



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los
microRNAs-138-5p y 455-3p en células de
melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-
deoxiuridina y su asociación con proliferación,
adhesión, migración y viabilidad celular**

Esther Natalia Muñoz Roa

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Medicina, Departamento de ciencias Fisiológicas
Bogotá, Colombia

2020

Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

Esther Natalia Muñoz Roa

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Bioquímica

Director:

PhD., M. D. Luis Alberto Gómez Grosso

Profesor catedrático titular

Departamento de Ciencias Fisiológicas

Facultad de Medicina

Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Bases moleculares de la diferenciación tumoral y transformación maligna

Grupo de Investigación:

Fisiología Molecular

Instituto Nacional de Salud

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Medicina, Departamento de ciencias Fisiológicas

Bogotá, Colombia

2020

*Confía en el Señor con todo tu corazón;
no dependas de tu propio entendimiento.
Busca su voluntad en todo lo que hagas,
y él te mostrará cuál camino tomar.
No te dejes impresionar por tu propia sabiduría.
En cambio, teme al Señor y aléjate del mal.
Entonces dará salud a tu cuerpo
y fortaleza a tus huesos.*

Proverbios 3:5-8

Agradecimientos

A Dios Padre por su Soberanía, a Jesucristo Hijo por su ejemplo de Integridad, al Espíritu Santo, por su consejo y compañía.

Agradezco al Doctor Luis Alberto Gómez, por la confianza depositada en mí, su ejemplo de entrega y compromiso; a los compañeros del grupo de Fisiología Molecular, por compartir de su tiempo, ayuda y conocimientos.

A Mauricio, porque fuiste un instrumento de Dios para guiarme durante este proceso, tu paciencia, perseverancia y búsqueda de la excelencia permitieron finalizar esta etapa.

A mi Familia, su apoyo y amor incondicional son mi mayor motor.

Resumen

Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

ROCK 2 participa en la reestructuración del citoesqueleto, adhesión y contractilidad celular; aunque se conoce su asociación con la proliferación, migración e invasión en diferentes modelos celulares, poco se sabe sobre las bases moleculares de su regulación en células de melanoma. El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios en la morfología, proliferación y las variaciones de expresión de ROCK 2, miR-138-5p y miR-455-3p, dianas moleculares de ROCK 2, en células B16F1 expuestas al análogo de timidina, 5- Bromo-2'- deoxiuridina (BrdU). La exposición a BrdU (72 h) indujo una disminución del 65% en la proliferación, y un fenotipo senescente con aumento de 2,2 veces en el área celular aparente, aumento de 1,27 veces en el diámetro y la granulación. Las células expuestas mejoraron su capacidad de adhesión, circularidad y cierre de heridas y disminuyeron su migración en la cámara de Boyden en un 86,6%. La expresión de la proteína ROCK 2 mostró una disminución de aproximada de 3 veces en su mRNA, y después de la adición de un inhibidor de su actividad (Y27632), se observaron variaciones en la movilidad, polimerización de F-actina y VIM. Estos resultados coincidieron con una disminución de la expresión de miR-138-5p (1,8 veces) y un aumento de miR-455-3p (2,39 veces). En general, es posible sugerir que ROCK 2 participa en la regulación de los cambios morfológicos observados después de la exposición a BrdU, y su acción podría estar regulada, al menos en parte, por la expresión de miR-138-5p y miR-455-3p.

Palabras clave: Melanoma, miRNAs, 5-Bromo-2'-deoxiuridina, invasión, migración, proliferación.

Abstract

Expression of ROCK Kinase 2 and microRNAs-138-5p and 455-3p in B16 melanoma cells exposed to 5-Bromo-2'-deoxyuridine and its association with cell proliferation, adhesion, migration and viability

ROCK 2 is involved in cytoskeleton restructuring, cell adhesion and contractility; although its association with proliferation, migration and invasion is known in different cell models, little is known about the molecular basis of its regulation in melanoma cells. The aim of this work was to evaluate changes in morphology, proliferation and expression variations of ROCK 2, miR-138-5p and miR-455-3p, molecular targets of ROCK 2, in B16F1 cells exposed to the thymidine analog, 5- Bromo-2'- deoxyuridine (BrdU). Exposure to BrdU (72 h) induced a 65% decrease in proliferation, and a senescent phenotype with 2.2-fold increase in apparent cell area, 1.27-fold increase in diameter and granulation. Exposed cells improved their adhesion, circularity and wound closure capacity and decreased their migration in the Boyden chamber by 86.6%. ROCK 2 protein expression showed an approximately 3-fold decrease in its mRNA, and after addition of an inhibitor of its activity (Y27632), variations in motility, F-actin polymerization and VIM were observed. These results coincided with a decrease in miR-138-5p expression (1.8-fold) and an increase in miR-455-3p (2.39-fold). Overall, it is possible to suggest that ROCK 2 participates in the regulation of the morphological changes observed after BrdU exposure, and its action could be regulated, at least in part, by the expression of miR-138-5p and miR-455 -3p.

Keywords: Melanoma, miRNAs, 5-Bromo-2'-deoxyuridine, invasion, migration, proliferation.

Contenido

	Pág.
Resumen	VII
Lista de figuras	XI
Lista de tablas	XII
Introducción	1
1. Objetivos	5
1.1 Objetivo general	5
1.2 Objetivos específicos	5
2. Marco teórico	7
2.1 Melanoma.....	7
2.1.1 Movilidad en melanoma	9
2.2 Proteína cinasa asociada a Rho 2 (ROCK 2).....	11
2.3 MicroRNAs en melanoma	14
2.3.1 miRNA-138 y mRNA-455	17
2.4 5- Bromo- 2`- Desoxiuridina (BrdU).....	18
3. Metodología	21
3.1 Diseño experimental	21
3.2 Materiales y métodos.....	22
3.2.1 . Cultivo celular	22
3.2.2 . Exposición a 5- Bromo-2`-deoxiuridina BrdU y Y27632	22
3.2.3 . Viabilidad celular por exclusión con azul Tripan.....	23
3.2.4 . Proliferación celular por MTT- reductasa.....	23
3.2.5 . Análisis morfológicos.....	24
3.2.6 . Ensayos de movilidad celular.....	24
3.2.7 . Inmunofluorescencia	26
3.2.8 . Western Blot	27
3.2.9 . Procesamiento de RNA.....	28
▪ 9.1. Extracción de RNA total y enriquecimiento de pequeños RNAs	28
▪ 9.3. RT-qPCR.....	29
▪ 9.4. RT-qPCR stem loop de miRNAs	29
4. Resultados y análisis	31
4.1 <i>Cambios en la proliferación y morfología en células B16F1 tras exposición a BrdU.</i>	31

X	Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular	
---	---	--

4.2	<i>Variaciones en la expresión de las proteínas ROCK 2 y VIM implicadas en la citoarquitectura de células B16F1 expuestas a BrdU</i>	35
4.3	Alteraciones en la movilidad de células B16F1 expuestas BrdU.....	38
4.4	<i>Variación en la expresión de los mRNAs Rock2 y Vim y de los mir-455-3p y miR-138-5p</i>	44
5.	Discusión	47
6.	Conclusiones y recomendaciones	53
6.1	Conclusiones.....	53
6.2	Recomendaciones.....	53
A.	Anexo: Diseño de primers para RT-qPCR <i>stem loop</i> del miR-455-3p	54
B.	Anexo: Diseño de primers para RT-qPCR <i>stem loop</i> del miR-138-5p	56
C.	Anexo: Diseño de primers para RT-qPCR <i>stem loop</i> del snRNA U6	58
	Bibliografía	59

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1. Cambios en la proliferación, morfología y tamaño de células B16F1 expuestas a BrdU	32
Figura 2. Variación en la expresión de mROCK2 y mVIM en células B16F1 tras la exposición a BrdU.....	37
Figura 3. Cambios en la circularidad, adhesión y migración de células B16F1 tras la exposición a BrdU.....	41
Figura 4. Variación en la expresión del mRNA de Rock2, Vim y de los miR-455-3p y miR-138-5p en células B16F1 expuestas a BrdU.....	45

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 1. Listado de cebadores usados en RT-qPCR y RT-qPCR <i>stem loop</i>	30
Tabla 2. Número de células viables por ensayo de Azul Tripán, para 3 replicas Independientes.	33
Tabla 3. Número de células Viables por ensayo de actividad MTT reductasa para 4 réplicas independientes.	33
Tabla 4. Área celular aparente en μm^2 , para células adheridas a sustrato en 3 replicas independientes.	33
Tabla 5. Diámetro celular en μm , para células en suspensión en 3 replicas independientes.	34
Tabla 6. Porcentaje de eventos distribuidos por cuartiles y obtenidos mediante citometría de flujo para 3 replica sindependientes.	34
Tabla 7. Inmunofluorescencia de ROCK 2 en unidades arbitrarias para 3 replicas independientes.	37
Tabla 8. Promedios del área normalizada en función del tiempo para 7 réplicas.	38
Tabla 9. Constante τ_1 expresada en segundos para 7 réplicas independientes.	39
Tabla 10. Constante τ_2 expresada en segundos para 7 replicas independientes.	39
Tabla 11. Constante t_{Total} determinada a partir de la suma de τ_1 τ_2 y expresada en segundos para 7 replicas independientes.	40
Tabla 12. Número de células desprendidas tras la adición de Tripsina-EDTA para 3 replicas independientes.	40
Tabla 13. Número de células que atravesaron la membrana en cámara Boyden para 4 replicas independientes.	43
Tabla 14. Porcentaje de cierre de herida determinado desde las 0 h hasta las 24 h para 3 replicas independientes.	43
Tabla 15. Radio de expresion relativa (rER) para Rock 2 con respecto al gen constitutivo GADPH para 4 replicas independientes.	45
Tabla 16. Radio de expresion relativa (rER) para Vim con respecto al gen constitutivo GADPH para 4 replicas independientes.	46
Tabla 17. Radio de expresion relativa (rER) para miR-455-3p con respecto al snRNA U6 para 3 replicas independientes.	46
Tabla 18. Radio de expresion relativa (rER) para mir-138-5p con respecto al snRNA U6 para 3 replicas independientes.	46

Lista de Símbolos y abreviaturas

Símbolos con letras latinas

Símbolo	Término	Unidad SI
\bar{A}	Área normalizada	μm^2
A_f	Área final	μm^2
A_t	Área total	μm^2
A_i	Área inicial	μm^2
τ_1	Tiempo de inicio de la circularidad	sg
τ_2	Tiempo de circularidad desde τ_2	sg
τ_{total}	Tiempo total de circularidad	sg

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>5hmC</i>	5-hidroximetilcitosina
<i>ABPs</i>	proteínas de unión a actina
<i>Akt</i>	Proteína Cinasa B
<i>AMPK</i>	proteína quinasa activada por AMP
<i>Arp2/3</i>	proteínas relacionadas con la actina
<i>ARPC2</i>	subunidad 2 del complejo de proteína 2/3 relacionada con la actina
<i>ATP</i>	adenosín trifosfato
<i>BRAF^{V600E}</i>	mutación en homólogo B del oncogén viral del sarcoma murino v-Raf
<i>BrdU</i>	5 – Bromo - 2' - deoxiuridina
<i>BSA</i>	albumina sérica bovina
<i>c-Kit</i>	gen de tirosina-proteína quinasa KIT
<i>CCND1</i>	ciclina D1
<i>CCND3</i>	ciclina D3
<i>Cdc42</i>	homólogo de la proteína 42 de control de la división celular
<i>CDK4</i>	cinasa dependiente de ciclina 4
<i>CDKN2A/p16</i>	El inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (p16)

