Sin embargo, la expresión relativa de ambas DNMTs sigue siendo significativamente mayor en CAsE-PE en comparación con RWPE-1. Si bien los niveles de DNMT1 y DNMT3A son más altos en las células As-CSC en comparación con el WPE-Stem, la expresión de estos DNMT en As-CSC no se alteró tras la exposición a PIC, 9cRA o su combinación. En los ensayos realizados en este trabajo, la expresión de RAR β en CAsE-PE sí aumentó en las células tras la exposición a los tratamientos (PIC + 9cRA), sin embargo, no fue en los niveles observados en las células RWPE-1, lo que sugiere que, a pesar de mostrar alteraciones en la vía antitumoral relacionadas con la activación de TLR3, las células CAsE-PE todavía responden en cierta medida al tratamiento con PIC + 9cRA.

Por otro lado, cuando se expusieron a tratamientos, las células As-CSC mostraron una expresión de RAR β muy pobre en comparación con WPE-Stem, en contraste, estudios previos mostraron una expresión de RAR β significativamente aumentada en líneas celulares como PC3, LNCaP y DU145, tratadas con 9cRA (10 μ M) a las 48 horas con respecto a su condición basal (Galli et al., 2013b; Modarai et al., 2018).

Como se indicó, Tokar y colaboradores, demostraron previamente que la exposición de RWPE-1 a iAs induce el enriquecimiento de células que expresan marcadores de CSC (Tokar et al., 2010b, 2017). La relevancia del uso de retinoides en el tratamiento del cáncer, radica en la inducción de la diferenciación de CSC (Liu et al., 2010). En este sentido, la respuesta celular potencial a 9cRA se puede determinar mediante la expresión de genes asociados con diferenciación celular como CD44, CD133, SOX2, ABCG2, OCT4 y Notch1 (Bushue and Wan, 2010b; Kalantari et al., 2017; Tokar et al., 2010b). En este estudio, la activación de RAR β como factor de transcripción a través de la unión a 9cRA se determinó midiendo la expresión de marcadores de SCs típicos, SOX2, CD44 y CD133. La exposición de CAsE-PE a PIC + 9cRA, resultó en una disminución significativa en la expresión de CD44, CD133 y SOX2, alcanzando niveles similares a las células RWPE-1. Por el contrario, las células As-CSC expuestas a PIC + 9cRA no muestran cambios en la expresión relativa de estos marcadores, en comparación con WPE-Stem no transformadas. Estos resultados sugieren fuertemente que las SCs transformadas con iAs no responden a este tratamiento.

6.-CONCLUSIÓN

En conjunto, los resultados del presente estudio mostraron que las líneas celulares de próstata epiteliales y las SC transformadas malignamente *in vitro* por iAs tienen una expresión basal de TLR3 disminuida y una vía antitumoral alterada, la cual está basada en la inducción de la re-expresión de RAR β . Estos resultados también mostraron que los tratamientos con PIC y 9cRA tienden a aumentar la expresión de RAR β en la línea celular heterogénea CAsE-PE, pero no así en la línea celular As-CSC. Estas observaciones sugieren fuertemente que la transformación de iAs tiene efectos diferentes en las células provenientes de células diferenciadas (CAsE-PE) y aquellas provenientes de células madre (As-CSC), y apuntan, además, a que esta transformación hace que las SC no respondan al tratamiento basado en la activación de TLR3 y la diferenciación celular por inducción de la expresión de RAR β (Figura 6). Aún no se han esclarecido los mecanismos por los que esto sucede, sin embargo, se propone que los eventos que involucran el silenciamiento de genes como p53, que es un regulador clave de la expresión de TLR3, pueden desempeñar un papel central en el desarrollo del fenotipo de SC o CSC.

Este estudio contribuye a sentar las bases para la identificación rutinaria de casos de CaP asociados con la exposición a iAs, con la finalidad de realizar estudios para predecir la efectividad de los tratamientos PIC + 9cRA, lo cual podría ser a través de la evaluación del estado de TLR3 y RAR β . Se requieren estudios adicionales para determinar los mecanismos por los cuales iAs disminuye la expresión de TLR3, lo que permitiría la identificación de dianas moleculares para inducir la reexpresión de TLR3 y RAR β en poblaciones humanas expuestas a este metaloide.

