



La desregulación de la maquinaria de *splicing* está directamente asociada con la agresividad del cáncer de próstata

Instituto de postgrado de la Universidad de Córdoba

Máster en Investigación Biomédica Traslacional

Trabajo de Fin de Máster

Antonio Jesús Montero Hidalgo



UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba; Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología de la Universidad de Córdoba; y CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición; Córdoba, España.

Grupo GC27: OncObesidad y Metabolismo

Trabajo de Fin de Máster

La desregulación de la maquinaria de *splicing* está directamente asociada con la agresividad del cáncer de próstata

El Director:

Raúl M. Luque Huertas

El Codirector:

Manuel D. Gahete Ortiz

El Alumno:

Antonio J. Montero Hidalgo

Índice general

Índice de figuras

Índice de tablas

Resumen	1
Introducción.....	2
Objetivos	9
Materiales y Métodos.....	10
Resultados	23
Discusión	37
Conclusión.....	40
Bibliografía.....	41

Índice de figuras

<i>Figura 1. Diagrama original de la escala de Gleason.</i>	3
<i>Figura 2. Principales mecanismos de resistencia de las células de cáncer de próstata frente a la deprivación androgénica</i>	4
<i>Figura 3. Organización del gen de receptor de andrógenos (AR) y estructura de la variante de splicing canónica y AR-v7.</i>	5
<i>Figura 4. Principales tipos de eventos de splicing</i>	7
<i>Figura 5. Esquema de las secuencias reguladoras del proceso de splicing presentes en el pre-ARNm</i>	8
<i>Figura 6. Niveles de expresión de la maquinaria de splicing en muestras de cáncer de próstata</i>	23
<i>Figura 7. Capacidad diagnóstica de la maquinaria de splicing en cáncer de próstata</i>	24
<i>Figura 8. Asociaciones y correlaciones entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 con parámetros clínicos de agresividad en muestras de cáncer de próstata.</i>	25
<i>Figura 9. Asociación entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y el desarrollo de recidiva bioquímica en cáncer de próstata</i>	26
<i>Figura 10. Asociación y correlación entre el nivel de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y parámetros clínicos de agresividad en una cohorte independiente de muestras de cáncer de próstata</i>	27

<i>Figura 11. Correlación entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 con el de elementos moleculares de agresividad en una cohorte de muestras de cáncer de próstata muy agresivo</i>	28
<i>Figura 12. Determinación del nivel de proteína de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 en muestras de cáncer de próstata y asociación con parámetros clínicos de agresividad</i>	Error! Bookmark not defined.
<i>Figura 13. Perfil de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 en líneas celulares prostáticas</i>	31
<i>Figura 14. Validación del silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y caracterización de su efecto funcional sobre la tasa de proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata</i>	32
<i>Figura 15. Efecto del silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 sobre la tasa de migración de la línea celular DUI45</i>	33
<i>Figura 16. Efecto del silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 sobre diversas rutas de señalización</i>	33
<i>Figura 17. Efecto del silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 sobre la expresión de transcritos relacionados con la agresividad del cáncer de próstata</i>	35
<i>Figura 18. Ensayo de proliferación celular en respuesta al tratamiento combinado de enzalutamida y silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3</i>	36

Índice de tablas

<i>Tabla 1. Componentes de la mezcla de lisis para muestras embebidas en parafina</i>	12
<i>Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción de la ADNasa I (protocolo para muestras embebidas en parafina)</i>	13
<i>Tabla 3. Componentes de la mezcla para la retrotranscripción de ARN total a ADNc</i>	14
<i>Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR cuantitativa (qPCR)</i>	15
<i>Tabla 5. Perfil térmico usado para la PCR cuantitativa (qPCR)</i>	15
<i>Tabla 6. Listado de cebadores de genes medidos por qPCR</i>	16
<i>Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción de pre-amplificación</i>	17
<i>Tabla 8. Perfil térmico usado para la reacción de pre-amplificación</i>	17
<i>Tabla 9. Componentes de la mezcla de reacción de la exonucleasa I</i>	18

Resumen

La desregulación de la expresión de variantes de *splicing* se ha postulado recientemente como una nueva huella molecular del cáncer. Así, aunque la aparición de variantes de *splicing* aberrantes (p.ej.: AR-v7, sst5TMD4, etc.) se ha asociado a un incremento de la agresividad del cáncer de próstata (CaP) y/o al desarrollo del cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), hasta la fecha no se ha explorado si el mecanismo molecular subyacente a este fenómeno está relacionado con una desregulación de la maquinaria celular responsable del proceso de *splicing* (componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing*). Por ello, en este proyecto se analizaron los niveles de expresión de un conjunto representativo de componentes del *spliceosoma* ($n=15$) y factores de *splicing* ($n=27$) en dos cohortes de muestras de CaP: 1) muestras de CaP clínicamente localizadas ($n=84$) y su respectivo tejido adyacente no tumoral ($n=84$); y, 2) muestras de biopsias de CaP agresivo ($n=42$). Nuestros resultados reflejaron una profunda desregulación en el nivel de expresión de multitud de componentes de la maquinaria de *splicing* (i.e. 7 componentes del *spliceosoma* y 19 factores de *splicing*) al comparar muestras de CaP frente a las correspondientes regiones adyacentes no tumorales. Además, la sobreexpresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* (a nivel de ARNm y proteína) se asoció con relevantes parámetros clínicos (p.ej.: grado Gleason, estadio tumoral, presencia de metástasis, recidiva bioquímica) y moleculares (p.ej.: expresión de *AR-v7*) de agresividad tumoral en muestras de CaP. A su vez, se llevaron a cabo ensayos funcionales (proliferación/migración celular) y mecanísticos [análisis de la expresión génica (PCR cuantitativa) y proteica (Western-blot)] en líneas celulares derivadas de próstata normal (PNT2) y tumoral (22Rv1, LNCaP, DU145 y PC-3) en respuesta al silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3*. Estos análisis revelaron un descenso en la tasa de proliferación/migración de células de CaP a través de la modulación de los niveles de expresión de variantes de *splicing* oncogénicas (p.ej.: *AR-v7*, *PKM2*, *XBPI-S*), así como de una alteración de rutas de señalización oncogénicas (p.ej.: p-AKT, p-JNK) claves en el desarrollo y/o agresividad del CaP. En conjunto, nuestros resultados demuestran que la maquinaria de *splicing* se encuentra drásticamente alterada en CaP, donde *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* podrían representar nuevas dianas para el diagnóstico/pronóstico y tratamiento del CaP y CPRC.

Introducción

El cáncer representa una de las amenazas más graves para la salud mundial, representando la segunda causa de muerte a nivel global, ocasionando 9,6 millones de defunciones y diagnosticándose 18,1 millones de nuevos casos en el año 2018 [2]. Concretamente, en España, se diagnostican cerca de 300.000 nuevos casos de cáncer cada año, de los cuales más de 100.000 acabarán muriendo por la enfermedad [3]. Además, se estima un incremento de estos números en el futuro, pudiendo alcanzar una incidencia de 29,5 millones de nuevos casos para el año 2040 a nivel global, un 63,1% más que en el año 2018 [4]. Entre todos los tipos de cáncer, el de próstata (CaP) ocupa el segundo puesto en términos de incidencia en el colectivo masculino a nivel mundial (1,3 millones de nuevos casos) y el primero en países desarrollados (802.000 nuevos casos) en el año 2018. Además, esta patología tumoral presenta una elevada tasa de mortalidad (360.000 defunciones por CaP a nivel mundial en el año 2018), resultando ser la quinta causa de muerte por cáncer en el colectivo masculino a nivel mundial (7,6% del total de muertes en hombres) y la tercera en países desarrollados (8,9% del total de muertes en hombres) [4]. En España, el CaP representa la tercera causa de muerte por cáncer en el colectivo masculino, provocando 6.000 defunciones en el año 2018 (9% del total de muertes en hombres) [3].

En los últimos años, se han mejorado los métodos de diagnóstico precoz de esta patología [5], entre los cuales destaca el examen digital rectal (EDR), que permite determinar la presencia de nódulos endurecidos en la glándula prostática [6]. Además de este examen, en la práctica clínica actual, se lleva a cabo el análisis de los niveles sanguíneos de antígeno prostático específico o PSA, los cuales se encuentran elevados en pacientes con CaP. Sin embargo, el análisis del PSA presenta una discutible especificidad, debido a que los niveles también aumentan en respuesta a la presencia de patologías no tumorales (p.ej.: hiperplasia benigna de próstata o prostatitis) [7], siendo necesario en todos los casos la confirmación de la presencia de cáncer mediante análisis histológico tras biopsia. Concretamente, el especialista anatómo-patólogo determina tanto la presencia de tumor como la agresividad de este, proporcionando un valor de la escala Gleason (definido como el grado de desdiferenciación que presenta el tejido prostático). Esta puntuación puede presentar valores desde 1 a 5, siendo 5 el asignado a biopsias de próstata tumoral con un alto grado de desdiferenciación histológica-celular (pérdida de organización glandular) con respecto al tejido sano (*Figura 1*). A su vez, debido a la

heterogeneidad del CaP, se realiza el análisis de distintas biopsias procedentes del mismo paciente y se suman los grados de las dos áreas que formen la mayor parte del tumor [1].



Figura 1. Diagrama original de la escala de Gleason. Se muestra la organización histológica acorde a los distintos valores de la escala de Gleason. Los valores se indican en la parte derecha (1 a 5). Se observa un mayor grado de des-diferenciación histológica-celular y un peor pronóstico de la enfermedad a medida que el valor de la escala de Gleason aumenta [1].

La primera aproximación terapéutica en el CaP consiste en la eliminación del tumor mediante prostatectomía radical, técnica quirúrgica que consiste en la extirpación de la glándula prostática y las vesículas seminales y que se lleva a cabo cuando el tumor se encuentra confinado en la próstata (CaP con baja agresividad). Para el tratamiento de casos de elevada agresividad en el momento del diagnóstico (p.ej.: recidivas, tumores que presentan extensión extra-prostática) se procede a la terapia hormonal, también llamada terapia de deprivación androgénica, la cual consiste en el uso de agonistas y antagonistas de LHRH como la leuprolida (Lupron®) y el degarelix (Firmagon®), respectivamente, capaces de reducir los niveles sistémicos de andrógenos, claves en el desarrollo de la glándula prostática así como en la fisiopatología del CaP [8-10], a través del bloqueo del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal [10, 11].

Sin embargo, pese a los avances de diagnóstico y terapia, el CaP presenta una elevada mortalidad, lo cual es debido, al menos en parte, a que un 10-20% de los pacientes desarrollan resistencia a la deprivación androgénica [12], desembocando en el fenotipo más agresivo del CaP, denominado CaP resistente a castración (CPRC), para el cual no existen aproximaciones terapéuticas realmente efectivas. Estos pacientes son tratados con novedosos fármacos, entre los que se encuentran la abiraterona (Zytiga®, capaz de reducir la producción exo-testicular de testosterona), y el anti-andrógeno enzalutamida [Xtandi®, el cual antagoniza el receptor de andrógenos (AR) evitando así su señalización] [11]. Aunque estas estrategias consiguen paliar el CPRC en sus primeros estadios, finalmente muchos de los pacientes se vuelven insensibles al tratamiento farmacológico [13, 14].

Aunque las razones de la aparición del CPRC, así como la pérdida de respuesta a fármacos como abiraterona y enzalutamida no están del todo definidas, algunos estudios demuestran que en el CPRC se potencian rutas de señalización alternativas a la androgénica, como es el caso de la vía PI3K-AKT-mTOR [15]. Además, se ha descubierto que algunas de las células de CaP son capaces de trans-diferenciarse hacia un fenotipo neuroendocrino, provocando una señalización oncogénica independiente del AR, normalmente mediada por el receptor de glucocorticoides [16, 17]. Por último, los mecanismos de resistencia más habituales y mejor descritos son aquellos que afectan al propio AR, tales como la amplificación del número de copias del gen y sobreexpresión de este, alteración del patrón de modificaciones post-traduccionales del AR, modulación de la actividad de co-reguladores del receptor de andrógenos y, de manera muy predominante, la aparición de las variantes de *splicing* no canónicas (**Figura 2**) [18].

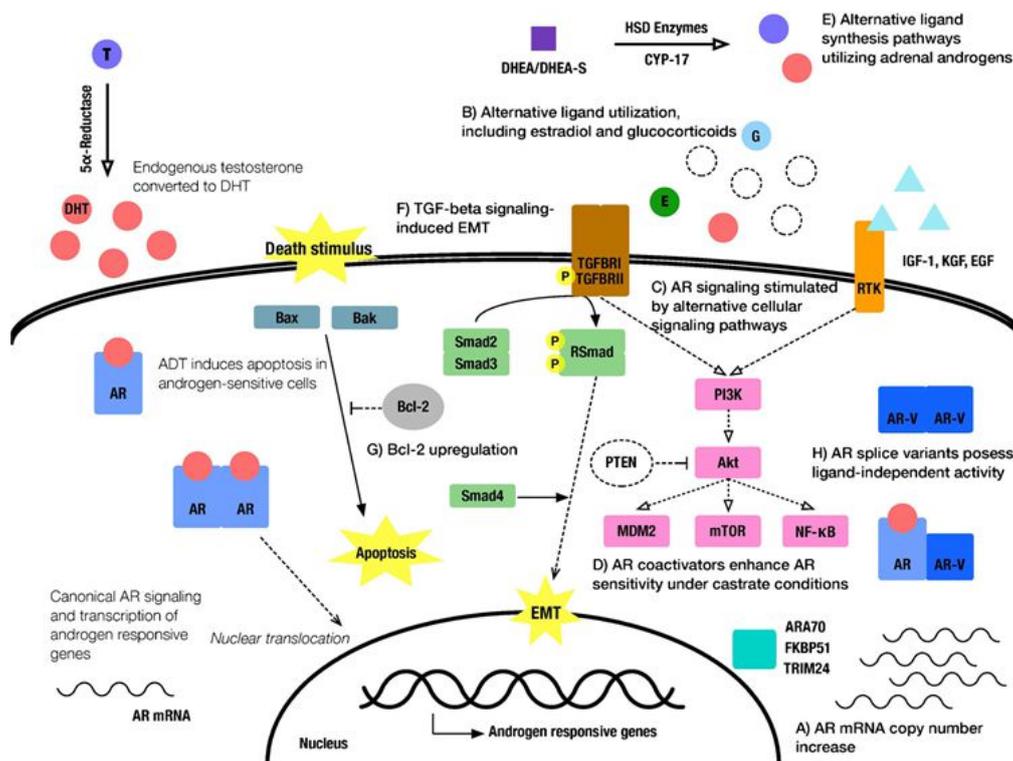


Figura 2. Principales mecanismos de resistencia de las células de cáncer de próstata frente a la privación androgénica. A) Sobreexpresión del receptor de andrógenos (AR); B) Activación del receptor de andrógenos en respuesta a ligandos alternativos (p.ej.: Estradiol y glucocorticoides); C) Activación de rutas de señalización alternativas a la androgénica (p.ej.: Vía PI3K-AKT-mTOR); D) Modulación de la expresión y/o actividad de co-reguladores del receptor de andrógenos; E) Síntesis alternativa de ligandos del AR utilizando dehidroepiandrosterona (DHEA); F) Activación de la ruta de señalización TGFβ; G) Activación de Bcl-2; H) Aparición de variantes de *splicing* del AR con actividad constitutiva. AR: receptor de andrógenos; AR-V: variante de *splicing* no canónica del AR; DHT: dehidrotestosterona; E: estradiol; EMT: transición epitelio-mesenquimal; G: glucocorticoide; RTK: receptor tirosina quinasa; T: testosterona. Editada a partir de [19].

En este sentido, la variante 7 del receptor de andrógenos (AR-v7) juega un papel fundamental en el proceso de resistencia a la deprivación androgénica. En concreto, el AR-v7 pierde el dominio de unión a ligando (LBD, *ligand binding domain*) como consecuencia de una alteración del correcto proceso de *splicing* (exclusión del fragmento localizado entre los exones 4 y 8 e inclusión del exón críptico 3) (**Figura 3**) [20, 21], presentando, como resultado, una actividad constitutiva independiente de andrógenos [22]. Esta variante aparece durante el proceso de resistencia a la deprivación androgénica, asociándose estrechamente con el fenotipo de CPRC [23], siendo además responsable, en gran medida, de la resistencia a fármacos como abiraterona o enzalutamida [24, 25]. De hecho, un 3% de los pacientes son considerados positivos para AR-v7 antes de ser tratados con anti-andrógenos, incrementando hasta un 18-31% tras la insensibilización al tratamiento [26]. Esta situación desemboca en un estado incurable, el cual se intenta tratar con quimioterapia agresiva (p.ej.: docetaxel, Taxotere®) que alarga, en algunos casos y de forma modesta, la esperanza de vida de estos pacientes [27].

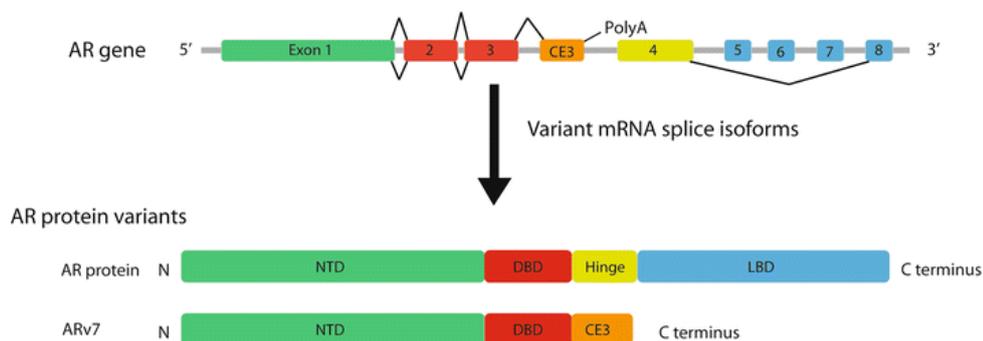


Figura 3. Organización del gen de receptor de andrógenos (AR) y estructura de la variante de *splicing* canónica y AR-v7. En la parte superior se indica la organización génica de AR, donde los exones se representan con rectángulos coloreados y los intrones como líneas grises gruesas. En la parte inferior, se muestra el transcrito maduro correspondiente a la variante canónica AR y la variante AR-v7, ambas generadas por medio del proceso de *splicing*. Mediante un código de colores, se indica qué parte del transcrito codifica para un dominio de la proteína futura. NTD: dominio N-terminal; DBD: dominio de unión a ADN; Hinge: dominio bisagra; LBD: dominio de unión a ligando; CE3: exón críptico 3. Editada a partir de [28].