XIV Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

Abreviatura	Término
<i>cDNA</i>	adenosín trifosfato complementario
<i>CPEB1</i>	proteína 1 de unión al elemento de poliadenilación citoplasmática
<i>CPI-17</i>	subunidad reguladora de proteína fosfatasa 1 14A
<i>CR1K</i>	citrón cinasa
<i>CTTN</i>	proteína de unión a actina cortical
<i>DEPC</i>	dietil pirocarbonato
<i>DMPK</i>	distrofia miotónica cinasa
<i>DMSO</i>	dimetil sulfóxido
<i>DNA</i>	adenosín trifosfato
<i>DOCK3</i>	dedicador de citocinesis 3
<i>ECM</i>	matriz extracelular
<i>EDTA</i>	ácido etilendiaminotetraacético
<i>EMT</i>	transición epitelio mesenquimal
<i>EZH2</i>	Histona lisina metiltransferasa
<i>F-actina</i>	actina filamentosa
<i>FITC</i>	Isotiocianato de fluoresceína
<i>FSC-A</i>	área de dispersión delantera
<i>H2AX</i>	miembro X de la familia de histonas H2
<i>H3K9m3</i>	histona 3 lisina 9 trimetilada
<i>HDAC</i>	histona deacetilasa
<i>HIF-1α</i>	subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia
<i>hTERT</i>	telomerasa transcriptasa inversa humana
<i>IMF</i>	intensidades medias de fluorescencia
<i>Jak</i>	Janus cinasa
<i>JNK</i>	Quinasas c-Jun N-terminal
<i>LIMK</i>	Lim cinasa
<i>lncRNA</i>	RNAs largos no codificantes
<i>MAPK</i>	proteína cinasa activada por mitógeno
<i>MCAM</i>	Molécula de adhesión celular de melanoma
<i>mDia</i>	homólogo diáfano 1 de Drosophila de ratón
<i>miRNAome</i>	miRNAs codificados por el genoma
<i>MITF</i>	Factor de transcripción asociado a microftalmia
<i>MLC</i>	la cadena ligera de miosina
<i>MLC2</i>	cadena ligera de miosina 2
<i>MLCK</i>	cinasa dependiente de calcio
<i>MLCP</i>	MLC fosfatasa
<i>MMP(1-3-9)</i>	matriz metaloproteinasas
<i>MRCK</i>	cinasa de unión a Cdc42
<i>mRNA</i>	ácido ribonucléico mensajero
<i>MTT</i>	bromuro de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio

Abreviatura	Término
<i>MYC</i>	proteína homóloga de oncogén viral de mielocitomatosis aviar
<i>ncRNAs</i>	RNAs no codificantes
<i>Need9</i>	proteína 9 regulada negativamente en el desarrollo
<i>NRAS</i>	Homólogo del oncogén viral RAS de neuroblastoma
<i>p53</i>	proteína de 53 KDa
<i>PcG</i>	complejos silenciadores transcripcionales Polycomb
<i>PDK1</i>	Quinasa dependiente de fosfoinositol-1
<i>PH</i>	homólogo a Pleckstrina
<i>PI3K</i>	Fosfoinositol 3-cinasa
<i>PRL-1</i>	Papel de la fosfatasa de regeneración hepática 1
<i>PTEN</i>	fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
<i>Rac1</i>	sustrato 1 de toxina botulínica C3 relacionada con Ras
<i>RAF</i>	gen fibrosarcoma rápidamente acelerado
<i>RAS</i>	proteína sarcoma de rata
<i>Rb</i>	proteína del retinoblastoma
<i>RBD</i>	dominio de unión a Rho
<i>rER</i>	radio de expresión relativa
<i>Rho</i>	proteínas homólogas de Ras
<i>RNA</i>	ácido ribonucleico
<i>ROCK 1/ ROKβ</i>	Proteína cinasa asociada a Rho 1
<i>ROCK 2/ ROKα</i>	Proteína cinasa asociada a Rho 2
<i>SAβ -gal)</i>	actividad β -galactosidasa asociada a senescencia
<i>snRNA U6</i>	pequeño RNA nuclear U6
<i>SSC-A</i>	área de dispersión lateral
<i>STAT</i>	proteína trasdutora de señal y activador de transcripción
<i>TCF4</i>	factor de transcripción 4
<i>TGF-β</i>	Factor de crecimiento transformante beta
<i>TRP1</i>	Proteína 1 relacionada con la tirosinasa
<i>TRP2/Dct</i>	Dopacromo tautomerasa
<i>TYR</i>	Tirosinasa
<i>VIM</i>	Vimentina
<i>Wnt</i>	gen int-1 de drosophila
<i>Y27632</i>	(1R, 4r) -4 - ((R) -1-aminoetil) -N- (piridin-4-il) ciclohexanocarboxamida

Introducción

El melanoma cutáneo es un cáncer que surge de la proliferación incontrolada de los melanocitos, células encargadas de la pigmentación, y aunque representa tan sólo el 4% de los tumores malignos de piel, es el responsable del 80% de la mortalidad por este cáncer en el mundo (Esteva et al. 2017). En las últimas décadas, la incidencia mundial de melanoma en poblaciones de piel clara predominante como en Norteamérica, Australia, Nueva Zelanda y el Norte de Europa, ha aumentado del 4 al 6% (Kosary et al. 2014; Rigel and Carucci 2008); solo en los Estados Unidos para el año 2017, se reportaron 87.110 nuevos casos (Matthews et al. 2017; Guy et al. 2015). En Colombia, para 2019, 4.237 pacientes fueron diagnosticados con melanoma, lo que representa el 1% de todas las incidencias por cáncer en el país (“Cuenta de Alto Costo, Asamblea General Ordinaria, Anexo Técnico” 2020).

La clasificación actual del melanoma cutáneo es prácticamente clínica e histopatológica y obedece a criterios observados macroscópicamente (Esteva et al. 2017). Aunque se reconocen vías de señalización comúnmente alteradas como las vías RAS/RAF/MAPK, JNK, PI3K/Akt, Jak/STAT, Rho/Ras/ROCK 2 y MITF (Sarkar et al. 2015; Van den Hurk et al. 2012), la alta heterogeneidad molecular y funcional encontrada en este cáncer, dificulta una caracterización molecular, adicionalmente, en estadios metastásicos, la probabilidad de supervivencia de pacientes con melanoma es inferior al 10% (Gray-Schopfer, Wellbrock, and Marais 2007), por lo que avances en el establecimiento de los actores moleculares y las condiciones celulares relacionadas con invasión y metástasis en melanoma, son determinantes para el desarrollo de estrategias de prevención, diagnóstico temprano y pronóstico.

En modelos *in vitro*, los fenómenos de invasión y metástasis implican alteraciones en la movilidad celular, que involucran la reorganización de proteínas estructurales del citoesqueleto celular (Bonaventure, Domingues, and Larue 2013; Hideki Yamaguchi and Condeelis 2007). Las cinasas ROCK son conocidas por modular la polimerización de los filamentos de actina (F-actina), la contractilidad actina-miosina a través de la fosforilación y activación de la cadena ligera de miosina 2 (MLC2) (Amano et al. 1996) y la reorganización de los filamentos intermedios de vimentina (VIM) (Goto et al. 1998; Sin et al. 1998). En melanoma, se han propuesto los requerimientos de señalización Rho/ROCK como indicadores de supervivencia en pacientes (Sahai and Marshall 2003), y su inhibición farmacológica (particularmente ROCK 2) parece reducir la invasión y el crecimiento tumoral en células de melanoma de ratón B16 (Nakajima et al. 2003). Adicionalmente, estudios recientes que evalúan la regulación post-transcripcional de ROCK 2 mediada por microRNAs (miRNAs), han permitido identificar que la sobreexpresión de los miRNAs miR-124, miR-101, miR-139, miR-130a, miR-23a y la familia miR-200b/c, afecta la movilidad, metástasis y tumorigénesis en diferentes modelos celulares (F. Zheng et al. 2012; Y. Zheng et al. 2018; F. Zheng et al. 2015; Wong et al. 2011).

El análogo de la timidina, la 5 – Bromo - 2' - deoxiuridina (BrdU), se incorpora en el DNA generando inestabilidad, por lo que ha sido ampliamente usado como radio sensibilizador en diferentes tipos de cáncer (Djordjevic and Szybalski 1960; Prados et al. 2004). Aunque es desconocido su mecanismo de acción, su exposición induce, en modelos de melanoma *in vitro*, disminución en la proliferación y pigmentación, cambios en la citoarquitectura celular, mayor extensión, mayor aplanamiento y aumento en la adherencia a la matriz extracelular (Bonaventure, Domingues, and Larue 2013; M Rieber et al. 1984; Wrathall et al. 1973), fenotipo asociado a senescencia que sería el resultado de cambios en la expresión de genes como TYR, TRP1, TRP2, MITF, ciclina D1 y PRL-1 (Wrathall et al. 1973; Peñalosa 2000; Gunturiz and Gómez 2011). En el grupo de investigación de Fisiología Molecular del instituto Nacional de Salud, se han identificado, cambios en la expresión del miR138 y miR470, asociados con el silenciamiento de la Ciclina D1 en células de melanoma B16 en senescencia inducida por exposición a BrdU (Flórez Vargas and Gomez 2008) y recientemente, mediante *small* RNAseq, se identificaron conjuntos de microRNAs diferencialmente expresados que tendrían como

blancos moleculares genes asociados a ciclo celular y melanogénesis en el mismo modelo (tesis doctoral, GEO: GSE147170). Sin embargo, en las células B16 expuestas a BrdU, aún se desconoce si las alteraciones en la citoarquitectura tendrían incidencia en la movilidad celular y la posible participación de ROCK 2 y dos de sus potenciales miRNAs reguladores. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluaron las variaciones en la expresión de ROCK 2 y de los miRNAs miR-138-5p y miR-455-3p (que por predictores tienen como blanco molecular a ROCK 2), así como los cambios en la proliferación, adhesión y migración celular en células B16F1 expuestas a BrdU.

1. Objetivos

1.1 Objetivo general

Evaluar la expresión de la cinasa ROCK 2 y de los micro-RNAs miR-138-5p y miR-455-3p y su potencial relación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad de células de melanoma B16F1 expuestas a 5 - Bromo -2`deoxiuridina (BrdU).

1.2 Objetivos específicos

- Confirmar el efecto de la 5 - Bromo -2`deoxiuridina (BrdU) sobre la viabilidad, la capacidad de proliferación, adhesión y migración en células de melanoma de ratón B16F1.
- Determinar los niveles de expresión de mRNA y de proteína de ROCK 2 y de miR-138-5p y miR-455-3p en células de melanoma B16F1 expuestas a BrdU.

2. Marco teórico

2.1 Melanoma

El melanoma es una neoplasia maligna de melanocitos, células derivadas de la cresta neural (Sommer 2011), distribuidas alrededor del cuerpo (incluida la piel, iris y recto) y encargadas de la producción de melanina, pigmento responsable de la coloración y protección de la piel (Kosary et al. 2014; Schadendorf et al. 2015). Aunque puede originarse en las superficies de mucosas, el tracto uveal y las leptomeninges (Matthews et al. 2017), el melanoma cutáneo es la forma más común en el mundo occidental a la que se atribuye el 75% de muertes relacionadas con cáncer de piel (Lawrence et al. 2013). En los últimos 50 años el número de casos de melanoma reportados ha aumentado más rápido que cualquier otro tipo de cáncer en el mundo, su incidencia global es de 15 a 25 por cada 100.000 habitantes, y se sugiere que esta se duplicará cada 10 a 20 años (Garbe and Leiter 2009; Bray et al. 2018). En Colombia se mayores casos de melanoma en mujeres que en hombres (razón de 1.6:1), una media de edad de 62 años y un aumento en su aparición a partir de los 40 años (Acuña Merchán, Sánchez Quintero, and Ramírez Barbosa 2017). Para el año 2019 fueron confirmados 4.237 casos de melanoma en Colombia, de los cuales el 73.9% corresponde a melanoma invasivo. Las regiones colombianas que presentan mayor incidencia son la región central con 1.05 y Bogotá con 1.03 casos por cada 100.000 habitantes (“Cuenta de Alto Costo, Asamblea General Ordinaria, Anexo Técnico” 2020)

La búsqueda de los mecanismos moleculares que permitan explicar el desarrollo y la progresión del melanoma, ha permitido identificar alteraciones génicas comunes entre pacientes. Se reporta que la predisposición genética solo se produce en

aproximadamente del 8 al 10% de todos los casos y que de estos el 40% poseen mutaciones en el locus del inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 2A (CDKN2A), que produciría un control defectuosos del ciclo celular por la pérdida de dos reguladores importantes de la homeostasis celular, Rb y p53 (Goldstein et al. 2006; FitzGerald et al. 1996; Sheppard and McArthur 2013). Además de la predisposición familiar, se reconocen mutaciones somáticas en oncogenes y supresores tumorales con alta frecuencia como son los genes *BRAF*^{V600E} (50% al 70%), *NRAS* (15% a 30%), *KIT* (<17%) y *PTEN* (10%) (Tsao et al. 1998), que pueden resultar en alteraciones de vías de señalización claves para la patogénesis de esta enfermedad, como la vía de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAPK) cuya hiperactividad ha sido reportada en el 90% de los casos (Cohen et al. 2002).