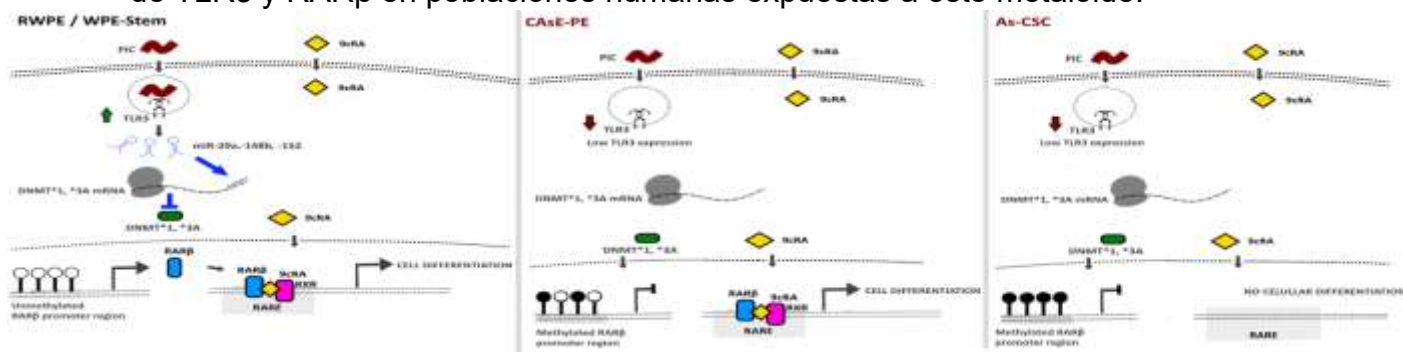


Figura 6. Ruta antitumoral relacionada con la activación de TLR3 v su sinergia con

7. REFERENCIAS

- Adams, S., 2009. Toll-like receptor agonists in cancer therapy. *Immunotherapy* 1, 949–964.
- Allenby, G., Bocquel, M.T., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J.F., Chambon, P., Levin, A.A., 1993. Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 30–34.
- Barton, G.M., Medzhitov, R., 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science* (80-.). 300, 1524–1525.
- Belinsky, S.A., 2005. Silencing of genes by promoter hypermethylation: Key event in rodent and human lung cancer. *Carcinogenesis* 26, 1481–1487.
- Benbrahim-Tallaa, L., Waalkes, M.P., 2008a. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ. Health Perspect.* 116, 158–164.
- Benbrahim-Tallaa, L., Waalkes, M.P., 2008b. Inorganic arsenic and human prostate cancer. *Environ. Health Perspect.* 116, 158–164.
- Bernardo, A.R., Cosgaya, J.M., Aranda, A., Jiménez-Lara, A.M., 2013. Synergy between RA and TLR3 promotes type I IFN-dependent apoptosis through upregulation of TRAIL pathway in breast cancer cells. *Cell Death Dis.* 4, 1–10.
- Bushue, N., Wan, Y.J.Y., 2010a. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1285–1298.
- Bushue, N., Wan, Y.J.Y., 2010b. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 62, 1285–1298.
- Connolly, R.M., Nguyen, N.K., Sukumar, S., 2013. Molecular pathways: Current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment. *Clin. Cancer Res.* 19, 1651–1959.
- DeCicco, K.L., Youngdahl, J.D., Catharine Ross, A., 2001. All-trans-retinoic acid and polyribonucleosinic: Polyribocytidylic acid in combination potentiate specific