Sin embargo, además de AR-v7, existen numerosas variantes de *splicing* con un importante papel oncogénico en CaP, como el **sst5TMD4** (variante del receptor de somatostatina 5 relacionada con una mayor agresividad tumoral y la presencia de metástasis, y asociada con una peor respuesta al tratamiento con análogos de somatostatina) [29], **In1-ghrelina** (variante de la hormona ghrelina asociada con la

regulación de rasgos agresivos como proliferación y migración celular, capaz de modular numerosas rutas de señalización oncogénicas) [30], **KLF6-SV1** (variante del gen *KLF6* que antagoniza la actividad supresora de la isoforma canónica, incrementando la agresividad tumoral y disminuyendo la apoptosis) [31] o **REST4** (variante truncada del gen *REST* que actúa como antagonista de la isoforma canónica, promoviendo la agresividad tumoral y relacionándose con el desarrollo de CaP neuroendocrino) [32]. Del mismo modo, se ha descrito el papel pro-tumoral de estas y otras variantes de *splicing* (p.ej.: en una gran variedad de patologías tumorales CD44v6, PKM1, PKM2, Bcl-X_L, Bcl-X_S) [33-35]. Por estas razones, se ha propuesto recientemente que la desregulación del mecanismo fisiológico de *splicing* puede subyacer al desarrollo y progresión de diversas patologías [36, 37].

El **proceso de *splicing*** representa un mecanismo fisiológico de variabilidad, adaptación y regulación eucariota que permite la generación de gran multitud de proteínas a partir de un único gen, mediante el procesamiento diferencial del pre-ARNm [38]. Este proceso se produce a través de dos reacciones de transesterificación, siguiendo un modelo cíclico dependiente de ATP, llevado a cabo por diversas ribonucleoproteínas (p.ej.: RNU1, RNU2 y RNU6) que cortan los intrones (secuencias localizadas entre los exones del pre-ARNm) a eliminar y empalman los extremos de los exones (secuencias presentes en el pre-ARNm que se mantienen en el ARNm maduro), liberando los intrones en forma de lazo (*lariat*) [39, 40]. Variaciones en este proceso (***splicing* alternativo**) a través de distintos eventos de *splicing* (**Figura 4**) permiten a las células eucariotas generar múltiples transcritos a partir de una misma secuencia genómica, contribuyendo, entre otros procesos, a la diferenciación celular y a la respuesta a múltiples condiciones ambientales [41, 42].

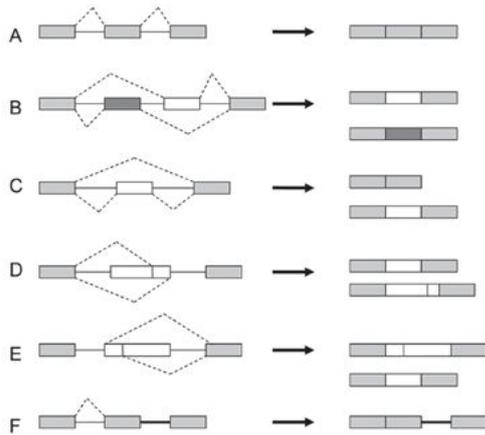


Figura 4. Principales tipos de eventos de splicing. En la parte izquierda se muestra el pre-ARNm previo al proceso de *splicing*, constituido por exones (rectángulos) e intrones implicados (líneas continuas), y a la derecha el producto final del proceso de *splicing*. Los eventos mostrados son: **A)** *Splicing* constitutivo, **B)** exones mutuamente excluyentes, **C)** casete exónico alternativo, **D)** sitio de *splicing* 3' alternativo, **E)** sitio de *splicing* 5' alternativo, **F)** retención intrónica. Editada a partir de [43].

Este proceso es catalizado por la maquinaria de *splicing*, compuesto por el *spliceosoma* (complejo multiproteico encargado del proceso de corte y empalme del pre-ARNm) y **factores de *splicing*** asociados. Este complejo se encuentra formado por partículas de ribonucleoproteínas nucleares pequeñas (snRNPs) y entre 50 a 100 polipéptidos, muchos de los cuales no se encuentran asociados con snRNPs [44], siendo considerado una ribozima debido a que presenta ARN en el centro catalítico [40]. En mamíferos, se distinguen dos tipos de *spliceosoma*: el ***spliceosoma* mayor y el menor**. El *spliceosoma* mayor o principal contiene 5 snRNPs (RNU1, RNU2, RNU4, RNU5 y RNU6) y participa en el *splicing* del 99% de los genes. Con respecto al *spliceosoma* menor, este se encuentra formado por 4 snRNPs (RNU11, RNU12, RNU4atac y RNU6atac), procesando el 1% restante de los pre-ARNm [40].

El proceso de *splicing* puede ser regulado tanto por los elementos que conforman el *spliceosoma* así como por proteínas de unión al pre-ARNm denominadas **factores de *splicing***, entre las cuales destacan las proteínas ricas en serina/arginina (proteínas SR) y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRNPs), cuya función principal es participar en el corte y empalme de intrones y exones en el pre-ARNm [40], gracias al reconocimiento de secuencias presentes en el transcrito inmaduro [ESE (promotor exónico de *splicing*; *exonic splicing enhancer*), ISE (promotor intrónico de *splicing*; *intronic splicing enhancer*), ESS (silenciador exónico de *splicing*; *exonic splicing silencer*) e ISS (silenciador intrónico de *splicing*; *intronic splicing silencer*), secuencia rica en polipirimidina, sitio de *splicing* 5' (5' ss; 5' *splicing site*), sitio de *splicing* 3' (3' ss; 3' *splicing site*) y centro de ramificación (BP; *branch point*)] (**Figura 5**) [45]. De este modo, la propia función de la proteína de unión a ARN vendrá condicionada tanto por su naturaleza como por la de la secuencia del pre-ARNm con la que interaccione, actuando

como inhibidora o potenciadora del proceso de *splicing*. A su vez, los factores de *splicing* pueden interactuar con el propio *spliceosoma* a través de las snRNPs [40].

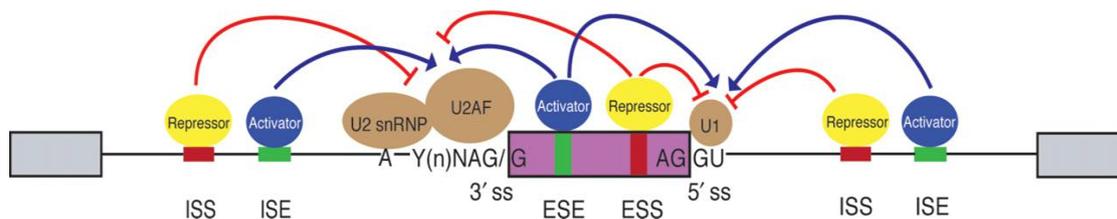


Figura 5. Esquema de las secuencias reguladoras del proceso de *splicing* presentes en el pre-ARNm. Las proteínas represoras se unen a secuencias ISS y ESS mientras que las activadoras se unen a secuencias ISE y ESE, modulando la actividad de diversos complejos ribonucleoproteicos de unión al pre-ARNm. Las flechas azules indican activación de proteínas, mientras que las líneas rojas indican inhibición [45]. ISS, *intronic splicing silencer* (silenciador intrónico de *splicing*); ISE, *intronic splicing enhancer* (potenciador intrónico de *splicing*); 3' ss, 3' *splicing site* (sitio de *splicing* 3'); ESE, *exonic splicing enhancer* (potenciador exónico de *splicing*); ESS, *exonic splicing silencer* (silenciador exónico de *splicing*); 5' ss, 5' *splicing site* (sitio de *splicing* 5').

En este sentido, se ha demostrado que el desarrollo y progresión del CaP puede verse influenciado por desregulaciones en ciertos factores de *splicing*, como SRRM4 (promueve el proceso de trans-diferenciación neuroendocrina del CaP) [32], SFPQ/PSF (participa en el aumento de la expresión de *AR* y *AR-v7*) [46], PRPF8 (regula la función del *AR* mediante una interacción directa con este a través de un dominio de exportación al núcleo) [47], KHDRBS1/SAM68 (promueve la proliferación del CaP y la resistencia a agentes citotóxicos) [48] y U2AF2 (interviene en el *splicing* del *AR* promoviendo la generación de la variante *AR-v7*) [49], entre otros.

Por lo tanto, aunque se ha demostrado la presencia de variantes aberrantes, así como la alteración del equilibrio entre ciertas variantes de *splicing* alternativo y la desregulación de la expresión de algunos factores de *splicing* en CaP, se desconoce si la maquinaria de *splicing* [*spliceosoma* y factores asociados (factores de *splicing*)] están alterados en su conjunto en el CaP. En base a esto, la **hipótesis** que se plantea en el presente proyecto es que **elementos reguladores del proceso de *splicing* podrían encontrarse desregulados en CaP, pudiendo constituir nuevas dianas terapéuticas o biomarcadores útiles para el tratamiento/diagnóstico/pronóstico de esta patología tumoral.**

Objetivos

En base lo expuesto anteriormente, se plantea como **objetivo general** el análisis de la desregulación de la maquinaria de *splicing* en CaP, así como el papel fisiopatológico que dicha desregulación podría ejercer en esta patología. Además, se plantearon los siguientes **objetivos secundarios**: **1)** Identificar los mecanismos moleculares subyacentes a la desregulación de la maquinaria de *splicing* en CaP mediante el estudio de rutas de señalización y variantes de *splicing* relevantes en el desarrollo y/o agresividad de esta patología tumoral; **2)** Estudiar el posible impacto que pudiera ejercer la modulación de ciertos elementos de la maquinaria de *splicing* en la respuesta celular a la enzalutamida, fármaco usado para tratar el CPRC.

Materiales y Métodos

Muestras derivadas de pacientes

El presente estudio fue llevado a cabo conforme a los criterios incluidos en la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba. Igualmente, se obtuvo un consentimiento informado de cada paciente para la utilización de las muestras obtenidas mediante cirugía e incluidas en el estudio, en base a los requerimientos indicados por el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía. En concreto, se utilizaron dos cohortes de muestras de CaP con diferente agresividad, obtenidas según práctica clínica:

- 1) cohorte de muestras de tejido prostático ($n=168$) fijadas en formaldehído y embebidas en parafina procedentes de prostatectomías realizadas a pacientes con CaP poco agresivo, en la que se incluyen muestras tumorales ($n=84$) y muestras pareadas correspondientes al tejido adyacente no tumoral ($n=84$) (*Anexo 1*);
- 2) cohorte de muestras de tejido prostático ($n=42$) constituida por muestras tumorales de pacientes con CaP agresivo (PSA > 20,0 y/o resultado de tacto rectal positivo) obtenidas mediante una biopsia prostática por punción con aguja gruesa. Este método no permite la obtención de tejido adyacente no tumoral (*Anexo 2*).

A su vez, se obtuvieron datos clínicos relevantes de los pacientes incluidos en ambas cohortes (grado de Gleason, estadificación, invasión perineural, invasión linfovascular, presencia de metástasis, desarrollo de recidiva bioquímica) (*Anexos 1 y 2*).

Líneas celulares

Se usaron líneas celulares derivadas de próstata normal (PNT2) y tumoral (22Rv1, LNCaP, DU145 y PC-3) (*American Type Culture Collection*, ATCC; Manassas, US), previamente validadas mediante análisis de STRs (GenePrint® 10 System; Promega, Madison, US). Estas líneas celulares fueron cultivadas siguiendo las indicaciones proporcionadas por ATCC. Concretamente, las líneas celulares se cultivaron en botellas de fondo plano de 25 cm², con medio *Roswell Park Memorial Institute* 1640 (RPMI 1640; Lonza, Basel, CH) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS; Merck KGaA, Darmstadt, DE), L-glutamina 2 mM (Biowest, Nuaillé, FR) y 0,2% de

antibiótico/antimicótico (Gentamicina/Anfotericina B; Thermo Fisher Scientific, Waltham, US). Se refrescó el medio cada 2-3 días aproximadamente y se realizaron pases celulares una vez alcanzado un 80% de confluencia. Para ello, se añadieron 2 mL de tampón fosfato salino (PBS; Merck KGaA) tras retirar el medio, con el objetivo de eliminar los restos celulares y los inhibidores de proteasas presentes en el FBS. Posteriormente, se retiró el PBS y se añadieron 2,5 mL de tripsina-EDTA (Merck KGaA), para eliminar las uniones intercelulares y célula-matriz. Tras ~5 minutos de incubación a 37°C, se inactivó la tripsina añadiendo 2,5 mL de medio suplementado. Posteriormente, se recogió el volumen de la botella en tubos de ensayo roscados de fondo cónico de 10 mL (J. D. Catalán, Madrid, ES) y se centrifugó durante 5 minutos a 1.500g. Tras finalizar la centrifugación, se eliminó el sobrenadante, se resuspendió el pellet en 1 mL de medio suplementado y, posteriormente, se añadió el volumen de medio completo necesario para obtener una suspensión celular homogénea, en función del tamaño del *pellet*. Para finalizar, se procedió al conteo de células, utilizando para ello una cámara de recuento Neubauer (Auxilab, Beriáin, ES) y el compuesto azul tripán (Merck KGaA), destinando 300.000 células para mantenimiento y un número de células determinado para cada uno de los ensayos a realizar.

Las células se mantuvieron en un ambiente humidificado, a 37°C / 5% de CO₂, bajo condiciones de esterilidad, en el interior de un incubador (modelo 3543; Thermo Fisher Scientific). Además, toda actividad que implicara el uso de células se llevó a cabo en una sala de cultivos en condiciones de esterilidad. Las líneas celulares se analizaron periódicamente mediante PCR para descartar contaminaciones por micoplasma, como se ha descrito previamente [50].

Extracción de ARN de líneas celulares

El ARN total fue extraído mediante el método basado en *Trizol TRI Reagent* (Merck KGaA). Para ello, se sembraron 400.000 células en placas de 6 pocillos. Una vez alcanzado un 80% de confluencia, se retiró el medio y se lavó con 1 mL de PBS. Tras su retirada, se añadieron 600 µL de Trizol que fue recogido junto con las células del pocillo en un tubo eppendorf libre de ARNasas (Thermo Fisher Scientific). Posteriormente, se añadieron 120 µL de cloroformo (Merck KGaA, Darmstadt, DE) y se mezcló de manera manual por inversión de los tubos. Las muestras se incubaron 2 minutos a temperatura

ambiente y se centrifugaron durante 15 minutos a 17.000g y a 4°C. La fase acuosa, donde se encontraba el ARN, se transfirió a un nuevo tubo eppendorf libre de ARNasas y se le añadieron 500 µL de isopropanol (Merck KGaA) y 1 µL de glucógeno (Merck KGaA) para facilitar su precipitación y visibilidad. Tras mezclarlo de nuevo por inversión, se centrifugaron 10 minutos a 17.000g y 4°C. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con etanol al 75% frío (PanReac AppliChem, Barcelona, ES). A continuación, se centrifugaron las muestras 5 minutos a 13.000g y 4°C, se eliminó el sobrenadante y el *pellet* se dejó secar a temperatura ambiente. Posteriormente, el *pellet* fue tratado con ADNasa (kit *RQ1 RNase-Free DNase*; Promega) durante 30 minutos a 37°C para eliminar los restos de ADN. Para detener la reacción de la enzima, se añadió a cada muestra 1 µL de la solución de *stop* (incluida en el kit comercial) y se incubaron durante 10 minutos a 65°C. Finalmente, tanto la concentración de ARN total como su pureza, fueron estimadas con el espectrofotómetro *NanoDrop One* (Thermo Fisher Scientific).

Extracción de ARN de muestras en parafina (cohorte 1)

El ARN total de las muestras embebidas en parafina fue extraído usando el sistema Maxwell® 16 Instrument y el kit *Maxwell® 16 LEV RNA FFPE Kit* (Promega), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. En primer lugar, se añadieron 300 µL de aceite mineral (incluido en el kit comercial) a los tubos eppendorf con las muestras (7-8 secciones de 5 µm previamente cortadas y congeladas inmediatamente a -80°C) y se incubaron a 80°C durante 2 minutos. Tras esto, se preparó una *Master Mix* (composición indicada en la **Tabla 1**), se añadieron 250 µL de esta solución a cada eppendorf y se centrifugaron a 10.000g durante 20 segundos.

Reactivo	Volumen (µL)
<i>Lysis buffer</i>	224
Proteinasa K	25
Colorante azul	1
Total	250

Tabla 1. Componentes de la mezcla de lisis para muestras embebidas en parafina. Se indica el volumen para cada muestra.

Posteriormente, se incubaron a 56°C durante 15 minutos, seguido de 1 hora a 80°C. Tras 15 minutos a temperatura ambiente, se añadieron 50 µL de una solución con

ADNasa (componentes indicados en la **Tabla 2** e incluidos en el kit comercial) a la fase acuosa de los tubos eppendorf, mezclando mecánicamente.