Diversas estrategias terapéuticas desarrolladas en melanoma, se han enfocado principalmente en el tratamiento de estadios tempranos, donde existe una probabilidad de supervivencia de los pacientes del 90%; sin embargo, estas estrategias presentan particular dificultad en estadios posteriores, donde la posibilidad de supervivencia no supera el 10%, especialmente al producirse metástasis hacia otros órganos (Gray-Schopfer, Wellbrock, and Marais 2007). En estadios metastásicos, se reconocen comúnmente alteradas las vías MAPK, PI3K y Wnt- β -catenina que favorecerían el tropismo del melanoma hacia ganglios linfáticos y pulmón (H. Wu, Goel, and Haluska 2003; Larue, Kumasaka, and Goding 2003; Damsky et al. 2011); adicionalmente se han observado modificaciones en las integrinas (Van Belle et al. 1999; Kuphal, Bauer, and Bosserhoff 2005; Saalbach et al. 2005; Rebhun et al. 2010), así como la necesidad de las metaloproteinasas MMP1, MMP2 y MMP9 en la degradación de la matriz extracelular (ECM) promoviendo la progresión tumoral (Huntington et al. 2004; Hofmann et al. 2000). Existe evidencia que sugiere que tanto la disminución en la expresión de E-cadherina (Haass, Smalley, and Herlyn 2003; Bonaventure, Domingues, and Larue 2013), como las expresiones alteradas de la proteína adaptadora Need9 (Ahn, Sanz-Moreno, and Marshall 2012) y el factor de transcripción TGF- β (N. Zhu et al. 2004) se encuentran relacionados con el desarrollo de un fenotipo mesenquimal que facilitaría la movilidad a través de la ECM.

2.1.1 Movilidad celular en melanoma

Los fenómenos de invasión y metástasis en células cancerígenas involucran cambios en la migración celular. Las células de melanoma poseen múltiples modalidades de migración que les permite adaptarse a microambientes particulares (Hoek et al. 2008) e incluso, ha sido propuesto, que pueden reactivar de manera aberrante programas de movilidad de la cresta neural embrionaria (Hoek and Goding 2010).

El reconocimiento de las estructuras y dinámicas moleculares implicadas en la movilidad celular, ha sido posible mediante el uso de modelos *in vitro*, principalmente a través de cultivos celulares en sustratos rígidos como plástico o vidrio (sistemas 2D). Las células adherentes que migran en superficies 2D, forman extensiones citoplasmáticas (lamelopodios o filopodios) que son estimuladas por la polaridad celular como consecuencia de señales externas (Lauffenburger and Horwitz 1996). Estas protrusiones generan complejos de adhesiones focales necesarios para la retracción y posterior translocación del cuerpo celular (Spiering and Hodgson 2011) e implican una reorganización altamente regulada del cito esqueleto (H. Byers et al. 1991). Al respecto, en cultivos celulares de melanoma, se han reportado alteraciones en la ubicación de las proteínas α -actinina e integrina β 1 en contactos focales nacientes, aumento en expresión de las proteínas de unión a actina (ABPs – por sus siglas en inglés) en líneas celulares con altas tasas de migración (H. R. Byers et al. 1992) así como la sobre expresión de las pequeñas moléculas de unión a GTP (Rho GTPasas) RhoA, RhoC y RhoE (Clark et al. 2000; Sahai et al. 2007; Sarraayrouse et al. 2007; Hodis et al. 2012), las cuales actúan como un nodo de convergencia reguladora que dicta la reorganización del citoesqueleto y las dinámicas de adhesión por organización de los microtúbulos (Hall 2005; Bonaventure, Domingues, and Larue 2013). Adicionalmente, se ha descrito la participación de MITF en migración de melanoma como regulador de la transcripción de las proteínas mDia, pertenecientes a la familia de forminas y encargadas de la elongación de lamelopodios y filopodios por protección de los extremos de actina filamentosa (Carreira et al. 2006).

Recientemente ha sido introducido el cultivo celular en matrices de 3D, que permite simular de manera precisa las condiciones de la ECM (Doyle et al. 2015). En este modelo se ha reconocido tradicionalmente que las células podrían interconvertir entre dos formas de migración: migración mesenquimal, que se parece en gran medida a la migración en 2D, ya que las células adquieren una morfología alargada con prolongaciones citoplasmáticas, que en este caso se denominan pseudópodos y les permiten la interacción de integrinas de membrana con la ECM mediante la formación de adhesiones focales con presencia de metaloproteinasas de matriz (MMP) requeridas para la degradación y remodelación de la ECM (Cukierman et al. 2001; Wolf et al. 2007); y la migración amebioide, asociada comúnmente con morfología redondeada, independiente de integrinas, con carencia de adhesiones focales y caracterizada por la formación de extensiones esféricas denominadas vesículas (Lämmermann and Sixt 2009).

De manera similar a los modelos 2D, en los modelos 3D se ha identificado la importante participación de las GTPasas en la movilidad celular. La migración amebioide es regulada por fosforilación de la cadena ligera de miosina 2 (MLC2) mediante la unión de las GTPasas Rho a la familia de cinasas Rock, que promueven formación de las fibras de estrés de actina y la fuerza necesaria para el movimiento (Sanz-Moreno et al. 2008; Ju, Stehbens, and Haass 2018). En contraste, en la migración mesenquimal, las células de melanoma forman el complejo Need9—DOCK3, que activa a la GTPasa Rac1, quien inhibe la vía Rho/Rock y modula la polimerización del citoesqueleto de actina mediante la regulación del complejo Arp2/3 y la proteína cofilina (Sanz-Moreno et al. 2008). Además de permitir el reconocimiento de diferentes tipos de migración, estos requerimientos opuestos de señalización Rho/Rock han sido propuestos como un indicador de la supervivencia en pacientes (Sahai and Marshall 2003). Sin embargo, poco se conoce acerca del papel de las Rock quinasas en movilidad de melanoma y su regulación en modelos de supresión de crecimiento inducido, que impliquen reorganizaciones del citoesqueleto.

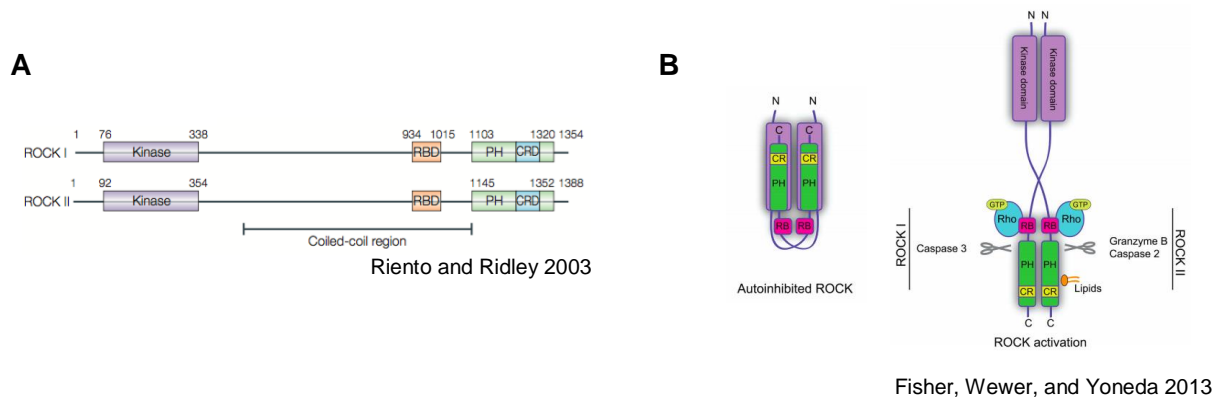
2.2 Proteína cinasa asociada a Rho 2 (ROCK 2)

ROCK es una familia de proteínas cinasas serina/treonina de masa molecular aproximada de 160 Kda, que son homólogas estructurales de la distrofia miotónica cinasa (DMPK), de la cinasa de unión a Cdc42 (MRCK) y la citrón cinasa (CRIK) (Riento and Ridley 2003). La familia ROCK fue inicialmente caracterizada como efectora de las pequeñas GTPasas Rho (Rho, Rac y Cdc42) (Thomas Leung et al. 1995; Ishizaki et al. 1996), que están implicadas en la reorganización del citoesqueleto mediante la regulación de las fibras de estrés de actina, formación de lamelopodios y filopodios, así como la dinámica de los microtúbulos y polaridad celular (Hall 2005). Las proteínas ROCK están compuestas por un dominio cinasa catalítico en la región amino terminal (residuos 73 – 405), una región helicoide enrollada (residuos 425 – 1100) que contiene el dominio de unión a Rho (RBD) donde se producirá la activación y un dominio C-terminal (residuos 1103 – 1230) homólogo a Pleckstrina (PH), que posee una región interna rica en cisteínas (Hall 2005). El dominio C-terminal de ROCK constituye una región auto inhibitoria ya que se une directamente al dominio de actividad cinasa amino terminal (Amano et al. 1999) (Diagrama 1.B).

La familia ROCK está compuesta por ROCK 1 (ROK β) y ROCK 2 (ROK α), isoformas que poseen un 65% de homología global y un 92% de homología en el dominio cinasa (Diagrama 1.A). Aunque ambas se expresan ubicuamente en la mayoría de tejidos, altos niveles de ROCK 2 han sido encontrados en cerebro y músculo, mientras que ROCK 1 ha sido reportada en tejidos no neuronales incluido hígado, pulmón y testículos (Nakagawa et al. 1996; T Leung et al. 1996). Experimentos de silenciamiento génico sugieren que las dos isoformas poseen funciones celulares diferentes, ROCK 1 parece ser esencial para la formación de fibras de estrés de actina, mientras que ROCK 2 sería necesaria para los procesos de fagocitosis y contracción celular, ambos dependientes de la fosforilación de la cadena ligera de miosina MLC (Yoneda, Multhaupt, and Couchman 2005; Amano, Nakayama, and Kaibuchi 2010).

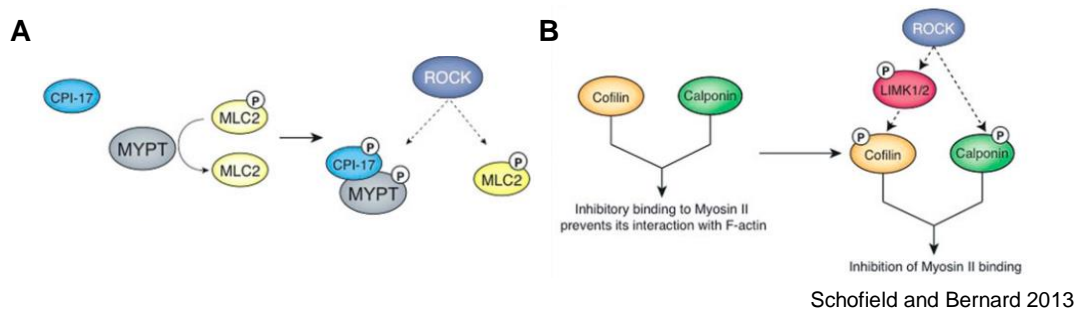
12 Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

Ilustración 1. Estructura y activación de Rock. A) secuencias y dominios de las isoformas ROCK 1 y ROCK 2. B) Modelo de activación de ROCK. La unión de Rho GTPasas, lípidos o incisión mediada por proteasas conducen cambios conformacionales que activan la actividad cinasa.



La contracción celular mediada por actomiosina, consiste en la interacción de la actividad ATPasa de la Miosina II y las fibras de F-actina, la fosforilación de la MLC2, que promueve ésta actividad ATPasa, está regulada por las enzimas MLC cinasa dependiente de calcio (MLCK) y MLC fosfatasa (MLCP) (Riento and Ridley 2003). ROCK 2 regula la contracción de actomiosina de dos maneras, en primer lugar fosforila directamente MLC2 e inhibe la actividad fosfatasa de MLCP por fosforilación (Amano et al. 1996; Totsukawa et al. 2000). En segundo lugar ROCK 2 media la activación de LIMK (Lim cinasa), que resulta en la fosforilación de cofilina y cofilina, impidiendo su actividad inhibitoria y aumentando los niveles de contractilidad por la unión de MLCII/F-actina (Maekawa et al. 1999; Sumi, Matsumoto, and Nakamura 2001) (Diagrama 2).