- antibody production and cell-mediated immunity. *Immunology* 104, 341–348.
- Di Fiore, R., Drago-Ferrante, R., Pentimali, F., Di Marzo, D., Forte, I.M., D'anneo, A., Carlisi, D., De Blasio, A., Giuliano, M., Tesoriere, G., Giordano, A., Vento, R., 2014. MicroRNA-29b-1 impairs in vitro cell proliferation, self-renewal and chemoresistance of human osteosarcoma 3AB-OS cancer stem cells. *Int. J. Oncol.* 45, 2013–2023.
- Estornes, Y., Micheau, O., Renno, T., Lebecque, S., 2013. Dual role of TLR3 in inflammation and cancer cell apoptosis. *World's Larg. Sci. Technol. Med. Open Access B. Publ.* 247–270.
- Feng, F., Liu, H., Chen, A., Xia, Q., Zhao, Y., Jin, X., Huang, J., 2019. miR-148-3p and miR-152-3p synergistically regulate prostate cancer progression via repressing KLF4. *J. Cell. Biochem.* 120, 17228–17239.
- Galli, R., Paone, A., Fabbri, M., Zanesi, N., Calore, F., Cascione, L., 2013a. microRNA-dependent reexpression of functional RAR β and tumor regression 3, 1–6.
- Galli, R., Paone, A., Fabbri, M., Zanesi, N., Calore, F., Cascione, L., Acunzo, M., Stoppacciaro, A., Tubaro, A., Lovat, F., 2013b. Toll-like receptor 3 (TLR3) activation induces microRNA-dependent reexpression of functional RAR β and tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 9812–9817.
- Galli, R., Paone, A., Fabbri, M., Zanesi, N., Calore, F., Cascione, L., Acunzo, M., Stoppacciaro, A., Tubaro, A., Lovat, F., Gasparini, P., Fadda, P., Alder, H., Volinia, S., Filippini, A., Ziparo, E., Riccioli, A., Croce, C.M., 2013c. Toll-like receptor 3 (TLR3) activation induces microRNA-dependent reexpression of functional RAR β and tumor regression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 9812–9817.
- Galli, R., Starace, D., Busà, R., Angelini, D.F., Paone, A., De Cesaris, P., Filippini, A., Sette, C., Battistini, L., Ziparo, E., Riccioli, A., 2010. TLR Stimulation of Prostate Tumor Cells Induces Chemokine-Mediated Recruitment of Specific Immune Cell Types. *J. Immunol.* 184, 6658–6669.

- González-Reyes, S., Fernández, J.M., González, L.O., Aguirre, A., Suárez, A., González, J.M., Escaff, S., Vizoso, F.J., 2011. Study of TLR3, TLR4, and TLR9 in prostate carcinomas and their association with biochemical recurrence. *Cancer Immunol. Immunother.* 60, 217–226.
- Heidarzadeh, M., Roodbari, F., Hassanpour, M., Ahmadi, M., Saberianpour, S., Rahbarghazi, R., 2020. Toll-like receptor bioactivity in endothelial progenitor cells. *Cell Tissue Res.* 1–8.
- Huang, H., Hu, M., Li, P., Lu, C., Li, M., 2015. Mir-152 inhibits cell proliferation and colony formation of CD133+ liver cancer stem cells by targeting KIT. *Tumor Biol.* 36, 921–928.
- Isayev, O., Zhu, Y., Gasimov, E., Werner, J., Bazhin, A. V., 2019. Effect of Chemotherapeutic Agents on the Expression of Retinoid Receptors and Markers of Cancer Stem Cells and Epithelial-Mesenchymal Transition. *Biochem.* 84, 1424–1432.
- Kalantari, E., Asgari, M., Nikpanah, S., 2017. Co-Expression of Putative Cancer Stem Cell Markers CD44 and CD133 in Prostate Carcinomas. *Pathol. Oncol. Res.*
- Kawasaki, T., Kawai, T., 2014. Toll-like receptor signaling pathways. *Front. Immunol.* 5, 1–8.
- Kolla, V., Lindner, D.J., Weihua, X., Borden, E.C., Kalvakolanu, D. V, 1996. Modulation of interferon (IFN)-inducible gene expression by retinoic acid up-regulation of STAT1 protein in IFN-unresponsive cells. *J. Biol. Chem.* 271, 10508–10514.
- Le Naour, J., Galluzzi, L., Zitvogel, L., Kroemer, G., Vacchelli, E., 2020. Trial watch: TLR3 agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology* 9.
- Lee, E., Wang, J., Yumoto, K., Jung, Y., Cackowski, F.C., Decker, A.M., Li, Y., Franceschi, R.T., Pienta, K.J., Taichman, R.S., 2016. DNMT1 Regulates Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells, Which Promotes