Reactivo	Volumen (µL)
MnCl ₂ (0,09 M)	26
<i>DNase buffer</i>	14
ADNasa I	10
Total	50

Tabla 2. Componentes de la mezcla de reacción de la ADNasa I (protocolo para muestras embebidas en parafina). Se indica el volumen para cada muestra.

Seguidamente, se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 2 minutos a 21.000g, transfiriendo la fase acuosa al cartucho de carga de la *Maxwell® 16 Instrument*, configurando el instrumento según instrucciones del fabricante. Finalmente, tanto la concentración de ARN total que había en cada muestra, como su pureza, fueron medidas mediante el uso del espectrofotómetro *NanoDrop One*.

Extracción de ARN de muestras procedentes de biopsias (cohorte 2)

El ARN total de las muestras procedentes de biopsias fue extraído usando el kit comercial *AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kit* (Qiagen, Madrid, España), siguiendo las instrucciones del fabricante. Así, las muestras se lisaron y homogenizaron con *Buffer RLT*, que inactiva las ADNasas, ARNasas y proteasas, asegurando el correcto aislamiento de ADN, ARN y proteínas. El lisado se pasó a través de una columna de centrifugación *All Prep DNA*, reteniendo específicamente el ADNg. Para la extracción de ARN, se añadió etanol al resto del lisado no retenido y se pasó a través de la columna *RNeasy*. Finalmente, el ARN se eluyó con agua libre de ARNasa y tanto la concentración de ARN total que había en cada muestra, como su pureza, fueron medidas mediante el uso del espectrofotómetro *NanoDrop One*.

Retrotranscripción de ARN a ADNc

Tras la extracción de las muestras de ARN total, se utilizó 1 μg del mismo para la retrotranscripción, usando el kit *RT RevertAid cDNA First Strand Synthesis* (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Para cada muestra, se alcanzó un volumen final de 11 μL a partir de 1 μg de ARN y H_2O libre de ARNasas. Tras ello, se añadió 1 μL de cebadores aleatorios (*random primers*). Posteriormente, se incubó la mezcla durante 5 minutos a 65°C (temperatura de hibridación de los cebadores con las moléculas de ARN) y se colocó en hielo. Tras esto, se añadieron 8 μL de la solución indicada en la **Tabla 3**:

Reactivo	Volumen (μL)
<i>Reaction buffer</i>	4
dNTP mix	2
Inhibidor ARNasa (<i>Ribolock</i>)	1
Transcriptasa inversa (<i>RevertAid</i>)	1
Total	8

Tabla 3. Componentes de la mezcla para la retrotranscripción de ARN total a ADNc. Se indica el volumen para cada muestra.

Esta mezcla se incubó una hora a 42°C (temperatura de acción óptima de la retrotranscriptasa) y, para finalizar la reacción, 5 minutos a 70°C (temperatura a la cual la enzima se desnaturaliza), obteniendo finalmente el ADNc, el cual fue utilizado para medir el nivel de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR)

La PCR cuantitativa a tiempo real o qPCR se llevó a cabo usando la *Brilliant III SYBR Green Master Mix* (Bio-Rad Laboratories). Esta *Master Mix* incluye el fluorocromo *SYBR Green*, la polimerasa de ADN, dNTPs y el *buffer* de reacción. La reacción se produjo en el termociclador *Stratagene Mx3000p* (Agilent, Santa Clara, US). Como control negativo, se usaron pocillos que contenían agua en vez de muestra. Los componentes necesarios para llevar a cabo cada reacción de qPCR por pocillo se muestran en la **Tabla 4**.

Reactivo	Volumen (μL)
<i>Brilliant III SYBR Green Master Mix</i>	10
Cebador sentido (10 μM)	0,3
Cebador antisentido (10 μM)	0,3
H ₂ O (libre de ARNasa)	8,4
ADNc	1
Total	20

Tabla 4. Componentes de la reacción de PCR cuantitativa (qPCR). Se indica el volumen para cada reacción.

Esta mezcla se añadió a placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific), se centrifugó y se sometió al siguiente perfil de termociclación:

Proceso	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo (segundos)
(1 ciclo) Desnaturalización inicial	95	180
(40 ciclos)		
Desnaturalización	95	20
Anillamiento	61	20
Elongación	61	20
(1 ciclo) Extensión final	72	30
(1 ciclo) Disociación (<i>melting</i>)	55-95	Cada 30

Tabla 5. Perfil térmico usado para la PCR cuantitativa (qPCR).

La secuencia de cada uno de los cebadores específicos para los genes/variantes génicas de interés seleccionados para el estudio de la agresividad del CaP y diseñados por el grupo se encuentra indicada en la **Tabla 6**. Estos cebadores se han diseñado siguiendo un protocolo descrito previamente por nuestro grupo [52-54]. Para ello, se utilizaron las herramientas online *Primer-BLAST* (*BLAST*: Basic Local Alignment Search Tool) y *BLASTn* para determinar la especificidad de la pareja de cebadores diseñada por medio del software *Primer3* [55]. Posteriormente, la compañía *Integrated DNA Technologies* (IDT, Madrid, ES) sintetizó estos cebadores y se validaron por PCR convencional usando la enzima *Dream Taq DNA Polymerase* (Thermo Fisher Scientific). Tras esto, la compañía STAB VIDA (Lisboa, PT) secuenció el producto de PCR y el resultado de la

secuenciación se analizó con el programa informático *Chromas* (versión 2.6.5; Technelysium Pty Ltd, Brisbane, AU).

Gen	Número de accesión (GenBank)	Secuencia del cebador (sentido)	Secuencia del cebador (antisentido)	Tamaño amplicón (pb)
<i>AR</i>	NM_000044.4	GCAGGAAGCAGTATCCGAAG	GTTGTCAGAAATGGTCGAAGTG	112
<i>AR-v7</i>	NM_001348061.1	CAGGGATGACTCTGGGAAAA	TGAGGCAAGTCAGCCTTTCT	87
<i>CASP2</i>	NM_032982.4	AGCTGGCATATAGGTTGCAGTC	ATCCCCTCCAGAGCGAAAT	104
<i>CASP2-S</i>	NM_001224.4	CACCTCCTTCTGTTCACTGCT	ATCCTGCGTGGTTCTTTCC	92
<i>XBPI-U</i>	NM_005080.3	CGCAGCACTCAGACTACGTG	CTGGGTCCAAGTTGTCCAGA	147
<i>XBPI-S</i>	NM_001079539.1	TGGATGCCCTGGTTGCT	CACCTGCTGCGGACTCA	87
<i>SSTR5</i>	NM_001053.3	CTGGTGTTCGCGGATGTT	GAAGCTCTGGCGGAAGTTGT	183
<i>sst5TMD4</i>	NM_001172560.1	TACCTGCAACCGTCTGCC	AGCCTGGGCCTTTCTCCT	98
<i>GHRL</i>	NM_016362.3	CACCAGAGAGTCCAGCAGAGA	CCGGACTTCCAGTTCATC	215
<i>In1-Ghrelina</i>	GU942497.1	TCTGGGCTTCAGTCTTCTCC	G TTCATCCTTGCCCCTTCT	215
<i>ACTB</i>	NM_001101	ACTCTTCCAGCCTTCCTCCT	CAGTGATCTCCTTCTGCATCCT	176

Tabla 6. Listado de cebadores de genes medidos por qPCR. Se indica la secuencia de la pareja de cebadores (sentido y antisentido) así como el tamaño del producto amplificado y el número de accesión a la base de datos GenBank para cada gen.

A su vez, los cebadores específicos para los genes medidos en el *array* (ver siguiente apartado) se encuentran indicados en el *Anexo 3*, los cuales codifican para componentes del *spliceosoma* mayor y menor, así como factores de *splicing* asociados (*Anexo 4*).

Asimismo, se utilizaron otros cebadores específicos para genes/variantes génicas de interés cuya secuencia se obtuvo a partir de diversos estudios previamente publicados por otros grupos. Concretamente, se usaron los cebadores específicos para *KLF6*, *KLF6-SV1* [56], *PKM1*, *PKM2* [57], *REST* y *REST4* [58].

Array de *spliceosoma* y factores de *splicing*

Para el análisis de expresión de los componentes del *spliceosoma* mayor y menor, así como factores de *splicing*, se utilizó la placa *Dynamic Array M48.48* (Fluidigm Corporation, San Francisco, US), permitiendo obtener un análisis de expresión mediante *arrays* de qPCR, basándose en una tecnología de microfluídica. Todos los pasos

realizados se llevaron a cabo siguiendo las instrucciones y consejos de la casa comercial Fluidigm.

Tras la retrotranscripción de las muestras (tal y como se ha indicado arriba), fue necesario desarrollar un protocolo de pre-amplificación para así incrementar el número de copias del ADNc diana. Para este proceso, se usó la *PreAmp Master Mix* (Fluidigm Corporation), junto con H₂O libre de ARNasa y una mezcla de cebadores (*Tabla 7*), obtenida a partir de la suma de 1 µL de todos los cebadores específicos de los genes de interés, y completando esta solución hasta 200 µL con *DNA Suspension Buffer* (Teknova, York, UK), alcanzando una concentración final de 500 nM de cada cebador.

Reactivo	Volumen (µL)
<i>PreAmp Master Mix</i>	52,8
Mezcla de cebadores	26,4
H ₂ O (libre de ARNasa)	118,8
Total	198

Tabla 7. Componentes de la mezcla de reacción de pre-amplificación. Se indica el volumen para cada muestra.

Una vez obtenida la mezcla de reacción, se añadieron 3,75 µL de esta a 1,25 µL de cada una de las muestras humanas en una placa de 96 pocillos. Posteriormente, se utilizó el termociclador *Bio-Rad T100*, con el perfil de termociclación indicado en la *Tabla 8*.

Proceso	Temperatura (°C)	Tiempo (segundos)
(1 ciclo) Desnaturalización	95	120
(14 ciclos)		
Desnaturalización	94	25
Anillamiento y elongación	60	240
(1 ciclo) Conservación	4	∞

Tabla 8. Perfil térmico usado para la reacción de pre-amplificación.

Con el objetivo de eliminar el exceso de cebadores e impedir que interfieran en pasos posteriores, se procedió a utilizar la enzima exonucleasa I (New England Biolabs, Barcelona, ES), usando los reactivos indicados en la *Tabla 9*.

Reactivo	Volumen (μL)
<i>Reaction Buffer</i> (Exonucleasa I)	12
Exonucleasa I (20 U/ μL)	24
H ₂ O (libre de ARNasa)	84
Total	120

Tabla 9. Componentes de la mezcla de reacción de la exonucleasa I. Se indica el volumen para cada muestra.

Tras el proceso de pre-amplificación, se añadieron 2 μL de la mezcla de reacción de exonucleasa I (**Tabla 9**), incubándose posteriormente a 37°C (temperatura óptima de la enzima) durante 30 minutos. A continuación, se incrementó la temperatura a 80°C durante 15 minutos con el objetivo de inactivar la enzima. Finalmente, se añadieron 18 μL de *Buffer TE IX* (Thermo Fisher Scientific) a pH 8,3 a cada uno de los productos finales.

La preparación de la placa *Dynamic Array M48.48* consistió en inyectar un líquido control de carácter hidrofóbico en cada uno de los acumuladores de la placa, usando para ello el software *Prime (113x)* del *IFC Controller MX* (Fluidigm Corporation). Posteriormente, se añadieron 2,7 μL de las muestras pre-amplificadas y tratadas con exonucleasa I a cada uno de los pocillos, seguido de 3,3 μL de una mezcla de 2,5 μL de *SsoFast EvaGreen Supermix with Low ROX* (Bio-Rad Laboratories) y 25 μL de *DNA Binding Dye Sample Loading Reagent 20X* (Fluidigm Corporation), previamente homogeneizada. Tras esto, se volvió a introducir la placa en el sistema *IFC Controller MX*, usando esta vez el software *Load Mix (113x)*. Finalmente, se llevó a cabo el *array* de qPCR en el sistema de *Biomark HD* (Fluidigm Corporation).

Inmunohistoquímica (IHQ)

El análisis del nivel de proteína de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 se llevó a cabo por medio de la determinación de la intensidad de tinción de la proteína tras realizar una inmunohistoquímica (IHQ). Para ello, se utilizaron muestras de próstata embebidas en parafina procedentes de la segunda cohorte, compuesta por muestras de pacientes con CaP más agresivo (grado Gleason ≥ 7). Además, se incluyeron en el análisis muestras derivadas de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP; $n=7$), neoplasia

intraepitelial prostática (PIN; $n=6$) y CaP no significativo (grado de Gleason= 6; $n=5$) como muestras control y CaP de baja agresividad tumoral, respectivamente. Todas las muestras utilizadas fueron obtenidas por medio de biopsias prostáticas por punción con aguja gruesa. En concreto, se desparafinaron las muestras y se incubaron en presencia de un anticuerpo primario contra la proteína de interés [SNRNP200 (ab241589; Abcam, Londres, GB) SRRM1 (HPA049941; Merck KGaA) o SRSF3 (ab198291; Abcam)] durante al menos 12h a 4°C a una dilución 1:250. Tras esto, se las muestras se incubaron en presencia de un anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano (#7074; Cell Signaling Technology). Finalmente, se añadió 3,39-diaminobenzidina (34065; Thermo Fisher Scientific) y se llevó a cabo un contraste con hematoxilina (HHS16; Merck KGaA). Las tinciones fueron evaluadas por dos patólogos del Servicio de Anatomía-Patológica del Hospital Universitario Reina Sofía de forma independiente, asignando un valor bajo, moderado e alto a la intensidad de la tinción.

Transfección con siRNA

El silenciamiento específico de los genes *SNRNP200*, *SRSF3* y *SRRM1* se llevó a cabo mediante el método basado en *Lipofectamine RNAiMAX* (Thermo Fisher Scientific), usando *siRNA-SNRNP200* (124735; Thermo Fisher Scientific), *siRNA-SRSF3* (s12733; Thermo Fisher Scientific) y *siRNA-SRRM1* (s20018; Thermo Fisher Scientific), respectivamente. En concreto, se sembraron 500.000 células por pocillo en placas de 6 pocillos y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80%, momento en el cual se reemplazó el medio de cultivo de cada pocillo por 850 μ L del medio correspondiente, dependiendo de la línea celular, al 10% de FBS y 0% de antibiótico/antimicótico (Gentamicina/Anfotericina B). Posteriormente, se mezclaron 4,5 μ L de Lipofectamina con 75 μ L de Opti-MEM (11058-021; Thermo Fisher Scientific), a los que se añadió el siRNA correspondiente (100 nM) disuelto en 75 μ L de Opti-MEM. Las dos soluciones se mezclaron en un nuevo tubo, el cual se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron los 150 μ L de la nueva mezcla al pocillo con 850 μ L de medio y, tras 24h de incubación, se levantaron las células con 750 μ L de tripsina y se sembraron los diferentes experimentos. En paralelo, se realizó la transfección con el siRNA control o *scramble* (AM4611; Thermo Fisher Scientific) siguiendo el mismo procedimiento.

Proliferación celular

Para analizar la capacidad proliferativa de las líneas celulares usadas en este estudio se utilizó la técnica de *AlamarBlue*[®] (Bio-Rad Laboratories, Madrid, ES). Para ello, se siguió el protocolo indicado por el fabricante. En primer lugar, se sembraron 3.000 células por pocillo con medio RPMI al 10% FBS en placas de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific). Tras 24h, se reemplazó el medio por 90 μ L de medio sin suero, con el objetivo de sincronizar el ciclo celular. Tras 12h, se realizó la primera medida, para lo cual se añadió al medio 10 μ L de *AlamarBlue*. Tras 3h en el incubador, se midió la fluorescencia de los distintos pocillos a 590 nm tras excitar a 560 nm, para lo cual se utilizó el espectrofluorímetro del lector de placas *FlexStation 3* (Molecular Devices, Madrid, ES). Por último, se eliminó el *AlamarBlue* y se añadió medio completo al 5% FBS. Este proceso se repitió a las 24, 48 y 72 h. Los resultados se muestran como porcentaje de tasa de proliferación con respecto a las células control (*scramble*).

Ensayo de sensibilización a enzalutamida

Para determinar el papel de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en la respuesta al tratamiento con enzalutamida (#1613; Axon Medchem, Groninga, NL), se evaluó la capacidad proliferativa de las células de CaP. Para ello, las células se aclimataron durante 24h en medio RPMI 1640 sin rojo fenol (11835030; Thermo Fisher Scientific) suplementado con *charcoal-stripped* FBS (#A3382101; Thermo Fisher Scientific). Tras esto, se trataron con enzalutamida (10^{-6} M) y 5 α -dihidrotestosterona (DHT; 10^{-8} M; #D-073; Merck KGaA) (la concentración de estos compuestos se seleccionó en base a experimentos realizados previamente por otros grupos de investigación [25]). Se determinó la capacidad proliferativa de las células tras 24h de exposición del tratamiento mediante la técnica de *AlamarBlue* (tal y como se ha descrito en el epígrafe anterior). Los resultados se muestran como porcentaje de tasa de proliferación con respecto a las células control (*scramble*) tratadas con el vehículo [dimetilsulfóxido (DMSO; Carlo Erba, Sabadell, ES)].

Migración celular (*Wound healing assay*)

La capacidad de migración de las células se analizó mediante el ensayo de recuperación de la herida o *wound healing*, para el cual se sembraron 500.000 células por

pocillo en placas de 6 pocillos con medio suplementado al 10% FBS. Se retiró el medio y se sustituyó por medio al 0% FBS cuando el cultivo alcanzó la confluencia total (2 días), tras lo cual se creó una herida o estría en mitad de cada pocillo mediante el uso de una punta de micropipeta estéril de 100 µL. Tras esto, se realizó una microfotografía (4x) (AE2000; Nikon, Ámsterdam, NL) de las heridas a tiempo 0, además de otra tras 14h desde la creación de la herida. Los resultados se muestran como porcentaje de tasa de recuperación de la herida tras 12h de las células control (*scramble*).