Ilustración 2. Regulación de las fibras de actina mediada por ROCK 2. A) ROCK fosforila tanto la cadena ligera de miosina (MLC2) como la miosina fosfatasa (MYPT). Además, la fosforilación mediada por ROCK 2 de CPI-17 promueve su unión a MYPT. B) la señalización de ROCK 2 resulta en la fosforilación de Calponina y Cofilina, evitando la inhibición de la unión de la MLC2.



ROCK 2 no solo participa en la remodelación del citoesqueleto celular mediante la regulación de los filamentos de actina, sino que además, provoca el colapso de los filamentos intermedios de vimentina (VIM) induciendo su reorganización (Goto et al. 1998; Sin et al. 1998). Particularmente en melanoma, una expresión aberrante de VIM ha sido propuesta como marcador de metástasis hematogénea (M. Li et al. 2010) y el aumento en su expresión se relaciona con alta capacidad invasiva (Caselitz et al. 1983; Ben-Ze'ev and Raz 1985; Hendrix et al. 1992). Existe otra serie de sustratos de ROCK 2 vinculados con la regulación del citoesqueleto, formación de protrusiones y migración celular incluidos Ezrin / Radixina / Moesina (ERM), Adducina y CPI-17 (Goto et al. 1998; Matsui et al. 1998; Fukata et al. 1999; Kitazawa et al. 2000).

Con el fin de elucidar las funciones fisiológicas de las Rho cinasas, se ha desarrollado una serie de moléculas inhibitoras en distintos modelos celulares y animales. Hasta el 2016 han sido reportados 171 inhibidores de ROCK, proponiéndola como un objetivo terapéutico en enfermedades como el glaucoma, la psoriasis, el lupus eritematoso sistémico, la fibrosis pulmonar idiopática y el cáncer (Feng et al. 2016). Los inhibidores más usados comúnmente son Fasudil (HA-1077) y Y27632, que funcionan como inhibidores competitivos en el sitio de unión a ATP, produciendo cambios conformacionales que aumentan el contacto con la región fosfatasa de ROCK

aumentando su especificidad (Hiroto Yamaguchi, Miwa, et al. 2006; Hiroto Yamaguchi, Kasa, et al. 2006).

La expresión y activación aberrante de ROCK contribuye al desarrollo del cáncer, por lo que sus niveles se encuentran elevados en cáncer de testículo, vejiga y esófago (T Kamai et al. 2002; Takao Kamai et al. 2003; Zhou et al. 2003), así como en líneas celulares de sarcoma (Rösel et al. 2008). En melanoma se ha demostrado que inhibir la actividad de ROCK con Y27632 disminuiría el volumen tumoral en ratones (Routhier et al. 2010), así como la migración y metástasis de células de melanoma *in vitro* e *in vivo* (Nakajima et al. 2003; Sadok et al. 2015); mientras que el knock-out tanto de ROCK 1 como de ROCK 2 tiene efectos significativos en la proliferación y el crecimiento de líneas celulares de melanoma (Kümper et al. 2016). Recientes estudios han evaluado la regulación postranscripcional de ROCK mediada por miRNAs, reportando la inhibición de procesos relacionados con movilidad en diferentes modelos tumorales (X. Li et al. 2018; S.-Y. Chen, Du, and Song 2018), no obstante, aún se desconocen otros miRNAs que tengan como target molecular a ROCK 2, así como los mecanismos de modulación de estos sobre su expresión en melanoma y los procesos celulares asociados a fenómenos de movilidad.

2.3 MicroRNAs en melanoma

Variaciones en la secuencia del DNA genómico no permiten explicar, por si solas, las diferencias fenotípicas y patobiológicas que caracterizan las células de melanoma, por lo que en los últimos años, se ha estudiado el papel de los eventos epigenéticos en el desarrollo y la progresión de melanoma, dentro de los cuales se destaca la metilación aberrante del DNA en la citosina 5-hidroximetilcitosina (5hmC) (Lian et al. 2012; Larson et al. 2014), la pérdida en la expresión de genes supresores mediada por histonas deacetilasas (HDAC) (Flørenes et al. 2004), el incremento en los niveles de la Histona lisina metiltransferasa EZH2, que permite la formación de los complejos silenciadores transcripcionales Polycomb (PcG) (Fan et al. 2011) y variaciones en la expresión de

RNAs no codificantes (ncRNAs) (Hombach and Kretz 2013), los cuales pueden ser ncRNAs largos (lncRNA > 200 bp) y ncRNAs pequeños (<200 bp), de estos últimos los más estudiados son los microRNAs (miRNAs) (Hauptman and Glavač 2013).

Los miRNAs son moléculas pequeñas de aproximadamente 22 pb, que pueden inhibir la traducción de proteínas o causar la degradación del mRNA, uniéndose directamente a la región 3'UTR no codificante de sus diferentes mRNA diana (Bartel 2004). Se ha reportado para diversos procesos biológicos tumorales como crecimiento celular, apoptosis, proliferación, metabolismo, invasión, migración y metástasis, que una expresión aberrante de miRNAs se asocia funcionalmente con cambios en los niveles de sus mRNAs diana y por lo tanto en los niveles de proteína (Kunz 2013). Numerosos estudios utilizando microarreglos y secuenciación de última generación (NGS), encaminados en determinar todos los segmentos de miRNAs codificados por el genoma (miRNAome), han permitido identificar miRNAs que presentarían potencial asociación funcional con diversos procesos biológicos tumorales (Mueller, Rehli, and Bosserhoff 2009; Mueller and Bosserhoff 2010; Caramuta et al. 2010).

Con relación a la migración en melanoma, se ha reportado gran variedad de miRNAs que se encuentran diferencialmente expresados en líneas celulares y muestras de pacientes altamente metastásicas, cuyos blancos moleculares regulan directa o indirectamente la migración celular. Por ejemplo, la sobre-expresión del miR-205, induciría la polimerización de F-actina, así como una reducción en la expresión de E-cadherina, aumentando el potencial metastásico. (S. Liu et al. 2012). El miR-382 se encuentra sub-regulado en melanoma metastásico y dado que posee como targets directos a los reguladores de actina CTTN, RAC1 y ARPC2, al ser inhibido, se observa un aumento de la invasión y la metástasis (Hanniford et al. 2015). La familia let-7 se encontró desregulada en melanoma cutáneo maligno en comparación con los *nevus* benignos, algunos de los blancos moleculares de los miRNAs pertenecientes a esta familia son NRAS, MYC, CCND1, CCND3, CDK4 e integrina β 3, relacionados con proliferación, migración e invasión (Müller and Bosserhoff 2008; J. Chen et al. 2010; Holst et al. 2010). EL miR-21 regula el comportamiento metastásico de las células de melanoma murino

B16 promoviendo la proliferación celular, la supervivencia y la migración. (Yang et al. 2011)

Evidencia adicional sugiere la participación de miRNAs reguladores de procesos proliferativos en células con potencial migratorio. Al respecto, los miRNA-221 y miRNA-222, que provienen de un precursor común, se encuentran sobre-expresados en fenotipos de melanoma más invasivos, disminuyen la expresión de su blanco molecular común c-Kit y aumentan la proliferación, acelerando el ciclo celular (Felicetti, Errico, Segnalini, et al. 2008; Felicetti, Errico, Bottero, et al. 2008). La sobreexpresión de miR-573 *in vitro*, suprimiría la proliferación de células de melanoma al inhibir la expresión de la molécula de adhesión celular de melanoma (MCAM) (H. F. Wang et al. 2013). La expresión del miR-125b, que se encuentra aumentado en muestras de pacientes con melanomas metastásicos, es regulada por TCF4, asociada a su vez en transición epitelio mesenquimal (EMT), la inhibición de miR-125b reduciría la expresión de la proteína NEED9, modulando la invasión y migración (Rambow et al. 2016); adicionalmente este miR-125b tendría como blancos potenciales a AKT3, BCL2 y E2F2, y por ende podría afectar, desde la regulación de estos blancos, la viabilidad celular e inducir senescencia en melanomas humanos (Glud et al. 2011; Nyholm et al. 2014). El miR-137 (Bemis et al. 2008), miR-148 (Haflidadóttir et al. 2010) y miR-182 (Segura et al. 2009), que se encuentran sub-expresados en melanoma, son reguladores negativos de señales proliferativas mediante la unión directa con el master regulador de la síntesis de melanina, MITF. El miR-138 y miR-470, que tendrían como blanco potencial a la ciclina D1, se encontraron diferencialmente expresados en línea celular B16, posterior a la inducción de un fenotipo senescente por el tratamiento con BrdU (Flórez Vargas and Gomez 2008).

Específicamente en la regulación del citoesqueleto y contractilidad celular han sido identificados miRNAs moduladores de la expresión de ROCK 2 tanto en células, como en tejidos tumorales obtenidos de pacientes. La sobre expresión de los miR-124, miR-101, miR-139 y miR-130a inhibe la movilidad celular y la metástasis en carcinoma hepatocelular por unión directa a ROCK 2 (Wong et al. 2011; F. Zheng et al. 2012, 2015;

H. Zheng et al. 2018) mientras que su unión a la familia miR-200b/c, inhibe la metástasis y la tumorigénesis del colangiocarcinoma. Adicionalmente la regulación del miR-23a de la vía AMPK-RhoA, regula de manera indirecta la expresión de ROCK 2 contribuyendo a la metástasis en melanoma (Guo et al. 2017). Sin embargo, poco se conoce sobre la regulación en la expresión de ROCK 2 en melanoma mediada por miR-455 y miR-138 en modelos celulares en los que se induzca cambios en la morfología, citoarquitectura y fenómenos de movilidad celular.

2.3.1 miRNA-138 y mRNA-455

El miR-455 se ha propuesto como potencial biomarcador en Alzheimer (Kumar, Vijayan, and Reddy 2017), estudios recientes lo señalan como supresor tumoral, ya que su expresión se encuentra a la baja en varios tipos de cáncer como cáncer de próstata, cáncer de pulmón de células no pequeñas y carcinoma de células escamosas esofágicas (Zhao et al. 2017; Sun et al. 2018; Gao et al. 2018). En melanoma, datos experimentales sugieren que el miR-455-5p promueve la metástasis mediante la inhibición del gen supresor de tumores CPEB1 (Shoshan et al. 2015).

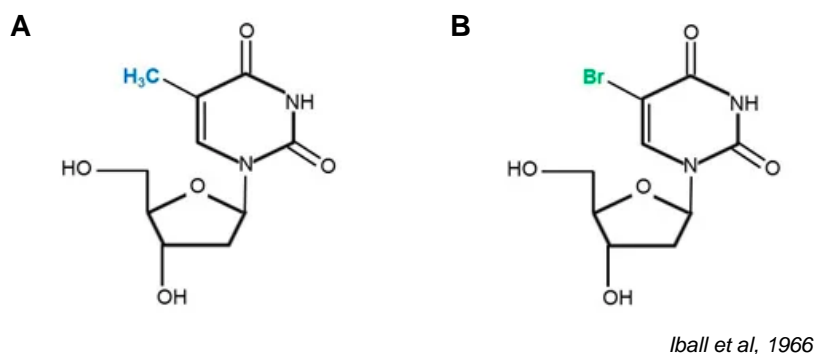
El miR-138 pertenece a una familia de miRNAs que se ha estudiado como un ejemplo de la regulación post-transcripcional de los miRNAs, debido a que, mientras el precursor se expresa de forma ubicua, el producto maduro se encuentra solo en tipos celulares específicos (Obernosterer et al. 2006). Se ha relacionado a miR-138 con la regulación de diferentes vías al unirse a blancos como H2AX involucrada en la reparación de daños en el DNA (Y. Wang et al. 2011) y ha sido descrito como un modulador activo de la progresión tumoral en varios tipos de cáncer, incluido el carcinoma hepatocelular humano (W. Wang et al. 2012), cáncer de pulmón de células no pequeñas (Xiao et al. 2016) y cáncer cervical humano (H. Li et al. 2017). En melanoma se le ha asociado a reducción de la proliferación celular mediante la unión a hTERT y HIF-1 α (H. Zhang et al. 2013; Meng et al. 2017), así como a la modulación de la señalización de autofagia por su unión a PDK1 (Meng et al. 2017) y fue encontrado diferencialmente expresado en células B16

inducidas a supresión del crecimiento *in vitro* por exposición al análogo de la timidina BrdU (Flórez Vargas and Gomez 2008).