- Prostate Cancer Metastasis. *Neoplasia (United States)* 18, 553–566.
- Li, J., Fu, F., Wan, X., Huang, S., Wu, D., Li, Y., 2018. Up-regulated miR-29c inhibits cell proliferation and glycolysis by inhibiting SLC2A3 expression in prostate cancer. *Gene* 665, 26–34.
- Liu, Te, Xu, F., Du, X., Lai, D., Liu, Tianjin, Zhao, Y., Huang, Q., Jiang, L., Huang, W., Cheng, W., Liu, Z., 2010. Establishment and characterization of multi-drug resistant, prostate carcinoma-initiating stem-like cells from human prostate cancer cell lines 22RV1. *Mol. Cell. Biochem.* 340, 265–273.
- Modarai, S.R., Gupta, A., Opdenaker, L.M., Kowash, R., Masters, G., Viswanathan, V., Zhang, T., Fields, J.Z., Boman, B.M., 2018. The anti-cancer effect of retinoic acid signaling in CRC occurs via decreased growth of ALDH⁺ colon cancer stem cells and increased differentiation of stem cells. *Oncotarget* 9, 34658–34669.
- Morita, S., Horii, T., Kimura, M., Ochiya, T., Tajima, S., Hatada, I., 2013. MiR-29 represses the activities of DNA methyltransferases and DNA demethylases. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 14647–14658.
- Nguyen, P.H., Giraud, J., Staedel, C., Chambonnier, L., Dubus, P., Chevret, E., Bœuf, H., Gauthereau, X., Rousseau, B., Fevre, M., Soubeyran, I., Belleannée, G., Evrard, S., Collet, D., Mégraud, F., Varon, C., 2016. All-trans retinoic acid targets gastric cancer stem cells and inhibits patient-derived gastric carcinoma tumor growth. *Oncogene* 35, 5619–5628.
- Paone, A., Galli, R., Gabellini, C., Lukashev, D., Starace, D., Gorlach, A., de Cesaris, P., Ziparo, E., del Bufalo, D., Sitkovsky, M. V., Filippini, A., Riccioli, A., 2010. Toll-like receptor 3 regulates angiogenesis and apoptosis in prostate cancer cell lines through hypoxia-inducible factor 1 α . *Neoplasia* 12, 539–549.
- Park, J., Zhang, X., Lee, S.K., Song, N.Y., Son, S.H., Kim, K.R., Shim, J.H., Park, K.K., Chung, W.Y., 2019. CCL28-induced RAR β expression inhibits oral squamous cell carcinoma bone invasion. *J. Clin. Invest.* 129, 5381–5399.
- Pasquali, D., Rossi, V., Bellastella, G., Bellastella, A., Sinisi, A., 2006. Natural and