Western blot

Para estudiar los cambios en los niveles proteicos en respuesta a los distintos silenciamientos (*SNRNP200*, *SRRMI*, *SRSF3*) se utilizó la técnica de *Western blot*. Para ello, se sembraron 200.000 células/pocillo en placas de 12 pocillos con medio suplementado con FBS al 10%. Tras dos días de incubación a 37°C, se reemplazó el medio por RPMI al 0% de FBS y, tras 3h, se retiró el medio y se añadió buffer SDS-DTT a 65°C para lisar las células, compuesto por 62,5 mM de Tris-HCl pH 7,6, 2% de SDS (7910; Merck KGaA), 20% de glicerol (17904; Merck KGaA), 100 mM de DTT (3870; Merck KGaA) y 0,005% de azul de bromofenol. Tras esto, se sonicaron las muestras 3 veces durante 10 segundos y se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Estas muestras fueron separadas por medio de una electroforesis tipo SDS-PAGE en gel de acrilamida al 12,5% (0311; VWR, Radnor, US). Tras esto, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Millipore, Billerica, US), usando para ello una configuración de transferencia húmeda (Bio-Rad Laboratories). Después, la membrana se tiñó con rojo Ponceau (P3504; Merck KGaA), se lavó con tampón TTBS [0,05% TWEEN® 20 (Merck KGaA) y buffer TBS] y se bloqueó con leche en polvo (T145.3; Carl Roth, Karlsruhe, DE) disuelta en TTBS. A continuación, se incubaron las membranas con los distintos anticuerpos primarios [p-AKT (#4060S; Cell Signaling Technology, Danvers, US), p-ERK (#4370S; Cell Signaling Technology), p-JNK (AF1205; R&D Systems, Minneapolis, US), AKT (#9272S; Cell Signaling Technology), ERK (sc-154; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, US), JNK (AF1387; R&D Systems)] durante 16h (a 4°C) a concentración 1:1000. Al día siguiente, la membrana se lavó de nuevo con TTBS y se añadió el anticuerpo secundario *anti-rabbit IgG* (#7074s, Cell Signaling Technology), a una concentración de 1:2000. Por último, la membrana se lavó con TTBS y se reveló, tras añadir *ClarityTM Western ECL Substrate* (Bio-Rad Laboratories), con el sistema de

detección de quimioluminiscencia *ImageQuant LAS4000* (GE Healthcare, Chicago, US). La cuantificación se realizó mediante un análisis densitométrico de las bandas por medio del software *ImageJ* [51], usando AKT, ERK y JNK para normalizar la cantidad de proteína de p-AKT, p-ERK y p-JNK, respectivamente.

Análisis estadístico

Los datos se analizaron con el programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software Inc, San Diego, US) o *IBM SPSS 25* (IBM, Armonk, US). Para determinar si dos grupos presentaban diferencias significativas en la media se utilizó la prueba estadística t-test o U de Mann Whitney, dependiendo de si los datos seguían una distribución normal o no (test de Kolmogorov-Smirnov), respectivamente. Por otro lado, se realizó una prueba ANOVA, seguido del test post-hoc Tukey, para comparar 3 grupos. Además, se ha llevado a cabo un escalado de los datos de expresión en muestras humanas mediante la conversión de Z-score. Finalmente, para observar correlaciones entre variables se llevó a cabo la prueba de Pearson o de Spearman, dependiendo de si las variables seguían una distribución normal o no, respectivamente. Los resultados están expresados como media \pm error estándar de la media (SEM). Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas entre grupos cuando el valor de p fue $< 0,05$ (*). Todos los ensayos con líneas celulares se realizaron con un $n \geq 3$ y, al menos, 2 réplicas técnicas.

Resultados

Análisis de la expresión de componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* en muestras de cáncer de próstata y tejido adyacente no tumoral

Los resultados del *array* de qPCR basado en microfluídica revelaron una desregulación global, tanto de los componentes del *spliceosoma* como de los factores de *splicing* asociados en muestras de CaP, comparado con tejido adyacente no tumoral (TA-NT). Concretamente, se observó una sobreexpresión de seis componentes del *spliceosoma* mayor (55%) y uno del menor (25%) al comparar tejido tumoral frente a TA-NT. Además, el nivel de expresión de 18 factores de *splicing* fue significativamente más elevado (67%), mientras que el de un factor fue significativamente más reducido (4%) al comparar tejido tumoral frente a TA-NT (**Figura 6**).

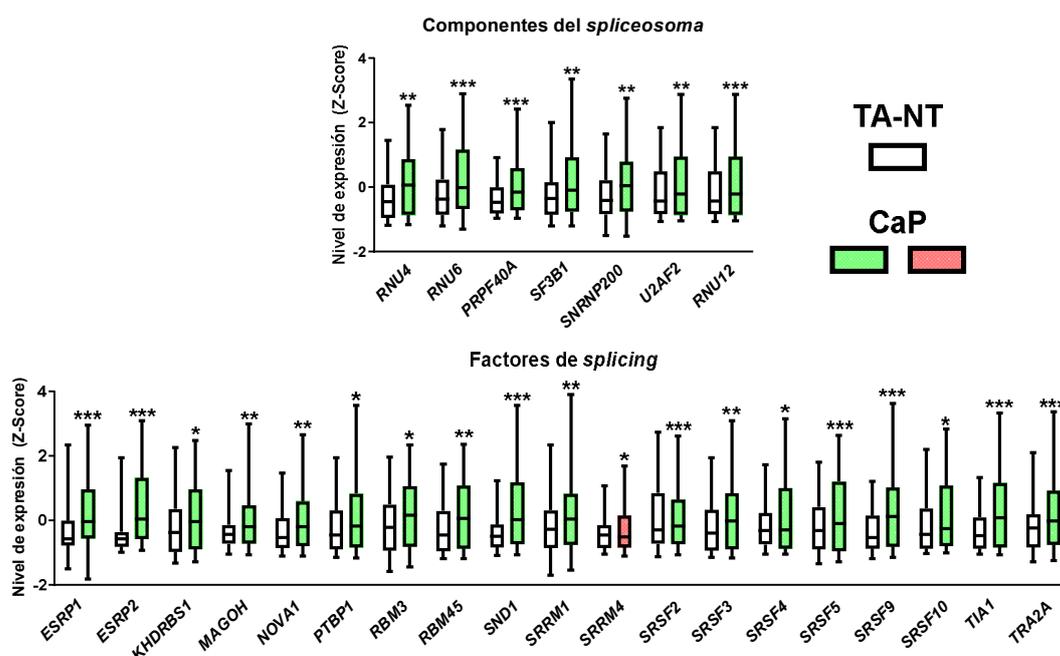


Figura 6. Niveles de expresión de la maquinaria de *splicing* en muestras de cáncer de próstata. Comparación de los niveles de ARNm de componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* entre muestras de CaP y tejido adyacente no tumoral (TA-NT) embebidas en parafina y derivadas de pacientes con CaP ($n=84$). El nivel de expresión fue determinado por medio de un *array* de qPCR basado en microfluídica. Los datos representan la media \pm SEM de los niveles de expresión ajustados por factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de *ACTB* y *GAPDH*) y estandarizados por *Z-score*. El color verde indica los cambios que reflejan sobreexpresión en las muestras tumorales frente a las TA-NT mientras que el rojo una menor expresión en muestra tumorales. Los asteriscos ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Además, un análisis bioinformático profundo mediante el algoritmo *Random Forest* permitió determinar una huella molecular asociada a componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* compuesta por los niveles de expresión de ciertos elementos de esta maquinaria (*SNRNP200*, *SRRM1*, *SRSF3*, *TIA1*, *SRSF10*, *U2AF2*, *SRSF9*, *SRRM4*, *SND1*, *ESRP1* y *KHDRBS1*) que era capaz de discriminar perfectamente entre muestras de CaP y TA-NT, obteniendo una curva ROC con AUC= 1 ($p < 0,0001$; **Figura 7a**), validándose posteriormente por medio de un análisis de validación cruzada (AUC= 0,83, $p < 0,0001$; **Figura 7b**).

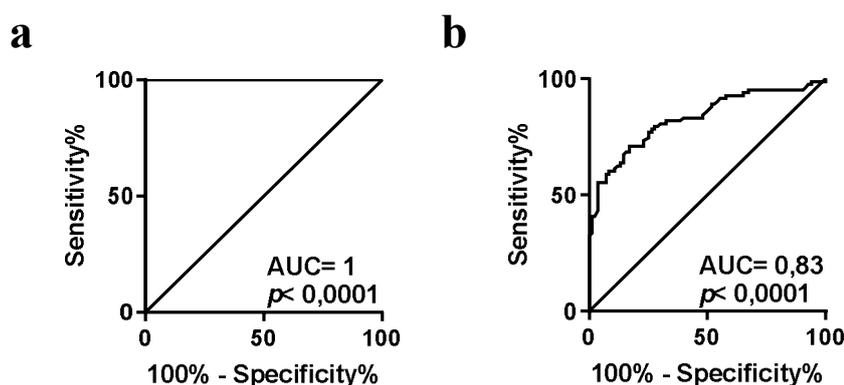


Figura 7. Capacidad diagnóstica de la maquinaria de *splicing* en cáncer de próstata. Curvas ROC de un subconjunto de componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* generados por el algoritmo *Random Forest* (a), seguido de un análisis de validación cruzada (b) para discriminar entre muestras de CaP y tejido adyacente no tumoral. Se muestran los datos procedentes de la cohorte de muestras de CaP y tejido adyacente no tumoral (TA-NT) embebidas en parafina y derivadas de pacientes con CaP ($n=84$). AUC, área bajo la curva.

Asociación y correlación de los niveles de expresión de componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* con parámetros clínicos de agresividad tumoral

Los niveles de expresión de un gran número de los elementos de la maquinaria de *splicing* desregulados (85%) se asociaban/correlacionaban positivamente con algún parámetro clínico de agresividad del CaP considerado en este estudio (grado Gleason [1], invasión perineural [59] o linfovascular [60] y estadificación [61]) (**Anexo 5**). En este sentido, cabe destacar que el nivel de expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* se asociaba/correlacionaba positivamente con todos los parámetros clínicos considerados en este estudio (**Figura 8**).

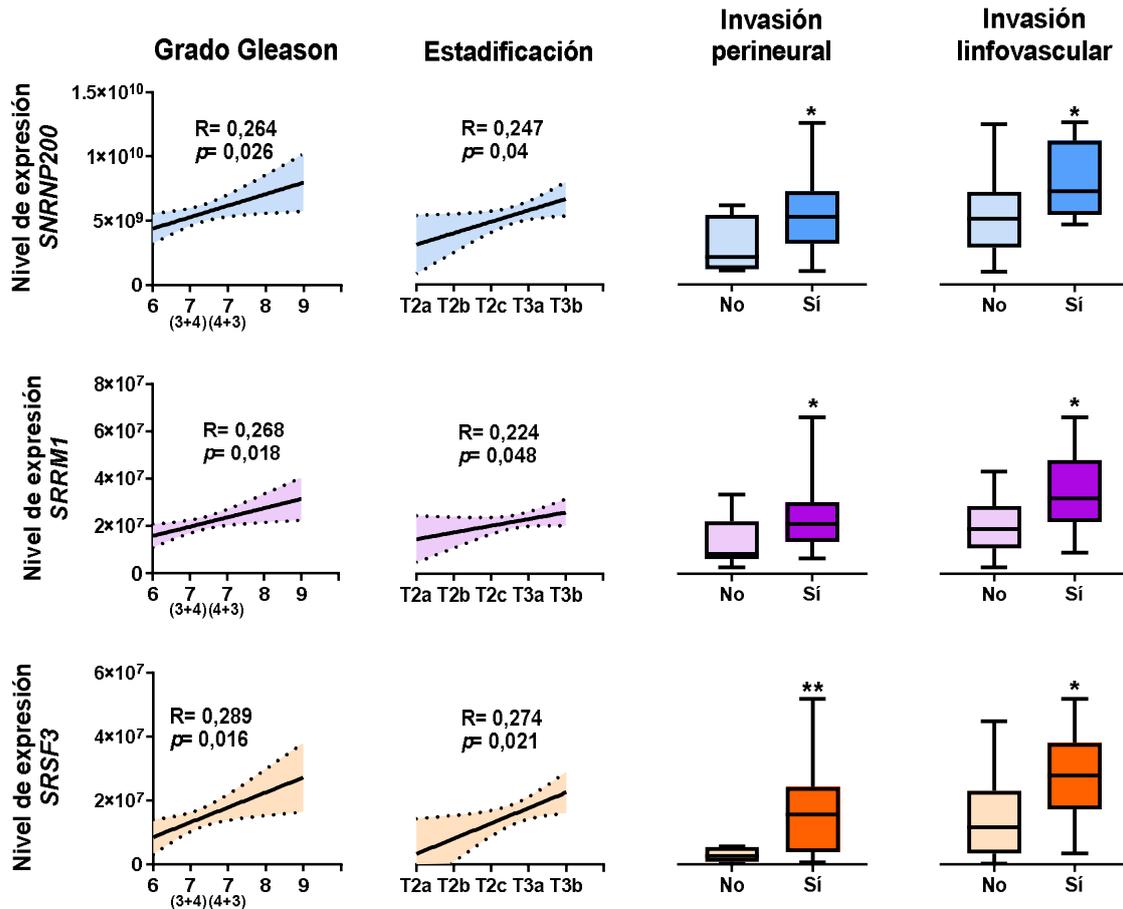


Figura 8. Asociaciones y correlaciones entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 con parámetros clínicos de agresividad en muestras de cáncer de próstata. Se muestran los datos procedentes de la cohorte de muestras de CaP y tejido adyacente no tumoral (TA-NT) embebidas en parafina y derivadas de pacientes con CaP ($n=84$). Las correlaciones están representadas como la media (línea continua) y el error (líneas punteadas) de los niveles de expresión. Los datos de las asociaciones están representados como la media \pm SEM de los niveles de expresión ajustados por factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de *ACTB* y *GAPDH*). Los asteriscos ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

A su vez, un incremento en el nivel de expresión de algunos de los elementos de la maquinaria de *splicing* estudiados se relacionó directamente con un peor pronóstico de la enfermedad debido a un aumento en el porcentaje de pacientes con recidiva bioquímica (definida como un incremento en los niveles plasmáticos de PSA tras una prostatectomía radical o radioterapia) [62] (*Anexo 6*), incluyendo a *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* (*Figura 9*).

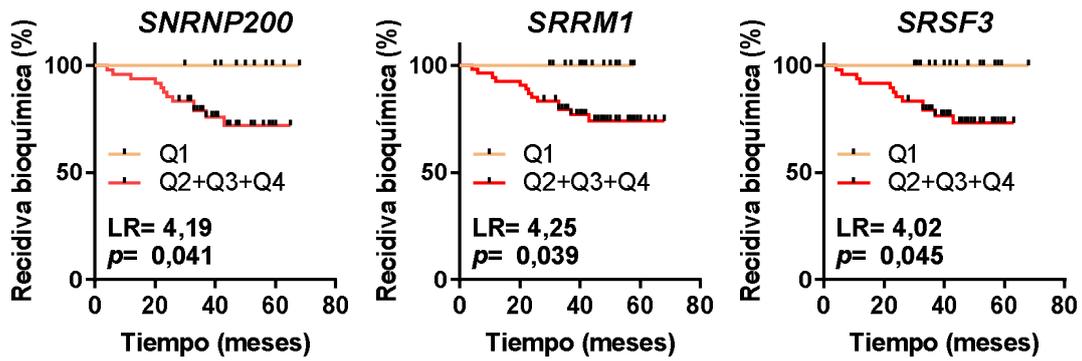


Figura 9. Asociación entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y el desarrollo de recidiva bioquímica en cáncer de próstata. Se muestran los datos procedentes de la cohorte de muestras de CaP y tejido adyacente no tumoral (TA-NT) embebidas en parafina y derivadas de pacientes con CaP ($n=67$), descartando aquellos pacientes que recibieron radioterapia adyuvante. Los datos fueron calculados por medio de la prueba de Mantel-Cox (LR). Los niveles de expresión fueron determinados por medio de un *array* de qPCR basado en microfluídica, ajustados por factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de *ACTB* y *GAPDH*).

En base a estos resultados, se profundizó en el estudio de la relación de estos tres elementos de la maquinaria de *splicing* (*SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3*), usando para ello una cohorte independiente de muestras de CaP de una mayor agresividad tumoral. De este modo, se observó una asociación positiva entre el nivel de expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* y la presencia de metástasis en el momento del diagnóstico (**Figura 10a**). Además, los niveles de expresión de *SNRNP200* y *SRSF3* presentaban una tendencia a correlacionar positivamente con el grado Gleason ($R= 0,308$ y $p= 0,053$; $R= 0,280$ y $p= 0,086$; respectivamente; **Figura 10b**).

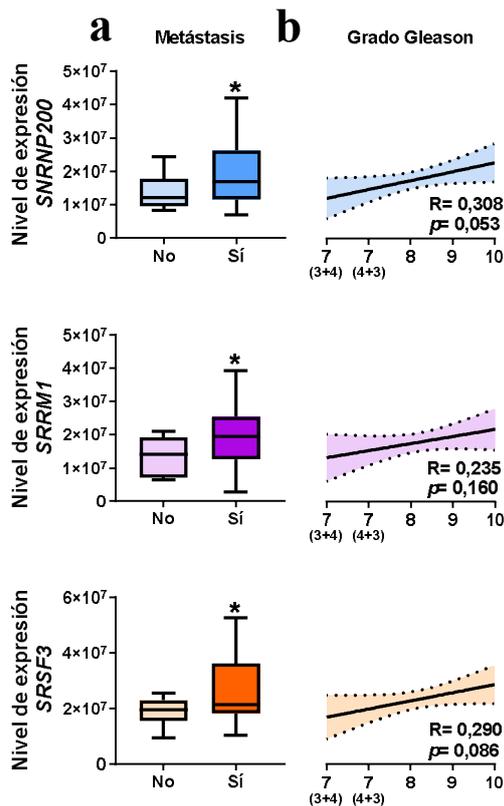


Figura 10. Asociación y correlación entre el nivel de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y parámetros clínicos de agresividad en una cohorte independiente de muestras de cáncer de próstata.