2.4 5- Bromo- 2` - Desoxiuridina (BrdU)

BrdU es un nucleósido sintético análogo de la timidina, cuya diferencia estructural consiste en la sustitución del grupo metilo del carbono 5 por un Bromo (Ilustración 3). Debido a que es eficientemente fosforilada por las cinasas celulares y posteriormente incorporada en el DNA recién sintetizado durante la fase S del ciclo celular (Nowakowski, Lewin, and Miller 1989), su detección mediante anticuerpos específicos es usada para evaluar la replicación del DNA en células tumorales y otras células proliferantes, como marcaje de células para la datación por nacimiento y destino celular, para el monitoreo de células después del trasplante y en el estudio de la neurogénesis en adultos (Hoshino et al. 1989; Struikmans et al. 1997).

Ilustración 3. Estructura química del nucleósido timidina (A) y su análogo 5 - 2` - deoxiuridina (B)



La incorporación del átomo de Bromo en el DNA altera su estabilidad, permitiendo aumentar la sensibilidad de las células expuestas a la radiación ionizante, por lo que se usa frecuentemente como terapia complementaria en el tratamiento de gran variedad de

cánceres (Djordjevic and Szybalski 1960; Peñalosa 2000; Prados et al. 2004). Aunque se sabe que la incorporación de BrdU en el DNA induce mutaciones, rupturas de cromatina, intercambios de cromátides hermanas, micronucleaciones, hipermetilación y poliploidización (T. and Somers 1961; Call and Thilly 1991; Anisimov 1994; Wojcik, von Sonntag, and Obe 2003), aún es desconocido su mecanismo de acción, sin embargo se sugiere que su incorporación en regiones de cromatina inactiva ricas en AT, da como resultado alteraciones en los ligandos de unión a AT y por lo tanto la respuesta fenotípica variará de acuerdo a la maquinaria de respuesta al daño en el DNA y el ciclo celular (Suzuki et al. 2002; Satou et al. 2004). Además del daño sobre el DNA, diversos estudios *in vitro* e *in vivo* sugieren que la exposición a BrdU induce efectos significativos sobre la morfología celular y en la generación de fenotipos senescentes en células normales como condrocitos, células musculares, cerebrales, pancreáticas y sanguíneas (Taupin 2007; Littlefield and Gould 1960; Abbott and Holtzer 1968; Comi et al. 1986; Githens et al. 1976); así como en células tumorales leucémicas (Levkoff, Gregory P, et al. 2008), de cáncer de pulmón (McBride et al. 1999; Masterson and O'Dea 2007) y melanoma (Gómez, Rieber, and Rieber 1995; Peñalosa 2000).

A nivel estructural, la exposición de diversas líneas celulares de melanoma y células embrionarias pigmentadas a la BrdU produce alteraciones en la matriz laminar del retículo endoplasmático, alteraciones en los micro filamentos citoplasmáticos, la membrana celular y una reducción significativa de la pigmentación debida a la disminución de melanosomas e inhibición de la melanogénesis por modificaciones en la expresión de proteínas como la tirosinasa (Rauth and Davidson 1993). Dado que esta modificación fenotípica se encuentra acompañada con reducción de la capacidad proliferativa celular, la BrdU ha sido usada como agente inductor de diferenciación en células pigmentadas normales y tumorales (Epstein, Fukuyama, and Drake 1973; Garcia, Werner, and Szabo 1979). Adicionalmente la exposición a BrdU, generaría una morfología más extendida y aplanada, menor número de prolongaciones y mayor adhesión al sustrato en cultivos de 2D tanto en células de melanoma de ratón B16 (Abbott and Holtzer 1968; Selma Silagi 1971; Wrathall et al. 1973; Githens et al. 1976; Giotta, Brunson, and Lotan 1980; Masterson and O'Dea 2007) como en otros modelos celulares (Hill, Tsuboi, and Baserga 1974; Garcia, Werner, and Szabo 1979; Masterson and O'Dea 2007).

En el laboratorio de Fisiología Molecular del Instituto Nacional de Salud, se ha usado la exposición de línea celular de melanoma de ratón B16 a BrdU como modelo de supresión de crecimiento tumoral, para evaluar procesos celulares relacionados con pigmentación diferencial, senescencia, expresión de RNAs mensajeros asociados al control del crecimiento celular (mRNAs), miRNAs y cambios en la arquitectura de las células adherentes, que pueden ser influenciados entre otros, por las fluctuaciones de la expresión de actina (Gómez, Rieber, and Rieber 1995, 1996). No obstante, es desconocida la expresión de proteínas y miRNAs relacionados con los fenómenos de movilidad celular en este modelo.

3. Metodología

3.1 Diseño experimental

Las células de melanoma de ratón B16F1 fueron expuestas a BrdU durante 72 h, tras evaluar la viabilidad celular mediante los ensayos de Tripán Azul y se realizaron ensayos de MTT reductasa. El análisis del área celular aparente fue realizado a partir de fotografías adquiridas por microscopía de luz para células adheridas, mientras que el diámetro celular aparente fue determinado para células en suspensión con el sistema Tali™ *Image-based Cytometer*. Posteriormente se realizaron ensayos de circularidad celular y desprendimiento tras la adición de tripsina –EDTA y de migración celular por curación de herida y cámara tipo Boyden, todos ellos en presencia o ausencia del inhibidor Y27632. La evaluación de la expresión de las proteínas ROCK 2 y VIM, fue realizada por inmunofluorescencia y Western Blot; mientras que la expresión de su mRNA mensajero correspondiente se determinó mediante RT-qPCR. Para identificar la polimerización de F-actina, se usó tinción con faloidina, que también fue evaluada por inmunofluorescencia. Finalmente, se determinó la expresión de los miR-138-5p y miR-455-3p por RT-qPCR stem loop. Todos los resultados fueron comparados con células B16F1 en ausencia de BrdU durante el mismo tiempo de incubación.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1. Cultivo celular

La línea de melanoma de ratón B16F1, obtenida del American Type Culture Collection® (CRL-6322™, Virginia, USA), fue cultivada en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% (v/v) (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA), penicilina (100 U. mL⁻¹) y estreptomycin (100 µg. mL⁻¹) e incubada a 37 °C con 5 % de CO₂ y 98% de humedad. Al llegar a confluencia del 70 %, las células fueron desprendidas por adición de tripsina-EDTA (Sigma–Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) 0.25 % (m/v) y recogidas en DMEM, para posteriormente estimar el número de células y su viabilidad en cámara de Neubauer por tinción con Azul Tripán (Sigma–Aldrich) o en citómetro basado en imágenes Tali™ Image-based Cytometer (Thermo Fisher Scientific), según recomendaciones del fabricante.

3.2.2. Exposición a 5- Bromo-2'-deoxiuridina BrdU y Y27632

Células B16F1 fueron sembradas en DMEM completo y 10-12 horas posteriores a la siembra, se realizó cambio por medio fresco que contenía 5- bromo-2'-deoxiuridina BrdU (Sigma–Aldrich) a concentración final de 2.5 µg. mL⁻¹. Las células fueron incubadas en oscuridad durante 72 h, sin cambio de medio, excepto para ensayo de monitoreo celular donde se realizó cambio cada 48 horas hasta las 240 horas. Para los ensayos de inhibición de la actividad de la proteína ROCK 2, se adicionó tanto a células expuestas a BrdU, como a células B16F1 no expuestas, el inhibidor Y27632 ((R) - (+) - trans - 4 - (1-Aminoethyl) - N - (4-Pyridyl) cyclohexane carboxamide dihydrochloride)) (Calbiochem, La Jolla, California, USA) a concentración final de 10 µM durante 1 hora.

3.2.3. Viabilidad celular por exclusión con azul Tripán

Tras la exposición a BrdU, una alícuota de 20 μL de células B16F1 deprendidas y re-suspendidas en DMEM, se mezcló con 20 μL de Azul Tripán (0,25% m/v) a temperatura ambiente por 3 minutos, posteriormente las células fueron contadas con ayuda del microscopio óptico en una cámara de Neubauer, se consideraron células no viables aquellas que internalizaron el reactivo debido a la ruptura de sus membranas y como células viables las que no presentaron coloración.

3.2.4. Proliferación celular por el ensayo de la actividad MTT- reductasa

La proliferación celular fue determinada mediante el ensayo de MTT (bromuro de 3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma–Aldrich), que permitió medir espectrofotométricamente la actividad metabólica de las deshidrogenasas mitocondriales de células viables. Tras la exposición a BrdU durante 72 h, las células fueron sembradas en cajas de 96 pozos, luego de 12 h de incubación se adicionó MTT a concentración final de $0.83 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y nuevamente se realizó incubación durante 1 h. Posteriormente se eliminó la solución de MTT que no reaccionó y se adicionó dimetil sulfóxido (DMSO) (Merck, New Jersey, USA) para disolver los cristales de Formazan. Cada pozo fue leído a una absorbancia de 560 nm en un sistema GloMax®-Multi Detection System (Promega, Wisconsin, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Con el fin de determinar el número de células viables a partir de la absorbancia obtenida, se realizó una curva de calibración, tanto para células control como para células expuestas a BrdU, mediante 7 diluciones seriadas 1:2 a partir de 8×10^4 células; cada punto fue leído bajo las condiciones anteriormente descritas.

3.2.5. Análisis morfológicos

5.1. Determinación de área y volumen celular aparentes

Durante 12 h se adhirieron un promedio de 2.0×10^3 células B16F1 a laminillas de vidrio, se incubaron en presencia o ausencia de BrdU ($2.5 \mu\text{g. mL}^{-1}$) y pasadas 72, se realizó la adquisición de imágenes en contraste de fase en un microscopio de luz invertido Nikon Eclipse Ti a 20x (Kobe, Japón). A partir de 100 células por réplica y muestra, se determinó en el programa *NIS-Elements-Nikon*, el área celular aparente como media del contorno celular; los valores de área se representaron como un promedio \pm SD con un nivel de significancia alfa = 0.05. Para establecer el diámetro de células en suspensión posterior a la exposición a BrdU, se usó la función Average cell size del Tali™ Image-based Cytometer, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

5.2. Análisis de complejidad y tamaño celular por Citometría de flujo.

Células B16F1 en presencia o ausencia de BrdU, fueron desprendidas y re-suspendieron en PBS. Se seleccionó un promedio de 1.0×10^4 células para determinar el grado de difracción (FSC-A) y dispersión (SSC-A) de la luz en un citómetro de flujo BD FACSAria II™ (New Jersey, USA). A partir de estas medidas se realizó un análisis de tamaño y granulación en el programa FlowJo™. La significación estadística fue determinada para un N=3, por prueba t múltiple sin corrección, con un alfa = 0.05.