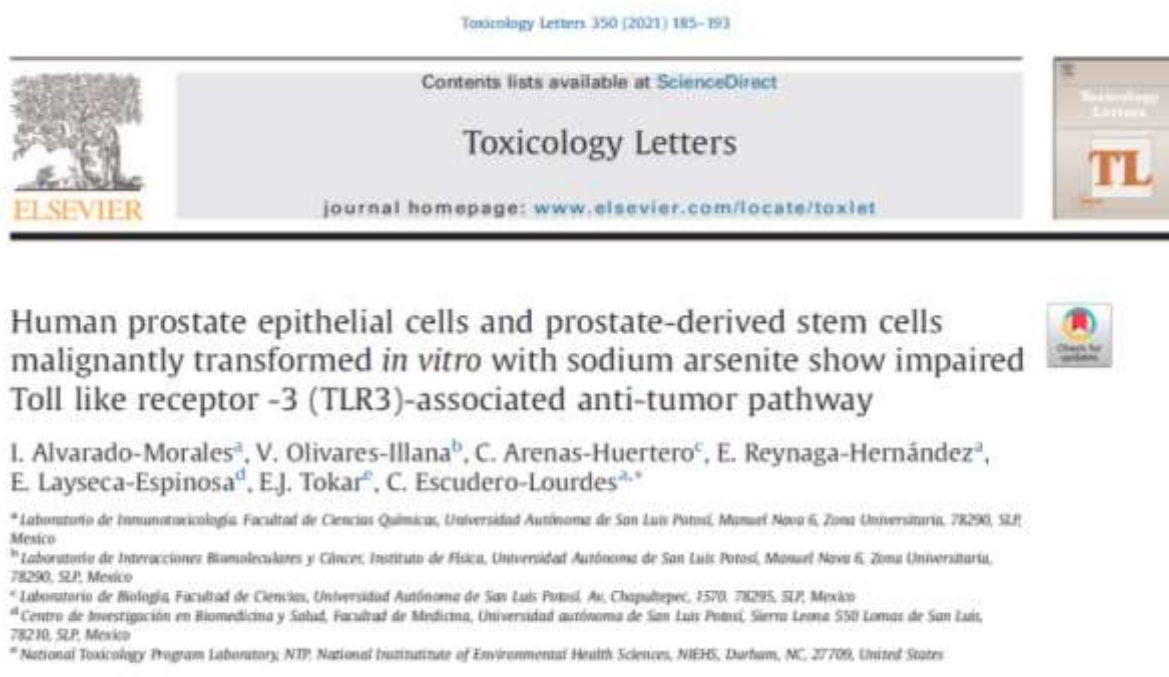
- Synthetic Retinoids in Prostate Cancer. *Curr. Pharm. Des.* 12, 1923–1929.
- Podrazil, M., Horvath, R., Becht, E., Rozkova, D., Bilkova, P., Sochorova, K., Hromadkova, H., Kayserova, J., Vavrova, K., Lastovicka, J., Vrabцова, P., Kubackova, K., Gasova, Z., Jarolim, L., Babjuk, M., Spisek, R., Bartunkova, J., Fucikova, J., 2015. Phase I/II clinical trial of dendritic-cell based immunotherapy (DCVAC/PCa) combined with chemotherapy in patients with metastatic, castration-resistant prostate cancer. *Oncotarget* 6, 18192–18205.
- Premkumar, V., Dey, M., Dorn, R., Raskin, I., 2010. MyD88-dependent and independent pathways of toll-like receptors are engaged in biological activity of triptolide in ligand-stimulated macrophages. *BMC Chem. Biol.* 10.
- Sengupta, D., Deb, M., Patra, S.K., 2018. Antagonistic activities of miR-148a and DNMT1: Ectopic expression of miR-148a impairs DNMT1 mRNA and dwindle cell proliferation and survival. *Gene* 660, 68–79.
- Swisshelm, K., Ryan, K., Lee, X., Tsou, H.C., Peacocke, M., Sager, R., 1994. Down-regulation of retinoic acid receptor β in mammary carcinoma cell lines and its up-regulation in senescing normal mammary epithelial cells. *Cell Growth Differ.* 5, 133–141.
- Tokar, Diwan, B.A., Waalkes, M.P., 2010a. Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype. *Environ. Health Perspect.* 118, 108–115.
- Tokar, Diwan, B.A., Waalkes, M.P., 2010b. Arsenic exposure transforms human epithelial stem/progenitor cells into a cancer stem-like phenotype. *Environ. Health Perspect.* 118, 108–115.
- Tokar, Qu, W., Liu, J., Liu, W., Webber, M.M., Phang, J.M., Waalkes, M.P., 2010c. Arsenic-specific stem cell selection during malignant transformation. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 638–649.
- Tokar, Qu, W., Waalkes, M.P., 2017. Arsenic , Stem Cells , and the Developmental Basis of Adult Cancer 120, 192–203.

- Whitworth, J.M., Straughn, J.M., Atigadda, E.R., Muccio, D.D., Buchsbaum, D.J., 2012. The use of retinoids in ovarian cancer: A review of the literature. *Int. J. Gynecol. Cancer* 22, 191–198.
- Xu, X.C., 2007. Tumor-suppressive activity of retinoic acid receptor- β in cancer. *Cancer Lett.* 253, 14–24.
- Zhu, C., Li, J., Ding, Q., Cheng, G., Zhou, H., Tao, L., Cai, H., Li, P., Cao, Q., Ju, X., Meng, X., Qin, C., Hua, L., Shao, P., Yin, C., 2013. MiR-152 controls migration and invasive potential by targeting TGF α in prostate cancer cell lines. *Prostate* 73, 1082–1089.
- Zhu, W., He, J., Chen, D., Zhang, B., Xu, L., Ma, H., Liu, X.G., Zhang, Y.K., Le, H., 2014. Expression of miR-29c, miR-93, and miR-429 as potential biomarkers for detection of early stage non-small lung cancer. *PLoS One* 9, 1–7.

Anexos

1.- Artículos publicados derivados de esta tesis.

Artículo de investigación publicado en Toxicology Letters de la editorial Elsevier.



Recibido 10 Junio 2021, Revisado 13 Julio 2021, Aceptado 19 Julio 2021, Disponible en línea 23 Julio 2021. Publicado impreso 10 de octubre 2021

Editor: Dr. Angela Mally

<https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2021.07.013>