Los datos proceden de una cohorte de muestras de CaP altamente agresivo ($n=42$). a) Asociación entre el nivel de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 con la presencia de metástasis. Los datos representan la media \pm SEM de los niveles de expresión. b) Correlación entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y el grado Gleason asignado a las muestras. Las correlaciones están representadas como la media (línea continua) y el error (líneas punteadas) de los niveles de expresión. Los asteriscos ($*p < 0,05$) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Asimismo, el nivel de expresión de estos factores de *splicing* correlacionaba con la expresión de ciertos elementos moleculares relacionados con la agresividad tumoral, tales como el marcador de proliferación *MKI67* (*SNRNP200*: $R=0,448$ y $p=0,010$; *SRSF3*: $R=0,490$ y $p=0,005$) [63] (**Figura 11a**); el gen *KLK3* (*SRRM1*: $R=0,339$ y $p=0,040$; *SRSF3*: $R=0,340$ y $p=0,040$) (**Figura 11b**), el cual codifica para la proteína PSA (principal biomarcador para el diagnóstico de CaP) y cuyo nivel de expresión se relaciona positivamente con la agresividad tumoral [64]; y, de manera muy destacable, con la variante 7 del receptor de andrógenos, *AR-v7* (*SNRNP200*: $R=0,526$ y $p=0,008$; *SRRM1*: $R=0,418$ y $p=0,042$; *SRSF3*: $R=0,516$ y $p=0,009$) (**Figura 11c**), la cual se encuentra asociada directamente con el desarrollo [23] y progresión [24, 65] del fenotipo más agresivo de CaP, el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC). Curiosamente, aunque el nivel de expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* correlaciona positivamente

con el de *AR-v7*, no existe correlación alguna con el de la variante canónica, *AR* (*Figura 11d*).

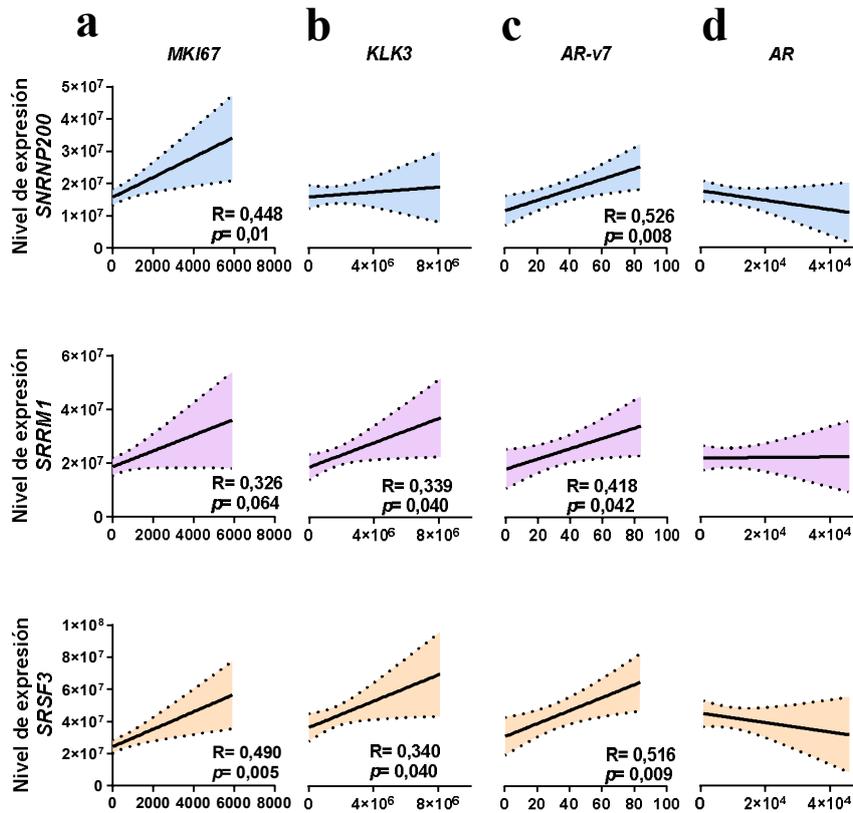


Figura 11. Correlación entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 con el de elementos moleculares de agresividad en una cohorte de muestras de cáncer de próstata muy agresivo. Los datos proceden de una cohorte de muestras de CaP altamente agresivo ($n=42$). Correlación entre los niveles de expresión de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 y el nivel de expresión de MKI67 (a), KLK3 (b), AR-v7 (c) y AR (d). Las correlaciones están representadas como la media (línea continua) y el error (líneas punteadas) de los niveles de expresión. Los niveles de expresión fueron determinados por medio de un *array* de qPCR basado en microfluídica, ajustados por factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de *ACTB* y *GAPDH*).

Determinación de los niveles de proteína de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 en muestras de CaP y su asociación con parámetros de agresividad tumoral

Análisis por inmunohistoquímica (IHQ) de muestras de CaP embebidas en parafina reveló que los niveles de proteína de SNRNP200, SRSF3 y SRRM1 eran mayores en comparación con muestras control procedentes de pacientes con hiperplasia benigna de próstata (HBP; inflamación de la próstata no relacionada con el desarrollo tumoral) o neoplasia intraepitelial prostática (PIN; “crecimiento no canceroso de las células que revisten las superficies internas y externas de la glándula prostática”) [66]. Concretamente, la tinción nuclear de SNRNP200 (*Figura 12a*) y SRRM1 (*Figura 12b*) fue significativamente mayor en muestras de CaP en comparación con muestras de HBP

o PIN, no encontrándose diferencias significativas con respecto a la tinción citoplásmica de SNRNP200 entre los distintos grupos, mientras que en el caso de SRRM1, no se detectó tinción en el citoplasma. Por otro lado, la tinción citoplásmica de SRSF3 fue significativamente mayor en muestras de CaP en comparación con muestras de HBP o PIN (*Figura 12c*), no observándose diferencias significativas en la tinción nuclear de SRSF3 al comparar los distintos grupos.

Finalmente, se observaron niveles más elevados de proteína de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 en muestras de CaP significativo (CaPSig) procedentes de la segunda cohorte de pacientes con CaP más agresivo (grado Gleason ≥ 7) (*Figura 12a-c*) con respecto a aquellas muestras de CaP indolente o no significativo (Gleason = 6). Además, en el caso de SRRM1 y SRSF3, se observó una tendencia a una asociación positiva con la presencia de metástasis ($p = 0,077$, $p = 0,067$, respectivamente) en el momento del diagnóstico (*Figura 12b-c*).

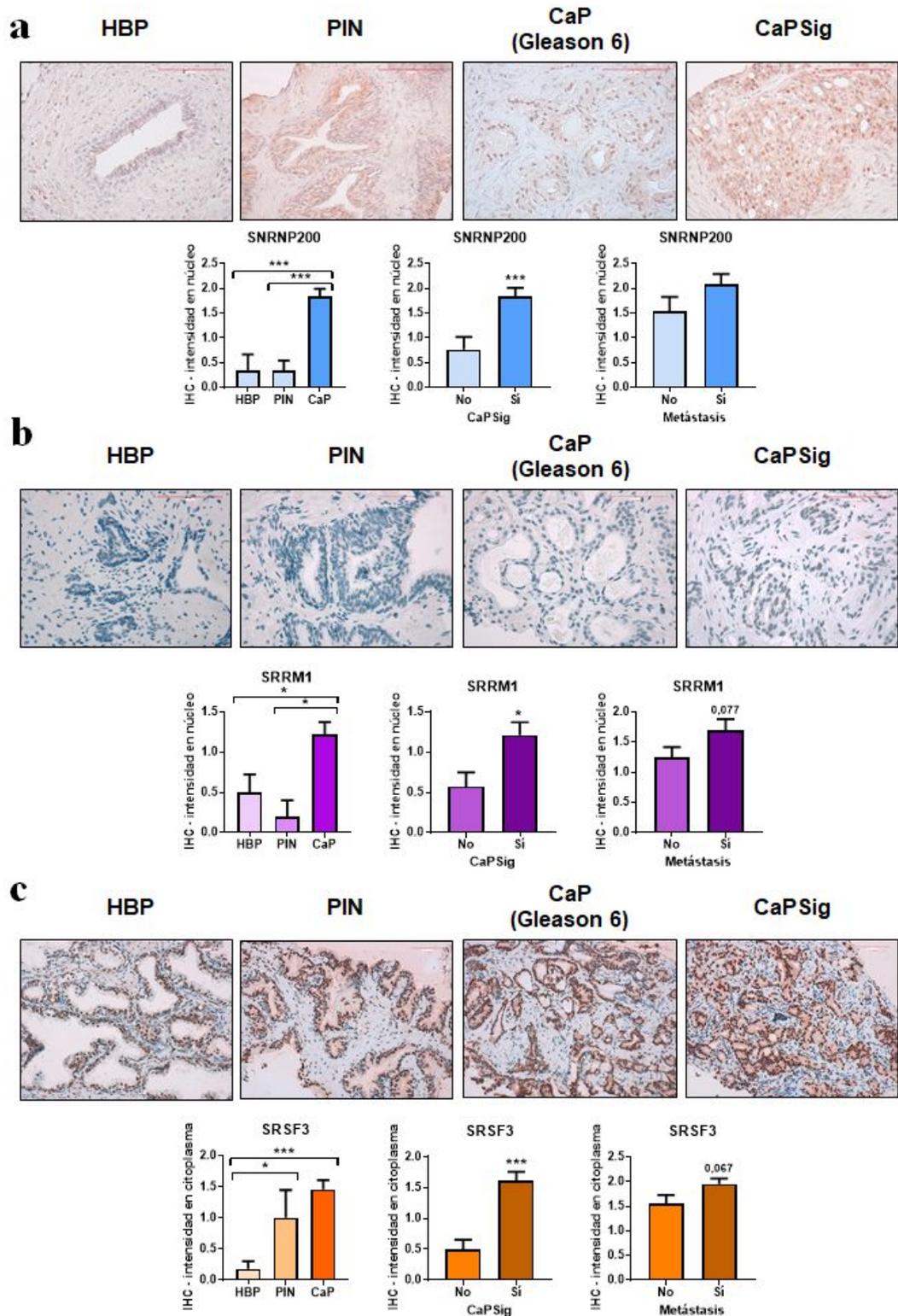


Figura 12. Determinación del nivel de proteína de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 en muestras de cáncer de próstata y asociación con parámetros clínicos de agresividad. Comparación de los niveles de proteína (panel superior izquierda) de SNRNP200 (a), SRRM1 (b) y SRSF3 (c) mediante la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) en una batería representativa de muestras de CaP ($n=47$), neoplasia intraepitelial prostática (PIN; $n=6$) e hiperplasia benigna de próstata (HBP; $n=7$) y su asociación con cáncer de próstata significativo (CaPSig; Gleason ≥ 7 ; $n=42$) (panel superior central) y la presencia de metástasis (panel superior derecha). En el panel inferior, se muestran imágenes representativas de HBP, PIN, CaP no significativo y CaPSig marcadas con anticuerpos anti-SNRNP200 (aumento 400x), -SRRM1 (aumento

400x) y -SRSF3 (aumento 200x). Las barras de escala indican 100 μm . Los datos representan la media \pm SEM de la tinción por IHQ en una escala desde baja (1) a alta (3) intensidad. Los asteriscos ($*p < 0,05$; $***p < 0,001$) indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Determinación de la expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en líneas celulares prostáticas

Por otra parte, se observó que *SRRM1* se encontraba sobreexpresado en todas las líneas celulares tumorales 22Rv1, LNCaP, DU145 y PC-3 con respecto a la línea celular derivada de próstata normal PNT2 (**Figura 13**). Igualmente, *SNRNP200* y *SRSF3* estaban sobreexpresados en todas las líneas tumorales al comparar con la línea derivada de próstata normal, a excepción de PC-3 (en el caso de *SNRNP200*) y LNCaP (en el caso de *SRSF3*) en donde esta sobreexpresión no fue estadísticamente significativa (**Figura 13**).

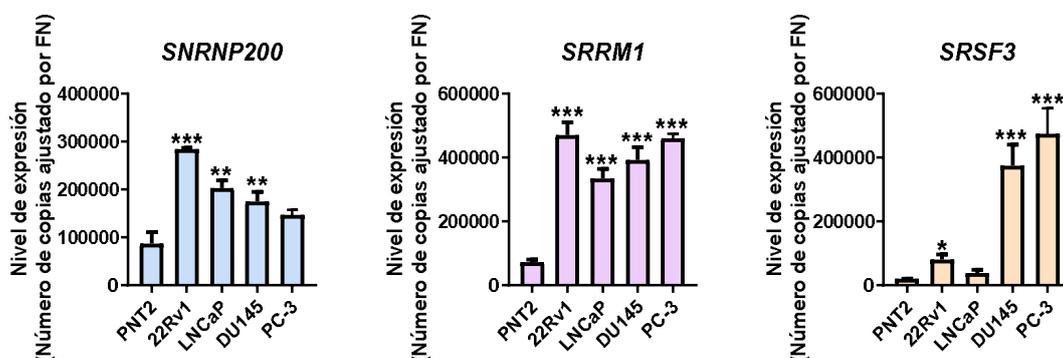


Figura 13. Perfil de expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en líneas celulares prostáticas. Comparación de los niveles de expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* entre la línea celular derivada de próstata normal PNT2 y las líneas celulares derivadas de próstata tumoral (22Rv1, LNCaP, DU145 y PC-3) ($n=5$). Los datos están representados como la media \pm SEM de los niveles de expresión ajustados por factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de *ACTB* y *GAPDH*). Los asteriscos ($*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$) indican diferencias estadísticamente significativas entre las distintas líneas tumorales frente a la línea celular PNT2.

Caracterización funcional y validación del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en modelos *in vitro* de cáncer de próstata

Para llevar a cabo el estudio funcional *in vitro* se seleccionaron las líneas celulares 22Rv1 y DU145. Los resultados mostraron una disminución significativa del nivel de expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en las células transfectadas con el *siRNA-SNRNP200* (siSNRNP200), *siRNA-SRRM1* (siSRRM1) y *siRNA-SRSF3* (siSRSF3), respectivamente, en comparación a las transfectadas con el siRNA control o *scramble* (**Figura 14a**). Nuestros resultados indican que el silenciamiento de estos elementos de la

maquinaria de *splicing* disminuyó significativamente la tasa de proliferación de las líneas 22Rv1 y DU145 tras 48 y 72h (**Figura 14b**).

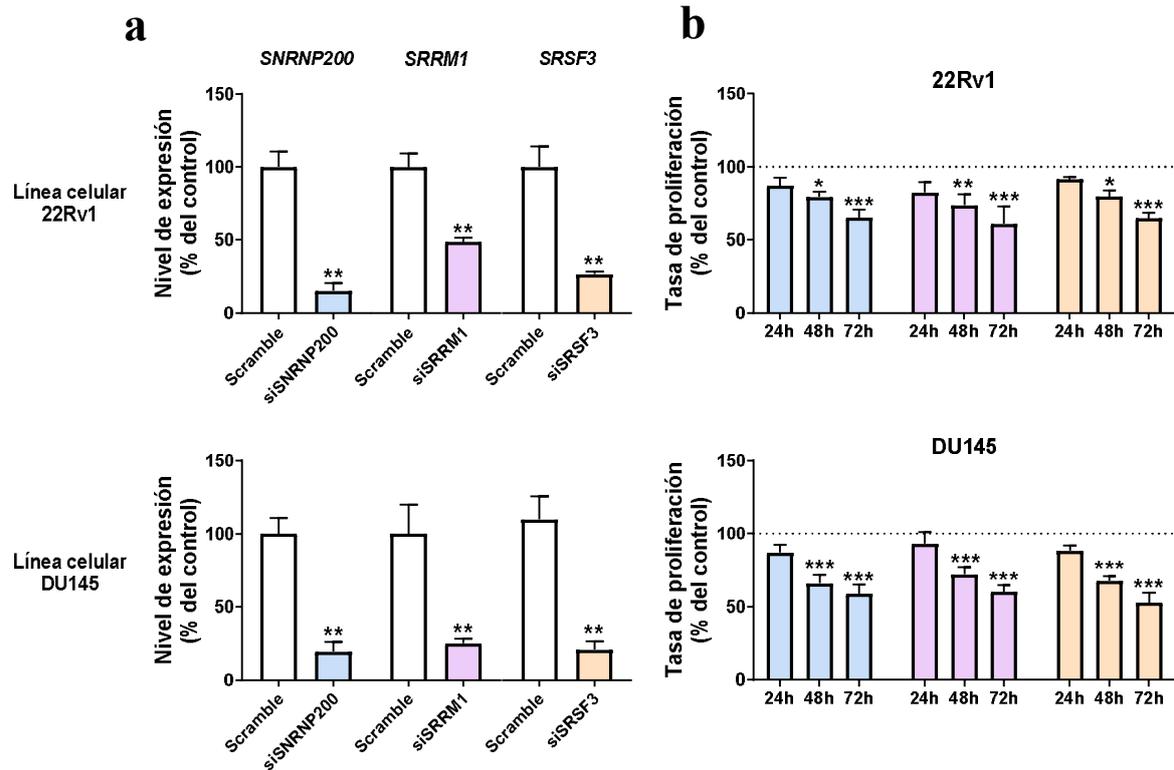


Figura 14. Validación del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* y caracterización de su efecto funcional sobre la tasa de proliferación de líneas celulares de cáncer de próstata. a) Validación por qPCR del silenciamiento de *SNRNP200* (siSNRNP200), *SRRM1* (siSRRM1) y *SRSF3* (siSRSF3) en las líneas celulares 22Rv1 y DU145 ($n=4$). Los datos están representados como la media \pm SEM de los niveles de expresión ajustados por *ACTB*. b) Los valores representan porcentaje de proliferación (media \pm SEM) de las células transfectadas con *siRNA-SNRNP200* (azul), *siRNA-SRRM1* (violeta) y *siRNA-SRSF3* (naranja) con respecto a las células transfectadas con siRNA control o *scramble*. La línea discontinua representa la tasa de proliferación en el control (100%). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control o *scramble* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Asimismo, se observó que el silenciamiento de estos elementos de la maquinaria de *splicing* disminuyó la tasa de migración de la línea celular tumoral DU145 con respecto a las células transfectadas con el siRNA control o *scramble*, aunque dicha diferencia solamente alcanzó diferencia estadística en el caso de SNRNP200 y SRSF3 (**Figura 15**).