3.2.6. Ensayos de movilidad celular

6.1. Dinámica de circularidad y desprendimiento celular

Para evaluar la dinámica de circularidad celular, se siguieron protocolos reportados previamente (Sen and Kumar 2009; Srinivasan et al. 2017). Un promedio de 1.0×10^3

células/cm² fueron sembradas en laminillas de vidrio e incubadas a 37 °C con 5% de CO₂ y 98% de humedad. Transcurridas 12 horas de incubación, se agregó BrdU por 72 h y posteriormente se incubó 1 hora en presencia de Y27632. Las células adheridas fueron lavadas con PBS, se adicionó 50 µL por lámina de Tripsina-EDTA 0.25% (m/v), precalentada a 37 °C y a continuación, se realizó la captura de imágenes en un microscopio Nikon Eclipse *Ti* con la función *Time-Lapse*, cada 30 s hasta los 600 s. A partir de las fotografías obtenidas, se determinó la variación en el área celular y se graficó el área normalizada (\bar{A}) siguiendo la ecuación 1:

$$\bar{A} = \frac{A_i - A_t}{A_i - A_f} \quad \text{ecuación 1}$$

Donde A_i representa al área celular en el tiempo 0, A_t el área celular en un tiempo t determinado y A_f , el área celular en el tiempo final. Tras graficar \bar{A} con respecto al tiempo, se obtuvo una curva sigmoidea, a la que se realizó una normalización tipo Boltzmann usando el programa *Prism – GraphPad* (<https://www.graphpad.com/scientific-software/prism/>) de acuerdo a la ecuación 2 .

$$\bar{A} = 1 - \frac{1}{1 + e^{-\frac{(t - \tau_1)}{\tau_2}}} \quad \text{ecuación 2}$$

A partir de esta normalización se determinaron las constantes de tiempo de inicio de la circularidad (τ_2) y tiempo de circularidad desde τ_1 (τ_1), posteriormente estas constantes se sumaron para obtener el tiempo total de circularidad (T_{total}). El número de células desprendidas en cada caso, fue determinado succionando las células no adheridas luego de la adición de tripsina-EDTA y la cuantificación se realizó en el equipo Tali™ Image-based Cytometer.

6.2. Curación de herida

Células B16F1 fueron sembradas en cajas de 24 pozos en presencia o ausencia de BrdU y se permitió su crecimiento hasta la formación de monocapa (80% confluencia). Posteriormente se realizó cambio por medio DMEN incompleto (iDMEM) para mantener

las células en inanición y se incubaron durante 12h. Pasado el tiempo de incubación se adicionó por 1 hora con el inhibidor Y27632 y se realizó una herida en la monocapa con ayuda de una punta de micropipeta de 1 mL. Mediante un lavado con PBS, se eliminaron las células desprendidas y se adicionó nuevamente iDMEM. La determinación del porcentaje de disminución del área generada por la herida, se calculó a partir de fotografías obtenidas en contraste de fase en microscopio Nikon Eclipse *Ti* a 20x, en los tiempos 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h y 24 h con el programa NIS-Elements. La significación estadística fue determinada para un N=3, por prueba t múltiple sin corrección, con un alfa = 0.05.

6.3. Migración celular en cámara tipo Boyden.

Células B16F1 previamente expuestas a BrdU y/o al inhibidor Y27632, fueron incubadas durante 12h en iDMEM a 37°C con CO₂ al 5% y 98% de humedad. En el compartimiento superior de la cámara Transwell™ (Corning™) se sembró en promedio 1.0×10^5 células por pozo, diluidas en 100 µL de iDMEM y al compartimiento inferior de la cámara, se adicionó 600 µL de medio completo DMEM, como quimio-atrayente. Pasadas 24 h de incubación, de la cámara superior, se aspiró con micropipeta las células que no atravesaron la membrana y se retiró el exceso con ayuda de un hisopo de algodón. Para cuantificar las células que atravesaron la membrana, se adicionó Tripsina-EDTA al 0,25% (m/v) a ambas cámaras, se incubó la caja a 37 °C durante 5 min, se colectó en contenido en tubos de 15 mL y se realizó el conteo de la suspensión celular en Tali® image-based cytometer.

3.2.7. Inmunofluorescencia

Las células B16F1 fueron sembradas en laminillas de vidrio e incubadas 12h a 37 °C con 5% de CO₂ y 98% de humedad para permitir su adhesión a la laminilla, posteriormente fueron expuestas a BrdU $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ durante 72h, se realizó un lavado con PBS a

temperatura ambiente y se adicionó paraformaldehído al 4% en PBS durante 20 min, para permitir la fijación. Luego de lavar con PBS para retirar el exceso, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,3% v/v en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente y el exceso fue retirado mediante lavados sucesivos con PBS. Para bloquear sitios de unión inespecífica, se adicionó una solución de suero fetal bobino (SFB) al 5% y albumina sérica bovina (BSA) al 2% en PBS e incubó durante 20 minutos. Las laminillas se incubaron posteriormente con los anticuerpos primarios policlonales anti-ROCK 2 hecho en cabra (sc-1851) (Santa Cruz Biotechnology. Inc, Dallas, USA), anti-Vimentina (SAB4300676 Sigma–Aldrich) y anti β -catenina (sc-7199) (Santa Cruz Biotechnology. Inc) ambos hechos en conejo. Como anticuerpo secundario, se utilizó un anticuerpo anti-cabra hecho en gallina marcado con Texas Red (sc-3923), o anti-conejo hecho en cabra marcado con CFL-647 (sc-362292) ambos de Santa Cruz Biotechnology. Para tinción de las fibras de F-actina, se incubaron las células con 50 μ g. mL⁻¹ de Faloidina conjugada con Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma–Aldrich P5282) por 40 minutos a temperatura ambiente. En todos los casos los núcleos se marcaron con DAPI (Sigma–Aldrich) y las laminillas fueron montadas sobre glicerol al 25 % (v/v) (Merck). La adquisición de las imágenes se realizó en microscopio invertido Nikon Eclipse Ti en campo claro y con el filtro correspondiente a los fluoróforos utilizados. Para la cuantificación de las intensidades medias de fluorescencia (IMF) se usó el programa NIS-Elements para un N= 3 y un promedio de 100 células por réplica y muestra.

3.2.8. Western Blot

Las células B16F1 expuestas o no a BrdU se lavaron con PBS estéril y se lisaron en presencia del buffer RIPA (Sigma–Aldrich) que contenía cocktail inhibidor de proteasas (S8830 Sigma–Aldrich). El lisado, fue centrifugado a 13,000 g durante 15 min a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. La proteína total fue cuantificada utilizando una curva de calibración con diluciones seriadas de albumina sérica bovina (BSA) y ácido bicinónico (Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific). Mediante electroforesis SDS-PAGE al 10 % en condiciones denaturantes, se separaron 30 μ g de proteína por muestra; los geles obtenidos fueron transferidos a una membrana PVDF (Millipore-Merck) mediante un sistema Novex® Semi-Dry Blotter (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La membrana fue bloqueada con una

solución de polivinilpirrolidona (PVP-40) (Sigma–Aldrich) al 1 % (m/v) en PBS- Tween 20 (Sigma–Aldrich) (Haycock 1993), e incubada con los anticuerpos primarios usados en la inmunofluorescencia para mROCK2, Vimentina, o Lámina B1 (sc-6216), este último de Santa Cruz Biotechnology y como anticuerpo secundario, un anti-cabra hecho en caballo (PI-9500) o anti-conejo hecho en cabra (P1-1000), ambos marcados con HRP (VECTOR, Burlingame-California, USA). La detección se realizó por método quimioluminiscente ECL-Western blotting system (Amersham, Boston, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante y el análisis densitométrico, se hizo en el programa Fiji – ImageJ (<https://fiji.sc/>), usando como control de carga la detección de la proteína nuclear Lámina B1.

3.2.9. Obtención y análisis de RNA

▪ 9.1. Extracción de RNA total y enriquecimiento de pequeños RNAs

La extracción de RNA total se realizó siguiendo el protocolo TRIzol-cloroformo descrito previamente [15,16]. Células B16F1 expuestas o no a BrdU, se lisaron en presencia de TRIzol (Invitrogen), posteriormente fueron recolectadas en tubos de 1,5 mL para ser calentadas a 65 °C durante 2 minutos y solubilizar la melanina presente, luego se realizó centrifugación a 12,000 g por 5 minutos y 4°C para retirar el exceso de melanina. La extracción en fase orgánica se realizó mediante centrifugaciones sucesivas con cloroformo frío (Sigma–Aldrich) e isopropanol (Biomedical Inc.); el pellet obtenido fue lavado con etanol al 75% (Merck) y tras permitir su evaporación temperatura ambiente, se re suspendió en H₂O DEPC (dietil pirocarbonato, Sigma–Aldrich) y se cuantificó en Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Las fracciones enriquecidas de pequeños RNAs ≤ 200 nt, se obtuvieron usando miRVana™ miRNA Isolation Kit, (Ambion, Austin, USA) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

▪ 9.3. RT-qPCR

La síntesis del cDNA proveniente de mRNA se llevó a cabo a partir del RNA total, utilizando oligo dTs y la transcriptasa reversa Superscript II (Invitrogen), durante 50 min a 42 °C y luego 15 min a 70 °C en un termociclador (BIO-RAD Hercules, California, USA). La PCR en tiempo real (qPCR) se realizó a partir de 600 ng del cDNA obtenido anteriormente, con el uso del Kit DyNAmo HS SYBR Green (Thermo Fisher Scientific) y los cebadores correspondientes a cada gen evaluado (Tabla 1), en un termociclador Chromo4™ System de BIO-RAD bajo el programa: 1 ciclo de 95 °C 15 min, 36 ciclos que incluyeron 10 s a 96 °C, 30 s de temperatura de anillage de acuerdo a cada conjunto de cebadores y 30 s a 72 °C. Los resultados de la fluorescencia se graficaron como radio de expresión relativa (rER) normalizados por la expresión del gen constitutivo GAPDH (Scheffe et al. 2006).

▪ 9.4. Expresión de miRNAs por RT-qPCR stem loop

La selección de miRNAs que tuvieran como blanco molecular al mRNA de Rock 2, se realizó mediante el predictor TargetScanMouse 7.1 (http://www.targetscan.org/mmu_71/). La expresión de los miR-138-5p y miR-455-3p fue confirmada por RT-qPCR *stem loop*, que posee como principal variación el uso de cebadores con una estructura estable tipo haza (*stem loop*) (Anexo A-C) que proporciona longitud adicional al cDNA objetivo optimizando su temperatura de fusión (T_m). La RT fue realizada a partir de 65 ng del RNA enriquecido, con el uso del kit mirVana™ microRNA detection Kit (Thermo Fisher Scientific) en un termociclador BIO-RAD bajo el programa 30 min a 16 °C, 30 min a 42 °C y 5 min a 85 °C. La qPCR se realizó en el termociclador Chromo4™ usando 2.5 µg del cDNA obtenido anteriormente bajo el programa 3 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 1 min a 72 °C, con una extensión final de 10 min a 72 °C. Los resultados de la fluorescencia se graficaron como radio de expresión relativa (rER) normalizados por la expresión del pequeño RNA nuclear U6 (snRNA U6) (Scheffe et al. 2006).

30 Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

Tabla 1. Listado de cebadores usados en RT-qPCR y RT-qPCR *stem loop*.

Gen / miRNA	Dirección	Secuencia (5' a 3')	Temperatura de Anillaje (°C)
La proteína quinasa asociada a Rho II	Sentido	cag tgg aac cag tgg gag aaa	58
	Anti-sentido	tta atg tgg cac cta cgg ca	
Vimentina	Sentido	att cac gaa ggt gac gag cca t	64
	Anti-sentido	gcc ctt aaa gga acc aat gag tc	
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Sentido	acc aca gtc cat gcc atc act	58-64
	Anti-sentido	acc agg aaa tga gct tga caa agt	
mmu-miR-455-3p	Sentido	cgg ctg taa aca tcc ccg a	
	Stem-loop	gtc gta tcc agt gca ggg tcc gag gta ttc gca ctg gat acg acg tgt at	
mmu-miR-138-5p	Sentido	cgg cag ctg gtg ttg tga at	60
	Stem-loop	gtc gta tcc agt gca ggg tcc gag gta ttc gca ctg gat acg act ctt ct	
Reverse Universal	-----	gtg cag ggt ccg agg t	
Small nucleolar RNA U6	Stem-loop	gtc gta tcc agt gca ggg tcc gag gta ttc gca ctg gat acg aca aat atg	
	Sentido	tgg aac gat aca gag aag att tag ca	
	Anti-sentido	aac gct tca cga att tgc gt	

4. Resultados y análisis

4.1 *Cambios en la proliferación y morfología en células B16F1 expuestas a BrdU.*

Con el fin de identificar los cambios presentados en la morfología y proliferación celular tras la exposición a BrdU, se realizó un análisis número de células, proliferación, área aparente, diámetro, tamaño y granulación celular. Comparadas con las células sin exposición a BrdU (células control), las células de melanoma de ratón B16F1, adheridas a sustrato y expuestas durante 72 h, presentaron una morfología más extendida y aplanada, con menor número de prolongaciones y una aparente disminución en la pigmentación y el número de células (Figura 1.A.), cambios que han sido reportados anteriormente en este y otros modelos celulares (Silagi 1971; Wrathall et al. 1973; Giotta, Brunson, and Lotan 1980) y que se mantienen hasta las 240 h en presencia del estímulo (Figura S1.A). La cuantificación del número de células viables por ensayo de exclusión de Tripán Azul, mostró una reducción estadísticamente significativa del 38% tras la exposición a BrdU (Figura 1.B. y Tabla 2), coincidiendo con lo encontrado en el ensayo de la actividad MTT reductasa, en el cual se observó una disminución del 65.5% en células expuestas (Figura 1.C. y Tabla 3), adicionalmente la curva de calibración usada para el ensayo de MTT mostró una pendiente menor para las células control (Figura S1.B) lo que sugeriría mayor actividad. En conjunto estos resultados indican que los cambios en el número de células B16F1 tras exposición a BrdU podrían relacionarse con cambios en la proliferación arriba descritos, aunque se presente aumento de actividad.

Figura 1. Cambios en la proliferación, morfología y tamaño de células B16F1 expuestas a BrdU. A. Fotografías representativas de células B16F1 expuestas o no a BrdU 2.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. B. Número de células viables determinado por ensayo de exclusión de Azul Tripán. C. Cambios en el número de células B16F1 medidos por actividad MTT reductasa. D. Medida del área celular aparente (μm^2) determinada a partir del contorno de células adheridas. E. Diámetro promedio (μm) de células en suspensión expuestas o no a BrdU. D. Diagramas obtenidos por citometría de flujo del número de células distribuidas por cuartiles (Q) en función de SSC-A y FSC-A y sus porcentajes correspondientes (Q1, Q2, Q3 y Q4) para 3 réplicas independientes con un total de $1 \cdot 10^4$ eventos cada una.

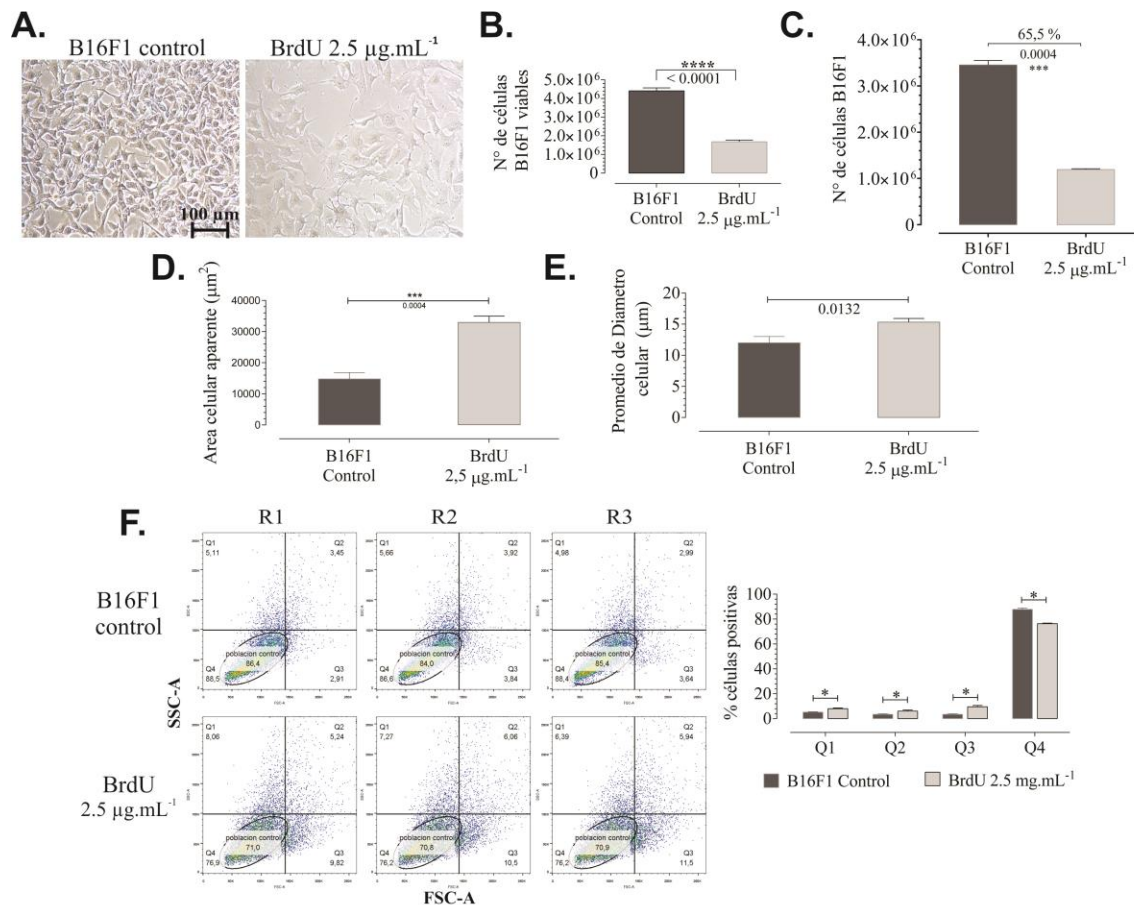


Tabla 2. Número de células viables por ensayo de Azul Tripán, para 4 réplicas Independientes.

Número de células viables	B16F1 Control				BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
	4310000	4490000	4595000	4235000	1705000	1595000	1800000	1630000
	MEDIA		SD	N	MEDIA		SD	N
	4407500		164544,826	4	1682500		90783,625	4

Tabla 3. Número de células Viables por ensayo de actividad MTT reductasa para 4 réplicas independientes.

Número de células viables	B16F1 Control				BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
				4235000	1705000	1595000	1800000	1630000
	MEDIA		SD	N	MEDIA		SD	N
	4407500		164544,826	4	1682500		90783,625	4

Tabla 4. Área celular aparente en μm^2 , para células adheridas a sustrato en 3 réplicas independientes.

Área celular aparente (μm^2)	B16F1 Control			BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
	13082.74	14334.05	17019.46	32045.62	35292.7	31564.67
	MEDIA		SD	MEDIA		N
	14812.080		2011.425	32967.660		2027.850

En cuanto a la cuantificación de las variaciones morfológicas, se observó un aumento de 2.2 veces en el área celular aparente de células adheridas expuestas a BrdU con respecto a las células control, pasando de $1.4 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ a $3.2 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ (Figura 1.D), así como un aumento en el coeficiente de variación de los datos reportados para células control (%CV 13.58) con respecto al de las células expuestas (%CV 6.15) (Tabla 4), sugiriendo un comportamiento más homogéneo en esta última población celular. La determinación de variación en el tamaño celular, fue realizada en células en suspensión. El diámetro de las células con BrdU aumentó comparado con el de las células sin exposición, pasando de $12.0 \pm 1 \mu\text{m}$ a $15.3 \pm 0.57 \mu\text{m}$ (1.7 veces) (Figura 1.E. y Tabla 5). Estos resultados coinciden con las variaciones en granulación (SSC-A) y tamaño celular (FSC-A), determinadas mediante el análisis de la difracción y refracción de la luz por citometría de flujo y donde se observó que 87% de la población de células control se

34 Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

encuentra en el cuartil Q4 y tras la exposición a BrdU, el porcentaje disminuye de manera significativa hasta un 76%, desplazándose hacia los cuartiles Q1 (de 5.2 ± 0.3 % a 7.9 ± 0.6 %), Q2 (de 3.4 ± 0.4 % a 6.0 ± 0.8 %) y Q3 (de 3.4 ± 0.4 % a 9 ± 1.0 %) e indicando un aumento de tamaño y/o granulación (Figura 1.F. y Tabla 6). Estos cambios podrían estar asociados con un aumento en la cantidad de organelos celulares y la reestructuración del cito esqueleto, lo que también se ha relacionado con alteraciones en la proliferación celular (Epstein, Fukuyama, and Drake 1973; Giotta, Brunson, and Lotan 1980).

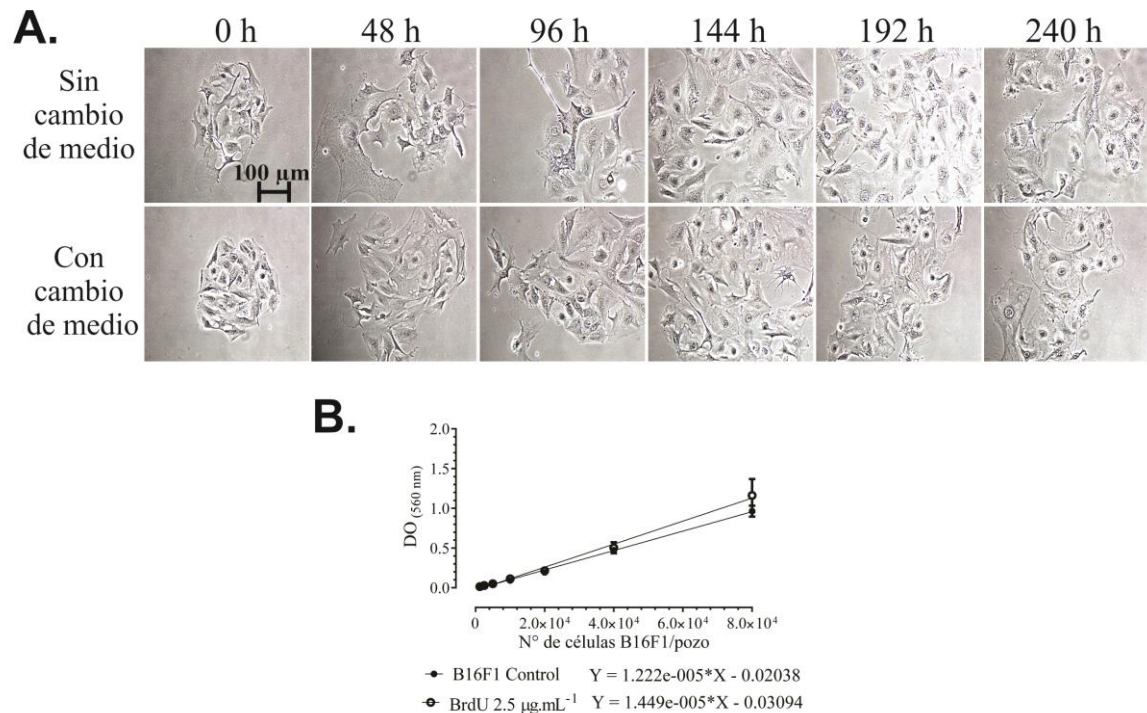
Tabla 5. Diámetro celular en μm , para células en suspensión en 3 réplicas independientes.

Diámetro celular (μm)	B16F1 Control			BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
	11.00	12.00	13.00	15.00	15.00	16.00
	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N
	12.000	1.000	3	15.333	0.577	3

Tabla 6. Porcentaje de eventos distribuidos por cuartiles y obtenidos mediante citometría de flujo para 3 réplicas independientes.

% de eventos	Cuartil	B16F1 Control			BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$		
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
	Q1	4.98	5.66	5.11	7.27	8.66	8.06
	Q2	2.99	3.92	3.45	6.06	6.93	5.24
	Q3	3.64	3.84	2.91	10.50	8.48	9.82
	Q4	88.40	86.60	88.50	76.20	75.90	76.90
		MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N
	Q1	5.250	0.361	3	7.997	0.697	3
	Q2	3.453	0.465	3	6.077	0.845	3
	Q3	3.463	0.490	3	9.600	1.028	3
	Q4	87.833	1.069	3	76.333	0.513	3

Figura Suplementaria. 1. A. Fotografías representativas de células B16F1 tras la exposición BrdU hasta las 240 h, con cambio de medio cada 24 h (panel superior) o en presencia continua del estímulo (panel inferior). B. Curva de calibración para células B16F1 y su absorbancia medida por actividad MTT reductasa.



4.2 Variaciones en la expresión de las proteínas ROCK 2 y VIM implicadas en la cito arquitectura de células B16F1 expuestas a BrdU.