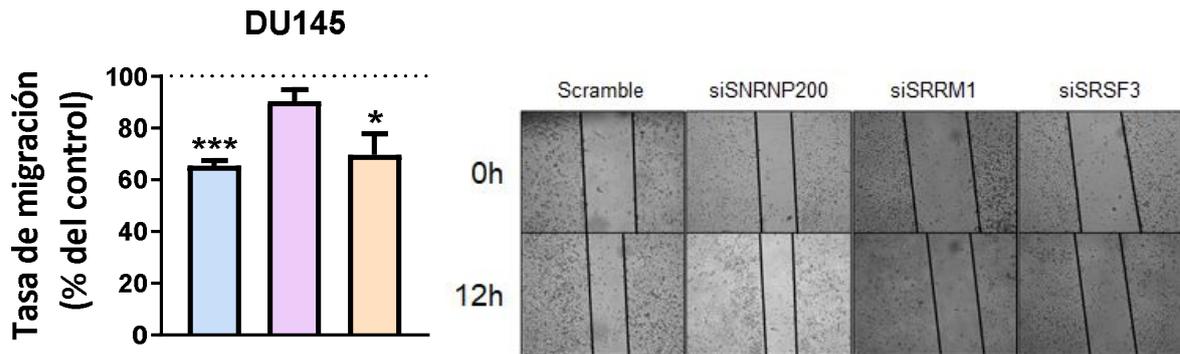


Figura 15. Efecto del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* sobre la tasa de migración de la línea celular *DU145*. La tasa de migración fue determinada por medio del ensayo de recuperación de la herida (*wound healing assay*) tras 12h desde la realización de la herida ($n \geq 3$). En la parte derecha se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos. Los valores representan porcentaje de migración (media \pm SEM) de las células transfectadas con *siRNA-SNRNP200* (azul), *siRNA-SRRM1* (violeta) y *siRNA-SRSF3* (naranja) con respecto a las células transfectadas con siRNA control o *scramble*. La línea discontinua representa la tasa de migración en el control (100%). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control o *scramble* (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Caracterización molecular del efecto del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3*

El silenciamiento de *SRRM1* en la línea celular 22Rv1 redujo significativamente el nivel de fosforilación de AKT, mientras que el silenciamiento de *SRSF3* incrementó significativamente los niveles de fosforilación de ERK y redujo los de JNK (**Figura 16**).

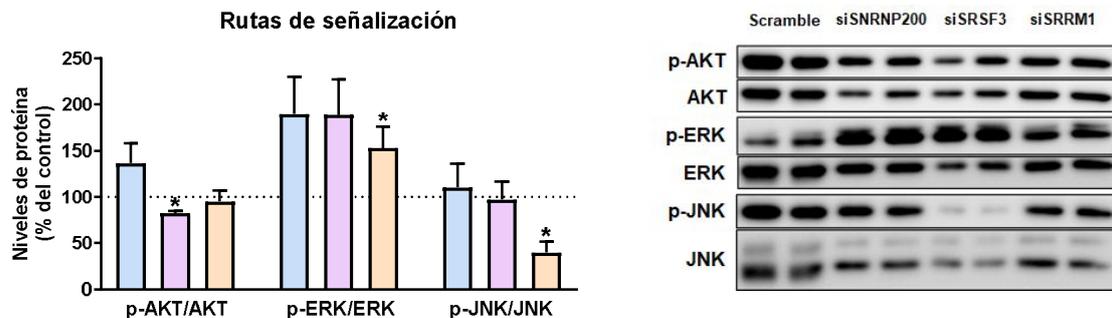


Figura 16. Efecto del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* sobre diversas rutas de señalización. Niveles basales de fosfo-AKT, fosfo-ERK1/2 y fosfo-JNK en células 22Rv1 silenciadas (24h; $n \geq 3$). Los niveles de proteína fueron normalizados en base a los niveles de AKT, ERK y JNK total. En la parte derecha se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos. Los valores representan niveles de proteína (media \pm SEM) de las células transfectadas con *siRNA-SNRNP200* (azul), *siRNA-SRRM1* (violeta) y *siRNA-SRSF3* (naranja) con respecto a las células transfectadas con siRNA control o *scramble*. La línea discontinua representa los niveles de proteína de las células control (100%). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control o *scramble* (* $p < 0,05$).

Además, el silenciamiento de *SNRNP200* y *SRRM1* redujo significativamente el ratio *AR-v7/AR*, disminuyendo los niveles de expresión de la variante oncogénica *AR-v7* sin alterar los del gen *AR* (**Figura 17**). No obstante, aunque el silenciamiento de *SRSF3* no produjo cambios significativos sobre el ratio *AR-v7/AR*, sí redujo los niveles de expresión de *AR-v7* y *AR* (**Figura 17**).

Por otro lado, el silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* también redujo significativamente el nivel de expresión de las variantes de *splicing* oncogénicas *PKM2*, *CASP2-S* y *XBPI-S*, mientras que no produjo cambios significativos con respecto al nivel de expresión de *PKM1*, *CASP2* y *XBPI-U*. De este modo, el silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* disminuyó significativamente las ratios *PKM2/PKM1*, *CASP2-S/CASP2* y *XBPI-S/XBPI-U* (**Figura 17**). Asimismo, el silenciamiento de *SRRM1* disminuyó significativamente la ratio *REST4/REST* (por medio de una reducción en el nivel de expresión de la variante oncogénica *REST4* sin alterar la variante canónica *REST*), así como el nivel de expresión de la variante *KLF6-SV1*, sin producir cambios significativos en el nivel de expresión de la variante canónica *KLF6* ni la ratio *KLF6-SV1/KLF6* (**Figura 17**).

Por otro lado, ninguno de los tres silenciamientos pudo alterar de forma significativa el nivel de expresión de las variantes oncogénicas *sst5TMD4* e *In1-ghrelina*, así como de las variantes canónicas *SSTR5* y *GHRL* (**Figura 17**).

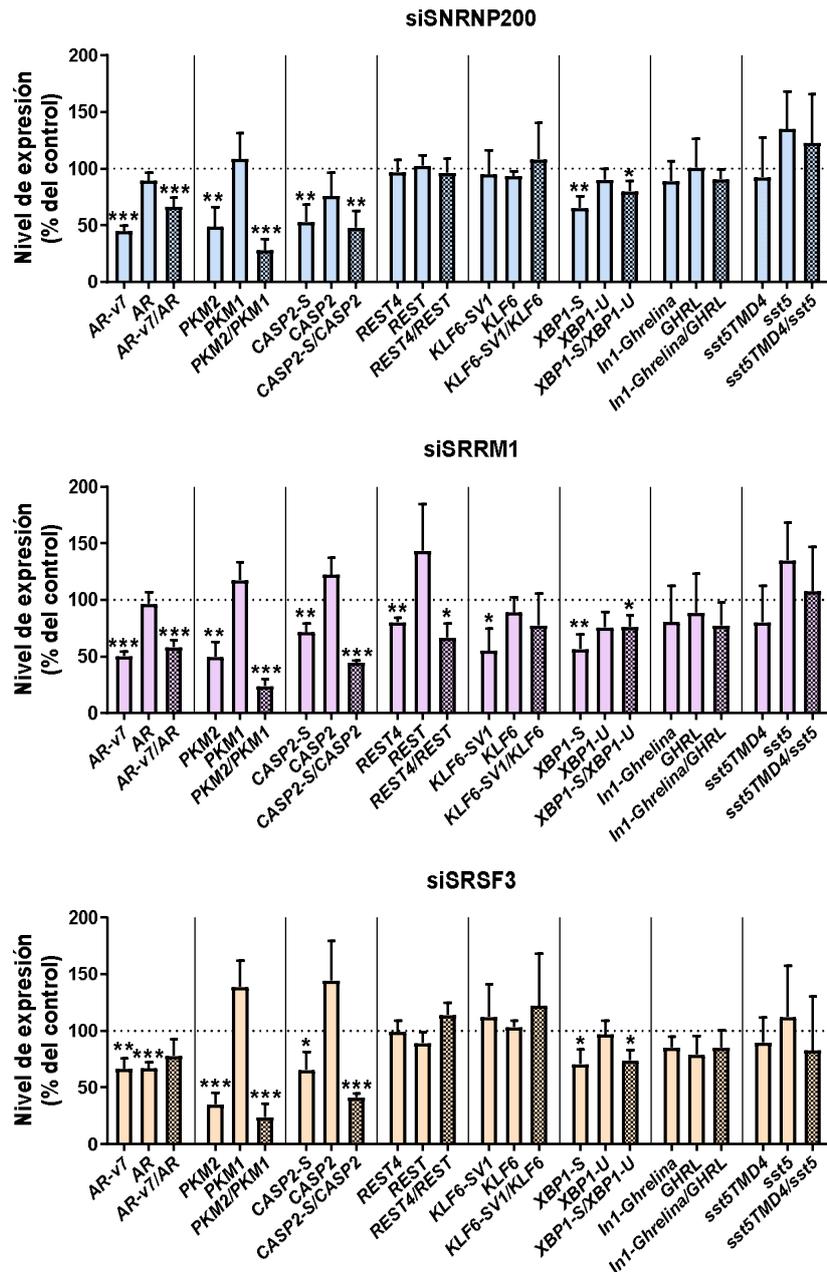


Figura 17. Efecto del silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 sobre la expresión de transcritos relacionados con la agresividad del cáncer de próstata. Los valores representan niveles de expresión (media \pm SEM) de transcritos seleccionados en células 22Rv1 transfectadas con *siRNA-SNRNP200* (panel superior), *siRNA-SRRM1* (panel central) y *siRNA-SRSF3* (panel inferior) con respecto a las células transfectadas con *siRNA* control o *scramble*. La línea discontinua representa los niveles de expresión en las células control (100%). La ratio entre la expresión de variantes de *splicing* se muestra como una barra punteada. Los niveles de expresión han sido determinados mediante qPCR y ajustados por factor de normalización (obtenido a partir de los niveles de expresión de *ACTB* y *GAPDH*). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control o *scramble* (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).

Efecto del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en la respuesta a enzalutamida en la línea celular 22Rv1

En el tiempo estudiado (24h), tanto el tratamiento con enzalutamida como el silenciamiento de los distintos genes no alteró la capacidad proliferativa de las células (*Figura 18*). Sin embargo, el silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en combinación con el fármaco enzalutamida sí redujo la tasa de proliferación de las células 22Rv1, resultando en un efecto anti-proliferativo aditivo tras 24h de incubación, indicando que el silenciamiento de estos elementos de la maquinaria de *splicing* provocó una sensibilización de la línea celular 22Rv1 al fármaco enzalutamida (*Figura 18*).

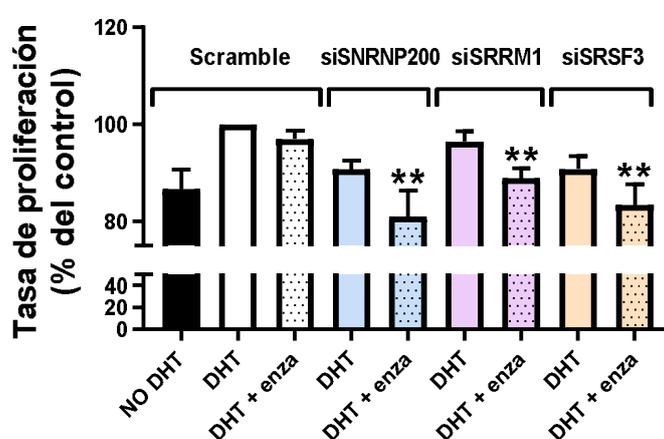


Figura 18. Ensayo de proliferación celular en respuesta al tratamiento combinado de enzalutamida y silenciamiento de SNRNP200, SRRM1 y SRSF3. La tasa de proliferación de la línea celular 22Rv1 fue medida tras 24h del silenciamiento de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* en presencia de dihidrotestosterona (DHT) con y sin enzalutamida (enza; $n=4$). Los resultados están representados como porcentaje de las células control tratadas con el vehículo y DHT. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas frente al control o *scramble* tratado con el vehículo y DHT (** $p < 0,01$).

Discusión

El cáncer de próstata (CaP) es una de las patologías tumorales cuyo desarrollo y, especialmente, progresión está principalmente influenciada por la alteración del patrón normal de expresión génica, así como de la presencia de variantes de *splicing* oncogénicas [67]. De hecho, la aparición de la variante 7 del receptor de andrógenos (AR-v7) juega un papel determinante en esta patología tumoral, en la medida en que se ha asociado fuertemente con un aumento de agresividad [68], así como con la resistencia a terapias convencionales (p.ej.: abiraterona y enzalutamida) [24]. De manera similar, la desregulación del patrón de expresión de otras variantes de *splicing*, como *sst5TMD4* [69], *PKM2* [70], *REST4* [71], *XBPI-S* [72], *In1-ghrelina* [73] entre otras, también se ha asociado al desarrollo y progresión del CaP. En este sentido, es razonable pensar que una desregulación de la maquinaria celular implicada en el control del proceso de *splicing* podría ser la responsable de la alteración de la expresión de variantes de *splicing* oncogénicas observada en CaP. Sin embargo, aunque algunos componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* específicos se han asociado con el desarrollo y la agresividad del CaP [49, 74-77], ningún estudio ha explorado de forma exhaustiva la desregulación global de estos elementos en CaP.

Este estudio ha demostrado por primera vez la existencia de una evidente y profunda desregulación de los niveles de expresión de un conjunto representativo de componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* en muestras de CaP con respecto a su respectivo tejido adyacente no tumoral (TA-NT). En particular, más del 50% de los componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* analizados en el presente estudio mostraron un patrón de expresión alterado en muestras de CaP, lo que demuestra que los componentes de la maquinaria celular responsable del procesamiento del pre-ARNm a través del proceso de *splicing* están drásticamente desregulados en esta patología. De hecho, hemos definido bioinformáticamente una huella molecular (basada en la expresión de 11 componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing*) capaz de discriminar perfectamente entre CaP y la región adyacente no tumoral a este, lo que refuerza aún más esta idea. Aún más importante es el hecho de que los niveles de expresión de multitud de componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* determinados en este estudio se asociaron o correlacionaron con características clínicas y moleculares de agresividad del CaP (p. ej.: grado de Gleason, presencia de metástasis, invasión linfocelular, invasión perineural, expresión de *AR-v7*), lo que sugiere un nexo causal entre las desregulaciones

de la maquinaria de *splicing* y la agresividad de esta patología tumoral. Estos resultados amplían y van en la línea de observaciones previas, en las que se indica que la expresión elevada de factores de *splicing* específicos, como *RBM3*, *U2AF2*, *ESRP1*, *ESRP2* y *NOVA1* entre otros, se asocia a características clínico-moleculares de agresividad en CaP [49, 75, 77, 78].

Entre todos los componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* analizados en este estudio, *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* parecieron tener especial relevancia en la fisiopatología del CaP, ya que sus niveles de expresión estaban significativamente elevados y asociados con todas las características clínicas relevantes analizadas en este estudio (grado Gleason, estadio tumoral, invasión perineural, invasión linfovascular, recidiva bioquímica y presencia de metástasis en el momento del diagnóstico), sugiriendo que podrían representar novedosos biomarcadores de diagnóstico/agresividad y/o dianas terapéuticas de CaP. Además, *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* podrían representar marcadores de pronóstico dado que elevados niveles de expresión de estos genes se asociaron con mayor número de casos de recidiva bioquímica. Por otro lado, cabe señalar que, aunque *SRSF3* se ha definido como un oncogén en diferentes patologías tumorales [79-81], esta es la primera descripción de la sobreexpresión de este factor de *splicing* en CaP. Específicamente, se ha demostrado que *SRSF3* puede aumentar la agresividad de varios tipos de tumores mediante el control del proceso de *splicing* en núcleo [80, 82, 83], pero también a través de la alteración de la eficiencia de la traducción de ciertos ARNm en el citoplasma [84]. Esto sugiere que la sobreexpresión de *SRSF3* podría ejercer funciones oncogénicas por medio de un incremento de los niveles de proteína tanto en núcleo como en citoplasma, habiéndose observado este último caso en este estudio al analizar los niveles de proteína en glándulas tumorales prostáticas. Por otro lado, el incremento de los niveles de *SNRNP200* y *SRRM1* en el núcleo de células de CaP, sugiere que el papel oncogénico ejercido por estas proteínas en esta patología depende principalmente de su función de modulación del proceso de *splicing*.

Debido a la creciente evidencia que apunta hacia una fuerte desregulación del proceso de *splicing* en cáncer, hasta la fecha se han estudiado una gran variedad de estrategias terapéuticas para prevenir la expresión de variantes de *splicing* oncogénicas y/o para modular la actividad del *spliceosoma* [85]. De hecho, durante los últimos años, se han desarrollado multitud de inhibidores del *spliceosoma* (p. ej.: Pladienolide-B, spliceostatina-A), proponiéndose como posibles herramientas terapéuticas en patologías

en las que se ha demostrado que la desregulación del proceso de *splicing* juega un papel determinante en la fisiopatología tumoral [86, 87]. Sin embargo, el bloqueo de la actividad o la inhibición de componentes del *spliceosoma* y/o factores de *splicing* específicos podría representar una estrategia terapéutica más adecuada y específica para el tratamiento de patologías tumorales, debido a que, de esta forma, se podría alterar un número más reducido, pero mejor caracterizado de eventos de *splicing*. En este sentido, en este proyecto hemos demostrado por primera vez que el silenciamiento de la expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3*, utilizando siRNAs específicos, disminuyó claramente parámetros funcionales de agresividad, incluyendo proliferación y migración, en líneas celulares derivadas de CaP. Estas acciones antitumorales podrían estar asociadas a la modulación de vías de señalización clave, ya que el silenciamiento de *SRRM1* y *SRSF3* provocó una disminución en los niveles de fosforilación de AKT y JNK, respectivamente, lo que probablemente conduzca a la inhibición de las vías PI3K/AKT y JNK, ampliamente definidas como vías de señalización oncogénicas [88, 89]. Curiosamente, el silenciamiento de *SRSF3* incrementó la fosforilación de ERK, aparentemente provocando una mayor activación de la vía MAPK/ERK, la cual ha sido sugerida como susceptible de ser regulada en respuesta a los cambios en el proceso de *splicing* [90]. Cabe destacar que, a pesar de su conocido papel oncogénico, la vía MAPK/ERK se ha postulado como un regulador positivo de la senescencia celular, ejerciendo de esta forma efectos antitumorales en condiciones concretas [91]. Como era esperable, y proporcionando una explicación mecanística, el silenciamiento de la expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* alteró el proceso de *splicing* de varios genes involucrados en la agresividad tumoral, como *AR*, *PKM*, *CASP2* o *XBPI*. Entre todos ellos, son especialmente relevantes los resultados obtenidos tras el análisis del mecanismo del *splicing* del *AR*, debido al marcado papel de este receptor en el desarrollo y la agresividad del CaP [92]. Concretamente, se observó una disminución en la expresión de *AR-v7* (pero no *AR*) en respuesta al silenciamiento de *SNRNP200* y *SRRM1*, reflejando una alteración en el proceso normal de *splicing* de *AR*. Por otro lado, el silenciamiento de *SRSF3* disminuyó los niveles de expresión tanto de *AR* como de *AR-v7*. En cualquier caso, estos resultados indican que estos tres factores podrían representar dianas terapéuticas para abordar el CaP resistente a la castración (CPRC), ya que *AR-v7* se ha postulado como uno de los factores más relacionados con el desarrollo del CPRC [93]. Consistentemente, el silenciamiento de la expresión de *SNRNP200*, *SRRM1* y *SRSF3* provocó una sensibilización a enzalutamida en la línea celular 22Rv1 al mostrar efectos aditivos en la inhibición de la

tasa de proliferación en estas células, posiblemente a través de la regulación negativa de AR-v7.

Conclusión

Los datos presentados en este trabajo indican que la maquinaria celular responsable de la regulación del proceso de *splicing* se encuentra drásticamente alterada en CaP, y que ciertos componentes del *spliceosoma* y factores de *splicing* podrían representar nuevos candidatos como posibles biomarcadores de diagnóstico y pronóstico, así como posibles dianas terapéuticas útiles en el desarrollo de fármacos globales y efectivos para el tratamiento del CaP. Específicamente, nuestros resultados demostraron que SNRNP200, SRRM1 y SRSF3 podrían representar novedosas y atractivas dianas diagnósticas/pronósticas y terapéuticas para el CaP y CPRC.

Bibliografía

1. Gleason, D.F., *Histologic grading of prostate cancer: a perspective*. Hum Pathol, 1992. **23**(3): p. 273-9.
2. *Organización Mundial de la Salud (OMS)*. 2019; Available from: who.int.
3. *Asociación Española Contra el Cáncer (AECC)*. 2019; Available from: aecc.es.
4. *Globocan 2012*. 2019; Available from: globocan.iarc.fr/.
5. Noone AM, H.N., Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds), *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2015*. 2018, National Cancer Institute.
6. Jones, D., et al., *The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review*. BMC Fam Pract, 2018. **19**(1): p. 79.
7. Romero Otero, J., et al., *Prostate cancer biomarkers: an update*. Urol Oncol, 2014. **32**(3): p. 252-60.
8. Maughan, B.L. and E.S. Antonarakis, *Androgen pathway resistance in prostate cancer and therapeutic implications*. Expert Opin Pharmacother, 2015. **16**(10): p. 1521-37.
9. Culig, Z. and F.R. Santer, *Androgen receptor signaling in prostate cancer*. Cancer and Metastasis Reviews, 2014. **33**(2-3): p. 413-427.
10. Grossmann, M., A.S. Cheung, and J.D. Zajac, *Androgens and prostate cancer: pathogenesis and deprivation therapy*. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2013. **27**(4): p. 603-16.
11. Sternberg, C.N., et al., *Progress in the treatment of advanced prostate cancer*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2014: p. 117-31.
12. Kirby, M., C. Hirst, and E.D. Crawford, *Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review*. Int J Clin Pract, 2011. **65**(11): p. 1180-92.
13. Francini, E., et al., *Clinical Outcomes of First-line Abiraterone Acetate or Enzalutamide for Metastatic Castration-resistant Prostate Cancer After Androgen Deprivation Therapy + Docetaxel or ADT Alone for Metastatic Hormone-sensitive Prostate Cancer*. Clin Genitourin Cancer, 2018. **16**(2): p. 130-134.
14. Linder, S., et al., *Enzalutamide therapy for advanced prostate cancer: efficacy, resistance and beyond*. Endocr Relat Cancer, 2018. **26**(1): p. R31-r52.
15. Edlind, M.P. and A.C. Hsieh, *PI3K-AKT-mTOR signaling in prostate cancer progression and androgen deprivation therapy resistance*. Asian Journal of Andrology, 2014. **16**(3): p. 378-86.
16. Arora, V.K., et al., *Glucocorticoid receptor confers resistance to antiandrogens by bypassing androgen receptor blockade*. Cell, 2013. **155**(6): p. 1309-22.
17. Yuan, T.C., S. Veeramani, and M.F. Lin, *Neuroendocrine-like prostate cancer cells: neuroendocrine transdifferentiation of prostate adenocarcinoma cells*. Endocr Relat Cancer, 2007. **14**(3): p. 531-47.
18. Shafi, A.A., et al., *Differential regulation of metabolic pathways by androgen receptor (AR) and its constitutively active splice variant, AR-V7, in prostate cancer cells*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 31997-2012.
19. Nakazawa, M., C. Paller, and N. Kyprianou, *Mechanisms of Therapeutic Resistance in Prostate Cancer*. Curr Oncol Rep, 2017. **19**(2): p. 13.

20. Hu, R., et al., *Ligand-independent androgen receptor variants derived from splicing of cryptic exons signify hormone-refractory prostate cancer*. *Cancer Res*, 2009. **69**(1): p. 16-22.
21. Guo, Z., et al., *A novel androgen receptor splice variant is up-regulated during prostate cancer progression and promotes androgen depletion-resistant growth*. *Cancer Res*, 2009. **69**(6): p. 2305-13.
22. Munkley, J., et al., *RNA splicing and splicing regulator changes in prostate cancer pathology*. *Human Genetics*, 2017. **136**(9): p. 1143-1154.
23. Sharp, A., et al., *Androgen receptor splice variant-7 expression emerges with castration resistance in prostate cancer*. *J Clin Invest*, 2019. **129**(1): p. 192-208.
24. Antonarakis, E.S., et al., *AR-V7 and resistance to enzalutamide and abiraterone in prostate cancer*. *N Engl J Med*, 2014. **371**(11): p. 1028-38.
25. Li, Y., et al., *Androgen receptor splice variants mediate enzalutamide resistance in castration-resistant prostate cancer cell lines*. *Cancer Res*, 2013. **73**(2): p. 483-9.
26. Scher, H.I., et al., *Association of AR-V7 on Circulating Tumor Cells as a Treatment-Specific Biomarker With Outcomes and Survival in Castration-Resistant Prostate Cancer*. *JAMA Oncol*, 2016. **2**(11): p. 1441-1449.
27. Gallardo, E., et al., *Expert opinion on chemotherapy use in castration-resistant prostate cancer progressing after docetaxel*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2013. **88**(2): p. 357-67.
28. Munkley, J., et al., *RNA splicing and splicing regulator changes in prostate cancer pathology*. *Hum Genet*, 2017. **136**(9): p. 1143-1154.
29. Hormaechea-Agulla, D., et al., *The oncogenic role of the spliced somatostatin receptor sst5TMD4 variant in prostate cancer*. *The FASEB Journal*, 2017. **31**(11): p. 4682-4696.
30. Hormaechea-Agulla, D., et al., *The oncogenic role of the In1-ghrelin splicing variant in prostate cancer aggressiveness*. *Molecular Cancer*, 2017. **16**(1).
31. DiFeo, A., J.A. Martignetti, and G. Narla, *The role of KLF6 and its splice variants in cancer therapy*. *Drug Resistance Updates*, 2009. **12**(1-2): p. 1-7.
32. Kelsey, R., *Prostate cancer: SRRM4 drives NEPC progression*. *Nat Rev Urol*, 2016. **13**(7): p. 371.
33. Akgul, C., D.A. Moulding, and S.W. Edwards, *Alternative splicing of Bcl-2-related genes: functional consequences and potential therapeutic applications*. *Cell Mol Life Sci*, 2004. **61**(17): p. 2189-99.
34. Christofk, H.R., et al., *The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth*. *Nature*, 2008. **452**(7184): p. 230-3.
35. Bonomi, S., et al., *Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy*. *Int J Cell Biol*, 2013. **2013**: p. 962038.
36. Tazi, J., N. Bakkour, and S. Stamm, *Alternative splicing and disease*. *Biochim Biophys Acta*, 2009. **1792**(1): p. 14-26.
37. Scotti, M.M. and M.S. Swanson, *RNA mis-splicing in disease*. *Nat Rev Genet*, 2016. **17**(1): p. 19-32.
38. Lee, Y. and D.C. Rio, *Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing*. *Annu Rev Biochem*, 2015. **84**: p. 291-323.
39. Cate, J.H.D., *A Big Bang in spliceosome structural biology*. *Science*, 2016. **351**(6280): p. 1390-1392.
40. Dvinge, H., *Regulation of alternative mRNA splicing: old players and new perspectives*. *FEBS Letters*, 2018.

41. Graveley, B.R., *Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world*. Trends Genet, 2001. **17**(2): p. 100-7.
42. Kelemen, O., et al., *Function of alternative splicing*. Gene, 2013. **514**(1): p. 1-30.
43. Wang, Y., et al., *Mechanism of alternative splicing and its regulation*. Biomed Rep, 2015. **3**(2): p. 152-8.
44. Smith, C.W. and J. Valcarcel, *Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control*. Trends Biochem Sci, 2000. **25**(8): p. 381-8.
45. Liu, S. and C. Cheng, *Alternative RNA splicing and cancer*. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA, 2013. **4**(5): p. 547-566.
46. Takayama, K.-i., et al., *Dysregulation of spliceosome gene expression in advanced prostate cancer by RNA-binding protein PSF*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2017. **114**(39): p. 10461-10466.
47. Wang, D., et al., *Splicing Factor Prp8 Interacts With NES(AR) and Regulates Androgen Receptor in Prostate Cancer Cells*. Mol Endocrinol, 2015. **29**(12): p. 1731-42.
48. Busa, R., et al., *The RNA-binding protein Sam68 contributes to proliferation and survival of human prostate cancer cells*. Oncogene, 2007. **26**(30): p. 4372-82.
49. Liu, L.L., et al., *Mechanisms of the androgen receptor splicing in prostate cancer cells*. Oncogene, 2014. **33**(24): p. 3140-50.
50. Uphoff, C.C. and H.G. Drexler, *Detection of Mycoplasma contamination in cell cultures*. Curr Protoc Mol Biol, 2014. **106**: p. 28.4.1-14.
51. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
52. Duran-Prado, M., et al., *The new truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 is associated to poor prognosis in breast cancer and increases malignancy in MCF-7 cells*. Oncogene, 2012. **31**(16): p. 2049-61.
53. Ibanez-Costa, A., et al., *In1-ghrelin splicing variant is overexpressed in pituitary adenomas and increases their aggressive features*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 8714.
54. Luque, R.M., et al., *Truncated somatostatin receptor variant sst5TMD4 confers aggressive features (proliferation, invasion and reduced octreotide response) to somatotropinomas*. Cancer Lett, 2015. **359**(2): p. 299-306.
55. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
56. Hatami, R., et al., *KLF6-SV1 drives breast cancer metastasis and is associated with poor survival*. Sci Transl Med, 2013. **5**(169): p. 169ra12.
57. Kuranaga, Y., et al., *SRSF3, a Splicer of the PKM Gene, Regulates Cell Growth and Maintenance of Cancer-Specific Energy Metabolism in Colon Cancer Cells*. Int J Mol Sci, 2018. **19**(10).
58. Li, Y., et al., *SRRM4 Drives Neuroendocrine Transdifferentiation of Prostate Adenocarcinoma Under Androgen Receptor Pathway Inhibition*. Eur Urol, 2017. **71**(1): p. 68-78.
59. Harnden, P., et al., *The prognostic significance of perineural invasion in prostatic cancer biopsies: a systematic review*. Cancer, 2007. **109**(1): p. 13-24.
60. Luo, H.L., et al., *Lymphovascular invasion is a pathological feature related to aggressive cancer behavior and predicts early recurrence in prostate cancer*. Kaohsiung J Med Sci, 2012. **28**(6): p. 327-30.
61. Cheng, L., et al., *Staging of prostate cancer*. Histopathology, 2012. **60**(1): p. 87-117.
62. Tourinho-Barbosa, R., et al., *Biochemical recurrence after radical prostatectomy: what does it mean?* Int Braz J Urol, 2018. **44**(1): p. 14-21.

63. Sulik, M., et al., *Expression of Ki-67 as a proliferation marker in prostate cancer*. Polish Annals of Medicine, 2011. **18**(1): p. 12-19.
64. Tailor, P.D., et al., *Diagnostic and prognostic biomarker potential of kallikrein family genes in different cancer types*. Oncotarget, 2018. **9**(25): p. 17876-17888.
65. Antonarakis, E.S., et al., *Androgen receptor variant-driven prostate cancer: clinical implications and therapeutic targeting*. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2016. **19**(3): p. 231-41.
66. Cáncer, I.N.d. *Diccionario de cáncer*. 2019; Available from: cancer.gov.
67. Paschalis, A., et al., *Alternative splicing in prostate cancer*. Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(11): p. 663-675.
68. Kong, D., et al., *Androgen receptor splice variants contribute to prostate cancer aggressiveness through induction of EMT and expression of stem cell marker genes*. Prostate, 2015. **75**(2): p. 161-74.
69. Hormaechea-Agulla, D., et al., *The oncogenic role of the spliced somatostatin receptor sst5TMD4 variant in prostate cancer*. Faseb j, 2017. **31**(11): p. 4682-4696.
70. Wong, N., et al., *Changes in PKM2 associate with prostate cancer progression*. Cancer Invest, 2014. **32**(7): p. 330-8.
71. Zhang, X., et al., *SRRM4 Expression and the Loss of REST Activity May Promote the Emergence of the Neuroendocrine Phenotype in Castration-Resistant Prostate Cancer*. Clin Cancer Res, 2015. **21**(20): p. 4698-708.
72. Sheng, X., et al., *IRE1 α -XBP1s pathway promotes prostate cancer by activating c-MYC signaling*. Nature Communications, 2019. **10**(1): p. 323.
73. Hormaechea-Agulla, D., et al., *The oncogenic role of the In1-ghrelin splicing variant in prostate cancer aggressiveness*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 146.
74. Takayama, K.I., et al., *Dysregulation of spliceosome gene expression in advanced prostate cancer by RNA-binding protein PSF*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(39): p. 10461-10466.
75. Grupp, K., et al., *High RNA-binding motif protein 3 expression is an independent prognostic marker in operated prostate cancer and tightly linked to ERG activation and PTEN deletions*. Eur J Cancer, 2014. **50**(4): p. 852-61.
76. Yamamoto, R., et al., *Overexpression of p54(nrb)/NONO induces differential EPHA6 splicing and contributes to castration-resistant prostate cancer growth*. Oncotarget, 2018. **9**(12): p. 10510-10524.
77. Gerhauser, C., et al., *Molecular Evolution of Early-Onset Prostate Cancer Identifies Molecular Risk Markers and Clinical Trajectories*. Cancer Cell, 2018. **34**(6): p. 996-1011.e8.
78. Lu, Z.X., et al., *Transcriptome-wide landscape of pre-mRNA alternative splicing associated with metastatic colonization*. Mol Cancer Res, 2015. **13**(2): p. 305-18.
79. Peiqi, L., et al., *Expression of SRSF3 is Correlated with Carcinogenesis and Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma*. Int J Med Sci, 2016. **13**(7): p. 533-9.
80. Gautrey, H., et al., *SRSF3 and hnRNP H1 regulate a splicing hotspot of HER2 in breast cancer cells*. RNA Biol, 2015. **12**(10): p. 1139-51.
81. Lin, J.C., et al., *RBM4-SRSF3-MAP4K4 splicing cascade modulates the metastatic signature of colorectal cancer cell*. Biochim Biophys Acta Mol Cell Res, 2018. **1865**(2): p. 259-272.
82. Wang, H., et al., *A Coiled-Coil Domain Containing 50 Splice Variant Is Modulated by Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 3 and Promotes*

- Hepatocellular Carcinoma in Mice by the Ras Signaling Pathway*. Hepatology, 2019. **69**(1): p. 179-195.
83. Zhu, S., et al., *Regulation of CD44E by DARPP-32-dependent activation of SRp20 splicing factor in gastric tumorigenesis*. Oncogene, 2016. **35**(14): p. 1847-56.
 84. Kim, J., et al., *Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region*. Cell Death Differ, 2014. **21**(3): p. 481-90.
 85. Jyotsana, N. and M. Heuser, *Exploiting differential RNA splicing patterns: a potential new group of therapeutic targets in cancer*. Expert Opin Ther Targets, 2018. **22**(2): p. 107-121.
 86. Sato, M., et al., *High antitumor activity of pladienolide B and its derivative in gastric cancer*. Cancer Sci, 2014. **105**(1): p. 110-6.
 87. Larrayoz, M., et al., *The SF3B1 inhibitor spliceostatin A (SSA) elicits apoptosis in chronic lymphocytic leukaemia cells through downregulation of Mcl-1*. Leukemia, 2016. **30**(2): p. 351-60.
 88. Chen, H., et al., *The PI3K/AKT pathway in the pathogenesis of prostate cancer*. Front Biosci (Landmark Ed), 2016. **21**: p. 1084-91.
 89. Hubner, A., et al., *JNK and PTEN cooperatively control the development of invasive adenocarcinoma of the prostate*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2012. **109**(30): p. 12046-51.
 90. Siegfried, Z., et al., *Regulation of the Ras-MAPK and PI3K-mTOR Signalling Pathways by Alternative Splicing in Cancer*. Int J Cell Biol, 2013. **2013**: p. 568931.
 91. Deschenes-Simard, X., et al., *Tumor suppressor activity of the ERK/MAPK pathway by promoting selective protein degradation*. Genes Dev, 2013. **27**(8): p. 900-15.
 92. Tan, M.H., et al., *Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery*. Acta Pharmacol Sin, 2015. **36**(1): p. 3-23.
 93. Qu, Y., et al., *Constitutively active AR-V7 plays an essential role in the development and progression of castration-resistant prostate cancer*. Sci Rep, 2015. **5**: p. 7654.

Anexo 1

Parámetro	
Pacientes (<i>n</i>)	84
Edad, años [mediana (RIQ)]	61 (57 – 66)
Niveles de PSA, ng/mL [mediana (RIQ)]	5,2 (4,2 – 8,0)
CaPSig [<i>n</i> (%)]	76 (90,5%)
Estadio tumoral \geq 3a [<i>n</i> (%)]	59 (70,2%)
Invasión perineural [<i>n</i> (%)]	72 (85,7%)
Invasión linfovascular [<i>n</i> (%)]	8 (9,52%)
Recidiva [<i>n</i> (%)]	35 (41,7%)
Metástasis [<i>n</i> (%)]	0 (0%)

Anexo 1. Parámetros demográficos, bioquímicos y clínicos de los pacientes con cáncer de próstata poco agresivo (cohorte 1). RIQ, rango intercuartílico; PSA, antígeno prostático específico; CaPSig, cáncer de próstata significativo (Gleason \geq 7).

Anexo 2

Parámetro	
Pacientes (<i>n</i>)	42
Edad, años [mediana (RIQ)]	75 (69 -81)
Niveles de PSA, ng/mL [mediana (RIQ)]	62,0 (36,2 – 254,5)
CaPSig [<i>n</i> (%)]	42 (100%)
Metástasis [<i>n</i> (%)]	28 (66,7%)

Anexo 2. Parámetros demográficos, bioquímicos y clínicos de los pacientes con cáncer de próstata agresivo (cohorte 2). RIQ, rango intercuartílico; PSA, antígeno prostático específico; CaPSig, cáncer de próstata significativo (Gleason \geq 7).

Anexo 3

	Gen	Número de accesoión (GenBank)	Secuencia del cebador (Sentido)	Secuencia del cebador (Antisentido)	Amplicón (pb)
Componentes del spliceosoma	<i>PRPF40A</i>	NM_017892.3	GCTCGGAAGATGAAACGAAA	TGTCCTCAAATGCTGGCTCT	130
	<i>PRPF8</i>	NM_006445.3	TGCCCACTACAACCGAGAA	AGGCCCGTCCTTCAGGTA	139
	<i>RNU11</i>	NR_004407.1	AAGGGCTTCTGTCTGAGTG	CCAGCTGCCCAAATACCA	108
	<i>RNU12</i>	NR_029422.1	ATAACGATTCTGGGGTGACG	CAGGCATCCCGCAAAGTA	106
	<i>RNU2</i>	NR_002716.3	CTCGGCCTTTTGGCTAAGAT	TATTCCATCTCCCTGCTCCA	116
	<i>RNU4</i>	NR_003925.1	TCGTAGCCAATGAGGTCTATCC	AAAATTGCCAGTGCCGACTA	103
	<i>RNU4atac</i>	NR_023343.1	GTTGCGCTACTGTCCAATGA	CAAAAATTGCACCAAATAA	85
	<i>RNU6</i>	NR_004394.1	CGCTTCGGCAGCACATATA	AAAATATGGAACGCTTCACGAA	101
	<i>RNU6atac</i>	NR_023344.1	TGAAAGGAGAGAAGGTTAGCACTC	CGATGGTTAGATGCCACGA	112
	<i>SF3B1</i>	NM_012433.3	CAGTTCCTGTGTGTTCG	GCTGCCTTCTGCCTTGA	101
	<i>SF3B1 tv1</i>	NM_012433.3	GCAGACCGGAAGATGAATA	TTTTCCCTCCATCTGCAAAA	88
	<i>SNRNP70</i>	NM_001301069.1	TCTTCGTGGCGAGAGTGAAT	GCTTTCCTGACCGCTTACTG	114
	<i>SNRNP200</i>	NM_014014.4	GGTGCTGTCCCTTGTGG	CTTCTTCGCTTGGCTCTTCT	103
	<i>TCERG1</i>	NM_006706.3	GAGGAGCCCAAAGAAGAGGA	CACCAGTCCAAACGACACAC	112
	<i>U2AF1</i>	NM_006758.2	GAAGTATGGGGAAGTAGAGGAGATG	TTCAAGTCAATCACAGCCTTTTC	120
<i>U2AF2</i>	NM_007279.2	CTTTGACCAGAGGCGCTAAA	TACTGCATTGGGGTGATGTG	130	
Factores de splicing	<i>CELF1</i>	NM_006560.3	AACAGAAGAGAATGGCCAGC	TGCTGAAGGAGTGCTAAATACTG	121
	<i>CELF4</i>	NM_020180.3	CCCCAGCAGCAGAGAGAA	GAAGCCGAAAGGGAGGAA	108
	<i>ESRP1</i>	NM_020180.3	TTTTGGGATCACTGCTGGGG	TGTCCACCTTCTTGTGGC	108
	<i>ESRP2</i>	NM_024939.2	AGAGCCCAGCAGTCAATTGTT	GTCTCACTGTCCACCACATCAG	96
	<i>KHDRBS1</i>	NM_006559.2	GAGCGAGTGCTGATACCTGTC	CACCAGTCTCTCCTGCAGTC	106
	<i>MAGOH</i>	NM_002370.3	GCCAACAACAGCAATTACAAGA	TTATTCTTTCAGTTCCTCCATCAC	88
	<i>NOVA1</i>	NM_002515.2	TACCCAGGTACTACTGAGCGAG	CTGGTCTGTCTTGGCCACAT	124
	<i>PTBP1</i>	NM_002819.4	TGGGTCGGTTCCTGCTATT	CAGATCCCCGCTTGTAC	111
	<i>RAVER1</i>	NM_133452.2	GTAACCGCCGCAAGATACTG	CGAAGGCTGTCCCTTGTATT	126
	<i>RBM17</i>	NM_032905.4	CAAAGAGCCAAAGGACGAAA	TACATGCGGTGGAGTGTCC	107

<i>RBM3</i>	NM_006743.4	AAGCTCTTCGTGGGAGGG	TTGACAACGACCACCTCAGA	98
<i>RBM45</i>	NM_152945.3	CCCATCAAGGTTTTCATTGC	TTCCCGCAGATCTTCTTCTG	123
<i>SFPQ</i>	NM_005066.2	TGGTAGGGGGTGAAAGTG	TTAAAAACAAGAAATGGGGAAATG	125
<i>SNDI</i>	NM_014390.3	ACTACGGCAACAGAGAGGTCC	GAAGGCATACTCCGTGGCT	101
<i>SNWI</i>	NM_001318844.1	ATGCGTGCCCAAGTAGAGAG	TCCCCATCCTCTTTTCCA	134
<i>SRRM1</i>	NM_001303448.1	GTAGCCCAAGAAGACGCAAA	TGGTTCTGTGACGGGGAG	108
<i>SRRM4</i>	NM_194286.3	CCTTACCACCTCCTCAC	TTCGGCACATTCCAGACA	113
<i>SRSF1</i>	NM_006924.4	TGTCTCTGGACTGCCTCCA	TGCCATCTCGGTAAACATCA	98
<i>SRSF10</i>	NM_006625.5	CTACACTCGCCGTCCAAGAG	CCGTCCACAAATCCACTTTC	103
<i>SRSF2</i>	NM_003016.4	TGTCCAAGAGGGAATCCAAA	GTTTACACTGCTTGCCGATACA	113
<i>SRSF3</i>	NM_003017.4	TAACCCTAGATCTCGAAATGCATC	CATAGTAGCCAAAAGCCCATT	117
<i>SRSF4</i>	NM_005626.4	GGAAGTGAAGTCAATGGGAGAA	CTTCGAGAGCGAGACCTTGA	110
<i>SRSF5</i>	NM_001039465.1	GCAAAAGGCACAGTAGGTCAA	TTTGCCTACTACGGGAACG	92
<i>SRSF9</i>	NM_003769.2	CCCTGCGTAAACTGGATGAC	AGCTGGTGCTTCTCTCAGGA	87
<i>TIA1</i>	NM_022037.2	TAAATCCCGTGCAACAGCAGA	TATGCAGGAAGTTGCCAACCA	124
<i>TRA2A</i>	NM_013293.4	TCAAAGGAGGCTATGGAAAGG	TGTGTGCGCTCTCTTGGTTA	90
<i>TRA2B</i>	NM_004593.2	GATGATGCCAAGGAAGCTAAAG	AGGTAGGTCTCCCCATGTAAATTC	130

Anexo 3. Cebadores específicos de los genes medidos en el array de qPCR. Se indica la secuencia de la pareja de cebadores (sentido y antisentido) así como el tamaño del producto amplificado y el número de accesión a la base de datos GenBank.

Anexo 4

<i>Spliceosoma mayor</i>		<i>Spliceosoma menor</i>	<i>Factores de splicing</i>				
<i>RNU1</i>	<i>RNU6</i>	<i>RNU11</i>	<i>CUGBP</i>	<i>RBM45</i>	<i>SFPQ</i>	<i>SRSF3</i>	<i>TIA1</i>
<i>RNU2</i>	<i>CA150</i>	<i>RNU12</i>	<i>ESRP1</i>	<i>SC35</i>	<i>PTB</i>	<i>SRSF4</i>	<i>TRA2α</i>
<i>U2AF1</i>	<i>SF3B</i>	<i>RNU4ATAC</i>	<i>ESRP2</i>	<i>SKIP</i>	<i>RAVER1</i>	<i>SRSF5</i>	<i>TRA2β</i>
<i>U2AF2</i>	<i>PRPF40A</i>	<i>RNU6ATAC</i>	<i>MAGOH</i>	<i>SND1</i>	<i>RBM17</i>	<i>SRSF6</i>	<i>CELF4</i>
<i>RNU4</i>	<i>PRPF8</i>		<i>NOVA1</i>	<i>SRRM1</i>	<i>KHDRBS1</i>	<i>SRSF9</i>	
<i>SNRNP200</i>	<i>RBM22</i>		<i>SRRM4</i>	<i>SRSF1</i>	<i>RBM3</i>	<i>SRSF10</i>	

Anexo 4. Clasificación de los genes medidos en el array de qPCR. Los genes medidos se encuentran divididos en 3 grupos: componentes del *spliceosoma* mayor, componentes del *spliceosoma* menor y factores de *splicing*.

Anexo 5

	Correlaciones		Asociaciones		
	Grado Gleason	Estadio tumoral	Invasión perineural	Invasión linfovascular	CaPSig
<i>RNU4</i>	0,122	0,239*	9664718823 ± 3162530673 **	7730140948 ± 3078119236 *	7526218231 ± 3298861131 *
<i>RNU6</i>	0,235*	0,075	230034826 ± 7 2616606 **	119362920 ± 102513311	163738961 ± 75084561 *
<i>PRPF40A</i>	0,184	0,214	1801231 ± 878336 *	1669010 ± 855998	1789300 ± 832618 *
<i>SF3B1</i>	0,312**	0,121	9003875 ± 3487752 *	10853954 ± 4783529 **	5808930 ± 3941225
<i>U2AF2</i>	0,09	0,083	714287 ± 348778 *	807889 ± 481128	347329 ± 370880
<i>SNRNP200</i>	0,264*	0,247*	2681185105 ± 1175955224 *	2812777484 ± 1275566115 *	2125357393 ± 1042911480 *
<i>RNU12</i>	0,321**	0,178	395441 ± 132486 **	133816 ± 149579	208236 ± 139628
<i>ESRP1</i>	0,319**	0,166	1658118 ± 916550	2151271 ± 1084569	1874015 ± 936328 *
<i>ESRP2</i>	0,281*	0,254*	1953298 ± 1179570	3964985 ± 1266549 **	2941102 ± 1300974 *
<i>KHDRBS1</i>	0,128	0,215	8816079 ± 4355945 *	7047264 ± 5942380	10326770 ± 4988242 *
<i>MAGOH</i>	0,331**	0,173	572836 ± 376052	1036475 ± 489737 *	772768 ± 395132
<i>NOVA1</i>	0,131	0,211	1375554 ± 1240422	2891594 ± 1397232 *	1968158 ± 1417671
<i>PTB</i>	0,189	0,197	462842 ± 504081	707443 ± 685520	923496 ± 547502
<i>RBM3</i>	0,141	0,139	1831860 ± 1133513	2948642 ± 1333148 *	2051801 ± 1189264
<i>RBM45</i>	0,145	0,159	2144099 ± 1086705	2444946 ± 1430495	1613514 ± 1237865
<i>SND1</i>	0,236*	0,167	6829797 ± 3127408 *	8116316 ± 3698131 *	7483290 ± 3461207 *
<i>SRSF2</i>	0,284*	0,161	903780 ± 409990 *	1099682 ± 533886 *	914182 ± 460892
<i>SRSF3</i>	0,289*	0,274*	13698858 ± 5050576 **	12653631 ± 5712504 *	10070038 ± 5031330 *
<i>SRSF4</i>	0,139	0,169	2131612 ± 857251 *	3422072 ± 1068338 **	941268 ± 902489
<i>SRSF5</i>	0,055	0,129	105348741 ± 37924790 **	141185003 ± 48026387 **	35477260 ± 37643655
<i>SRSF9</i>	0,088	0,211	33397890 ± 12917648 *	28501453 ± 15538733	26539564 ± 14468693
<i>SRSF10</i>	0,057	0,218	10135257 ± 4077596 *	10622878 ± 5604567	4248356 ± 4293783

<i>SRRM1</i>	0,211*	0,224*	9522292 ± 4314271 *	9444197 ± 4007860 *	9478531 ± 4760093 *
<i>SRRM4</i>	-0,154	0,107	53981 ± 33971	-2375 ± 34689	47458 ± 36610
<i>TIA1</i>	0,114	0,246*	5965156 ± 2459924 *	6334929 ± 2989097	5493989 ± 2630409*
<i>TRA2A</i>	0,141	0,191	27361791 ± 12693441 *	39100412 ± 15368002	29010940 ± 15801444

Anexo 5. Correlaciones y asociaciones del nivel de expresión de los elementos de la maquinaria de splicing desregulados con parámetros clínicos de agresividad tumoral. Los datos de las correlaciones representan el coeficiente “r”. Los datos de las asociaciones representan la diferencia entre las medias de cada grupo ± desviación estándar. CaPSig, cáncer de próstata significativo (Gleason ≥ 7). Los asteriscos (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) representan diferencias estadísticamente significativas entre grupos.

Anexo 6

Factor	Log-Rank	p valor
<i>RNU4</i>	1,822	0,177
<i>RNU6</i>	5,046	0,025
<i>PRPF40A</i>	4,938	0,026
<i>SF3B1</i>	4,012	0,045
<i>U2AF2</i>	4,222	0,040
<i>RNU12</i>	2,844	0,092
<i>ESRP1</i>	3,201	0,074
<i>ESRP2</i>	5,049	0,025
<i>KHDRBS1</i>	4,455	0,035
<i>MAGOH</i>	2,540	0,111
<i>NOVA1</i>	4,758	0,029
<i>PTBP1</i>	4,407	0,036
<i>RBM3</i>	1,631	0,202
<i>RBM45</i>	5,075	0,024
<i>SND1</i>	4,992	0,025
<i>SRSF2</i>	4,632	0,031
<i>SRSF4</i>	3,722	0,054
<i>SRSF5</i>	3,944	0,047
<i>SRSF9</i>	4,349	0,037
<i>SRSF10</i>	3,971	0,046
<i>SRRM4</i>	1,703	0,192
<i>TIA1</i>	4,551	0,033
<i>TRA2A</i>	4,702	0,030

Anexo 6. Asociación del nivel de expresión de los elementos de la maquinaria de splicing desregulados con el desarrollo de recidiva bioquímica en cáncer de próstata. Los datos fueron calculados por medio de la prueba de Mantel-Cox (Log-Rank).