Además los cambios morfológicos observados tras la exposición a BrdU, se han reportado alteraciones en la expresión del mRNA y de proteínas del citoesqueleto como la β -actina (Gómez, Rieber, and Rieber 1995), sin embargo se desconocen las posibles variaciones en la polimerización de F- actina, así como la participación de otras moléculas implicadas en la reorganización del citoesqueleto como ROCK 2 y VIM en células B16F1. En las células expuestas a BrdU, la intensidad media de fluorescencia (IMF) para ROCK 2, disminuyó 3 veces con respecto a células control (Figura 2.A-B y

Tabla 7.), coincidiendo con la evaluación mediante Western Blot, donde se halló una reducción de 0.79 veces (Figura 2.C)

Dado que ROCK 2 es uno de los reguladores de la polimerización de F-actina (Amano et al. 1996; Totsukawa et al. 2000), se decidió evaluar su polimerización y distribución mediante marcaje con Faloidina-FIDC, en presencia y ausencia del inhibidor de la actividad de ROCK 2, Y27632. Como se observa en la Figura 2.D., en las células control, la F-actina se observó distribuida en la periferia nuclear y esta distribución no varió después de la adición de Y27632 y en células previamente expuestas a BrdU, las fibras de F-actina se observaron más definidas y distribuidas a lo largo del citoplasma y la adición del inhibidor modificó tanto la ubicación como la extensión. Esto sugirió la participación de otros mecanismos moleculares, además de ROCK 2, en la estabilidad de las fibras y posiblemente un intercambio rápido en la polimerización que dificultaría visualizar la formación de las fibras; este fenómeno ya ha sido descrito en células de melanoma con movilidad de tipo amebioide (Sanz-Moreno et al. 2011).

ROCK 2 también participa en la regulación de los filamentos intermedios provocando el colapso de VIM, por lo que se evaluaron los potenciales cambios en su expresión y ubicación tras la exposición a BrdU. Comparadas con las células control, en las células expuestas a BrdU, VIM se encontró localizada principalmente a nivel peri-nuclear (Figura 2.E.) y la evaluación de su expresión mediante Western Blot mostró un aumento de 2.02 veces (Figura 2.F.), coincidiendo con la reducción de ROCK 2.

En conjunto las alteraciones en la expresión de las proteínas ROCK 2 y VIM, así como en la polimerización de F-actina, permitieron sugerir cambios en la movilidad de las células B16F1 tras la exposición a BrdU, que hasta la fecha no habían sido reportados y que podrían relacionarse además con alteraciones a nivel del mRNA de Rock 2 y Vim mediados por reguladores pos-transcripcionales de estos como los miRNAs.

Figura 2. Variación en la expresión de mROCK 2 y mVIM en células B16F1 tras la exposición a BrdU. (A.) microfotografías del marcaje de la F-actina con Faloidina-FITC (verde) en células B16F1 expuestas a BrdU y/o al inhibidor Y27632. Fotografías representativas de la ubicación y distribución por inmunofluorescencia (IF) de las proteínas mROCK 2 (B.) y mVIM (E.) marcadas en rojo y cuantificación en unidades arbitrarias de intensidad media de fluorescencia (I.M.F) de mROCK2 (C). En A, B y E contra tinción nuclear con DAPI (azul). Western Blot y densitometría de mROCK 2 en D. y mVIM en F; como control de carga, se usó la proteína nuclear Lámina B1.

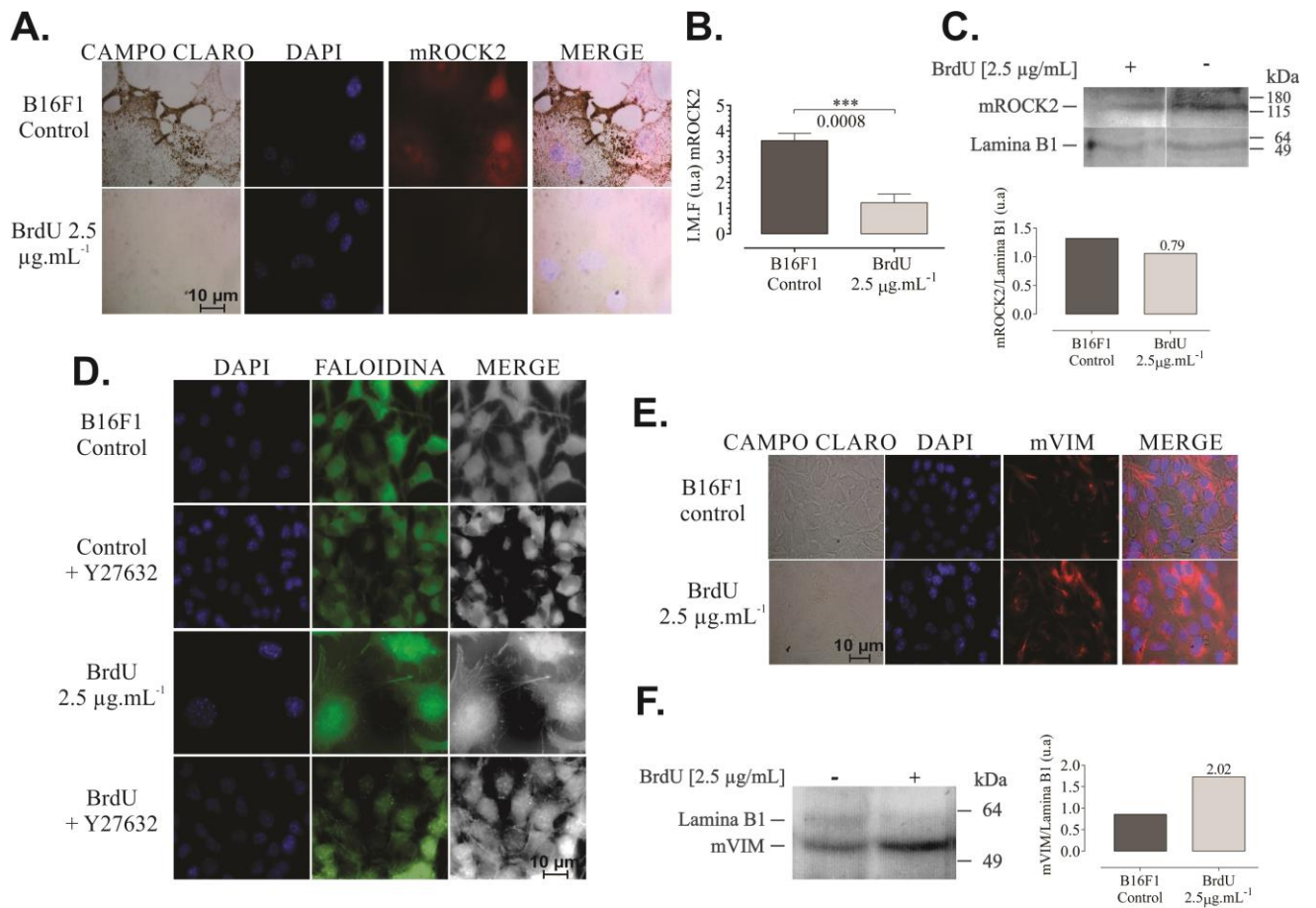


Tabla 7. Inmunofluorescencia de ROCK 2 en unidades arbitrarias para 3 réplicas independientes.

IMF (ua)	B16F1 Control			BrdU 2.5 µg. mL ⁻¹		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
	3.95	3.51	3.44	0.94	1.10	1.59
	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N
	3.63	0.276	3	1.210	0.339	3

4.3 Alteraciones en la movilidad de células B16F1 expuestas BrdU.

Se identificaron las potenciales variaciones en adhesión, circularidad y migración de las células B16F1 expuestas a BrdU y al inhibidor de ROCK 2 Y27632. La evaluación de la circularidad fue realizada mediante la adición de Tripsina –EDTA a células adheridas a sustrato. En las fotografías representativas de la dinámica de circularidad (Figura 3.A.), se observó mayor reducción del área de células expuestas en comparación con las células control y la adición de Y27632, solamente modificó la circularidad de las células control. Estas variaciones en el área final con respecto al área inicial, fueron cuantificadas en función del tiempo (Tabla 8) y se generó una curva sigmoidea que permitió evaluar la velocidad de circularidad (Figura 3. B.) las curvas de Control + Y27632 y BrdU 2.5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ tuvieron mayor desplazamiento hacia la izquierda indicando mayor velocidad de circularidad. Luego de realizar una normalización de Boltzmann, fue posible determinar las constantes de circularidad τ_1 , τ_2 y τ_{Total} ($\tau_1 + \tau_2$) (Figura 3.C-E). Las células expuestas a BrdU presentaron tiempos de circularidad menores en todos los casos ($\tau_1 = 123.04 \pm 27.9$; $\tau_2 = 30.5 \pm 4.9$ y tiempo total = 153.3 ± 28.3) comparado con los tiempos de circularidad para células no expuestas ($\tau_1 = 272.3 \pm 6.4$; $\tau_2 = 75.8 \pm 28.8$ y tiempo total = 384.1 ± 72.2). La adición de Y27632 a las células control, mostró reducción en los tiempos de circularidad ($\tau_1 = 117.9 \pm 17.2$; $\tau_2 = 34.3 \pm 1.3$; y tiempo total = 152.2 ± 20.9), mientras que en células previamente expuestas a BrdU se observó un leve aumento de las constantes ($\tau_1 = 182.7 \pm 9.5$; $\tau_2 = 56.4 \pm 8.2$; y tiempo total = 233.2 ± 13.2) (Tablas 9-11).

Tabla 8. Promedios del área normalizada en función del tiempo para 7 réplicas.

Área Normalizada	B16F1 Control			B16F1 Control +Y27632			BrdU 2.5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$			BrdU + Y27632		
	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N
Tiempo (sg)												
0	0.000	0.000	7	0.000	0.000	7	0.000	0.000	7	0.000	0.000	7
30	0.060	0.078	7	0.046	0.032	7	0.019	0.014	7	0.107	0.066	7
60	0.110	0.079	7	0.141	0.064	7	0.083	0.087	7	0.148	0.079	7
90	0.167	0.086	7	0.243	0.125	7	0.238	0.174	7	0.194	0.111	7
120	0.192	0.095	7	0.533	0.128	7	0.481	0.207	7	0.300	0.082	7
150	0.197	0.099	7	0.706	0.125	7	0.688	0.165	7	0.418	0.055	7
180	0.268	0.178	7	0.816	0.085	7	0.799	0.106	7	0.472	0.054	7
210	0.342	0.202	7	0.884	0.063	7	0.899	0.049	7	0.586	0.096	7
240	0.401	0.176	7	0.964	0.022	7	0.953	0.024	7	0.756	0.108	7
270	0.481	0.176	7	0.982	0.013	7	0.982	0.015	7	0.925	0.087	7
300	0.573	0.151	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
330	0.700	0.129	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
360	0.759	0.127	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7

390	0.822	0.089	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
420	0.865	0.063	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
450	0.897	0.048	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
480	0.919	0.038	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
510	0.942	0.030	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
540	0.956	0.024	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
570	0.980	0.011	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7
600	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7	1.000	0.000	7

m

Tabla 9. Constante τ_1 expresada en segundos para 7 réplicas independientes.

τ_1 (sg)		B16F1 Control										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
370.40	286.6	215.6	288.00	278.7	304.30	162.1	272.243	66.456	7			
		B16F1 Control +Y27632										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
98.93	116.80	112.90	141.90	129.40	95.11	130.50	117.934	17.187	7			
		BrdU 2.5 μg. mL⁻¹										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
154.30	106.20	88.74	92.95	131.7	129.1	158.3	123.041	27.981	7			
		BrdU + Y27632										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
190.2	186.3	175.4	189.4	193.8	168.7	175.2	182.714	9.512	7			

Tabla 10. Constante τ_2 expresada en segundos para 7 réplicas independientes.

τ_2 (sg)		B16F1 Control										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
75.07	59.60	126.50	53.49	59.57	104.80	52.02	75.864	28.871	7			
		B16F1 Control +Y27632										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
36.57	19.24	37.56	43.26	47.62	37.75	18.04	34.291	11.377	7			
		BrdU 2.5 μg. mL⁻¹										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
30.62	21.10	35.63	34.61	28.85	28.81	34.00	30.517	4.990	7			
		BrdU + Y27632										
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N			
63.85	55.7	48.05	46.59	43.65	55.22	40.12	50.454	8.200	7			

40 Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

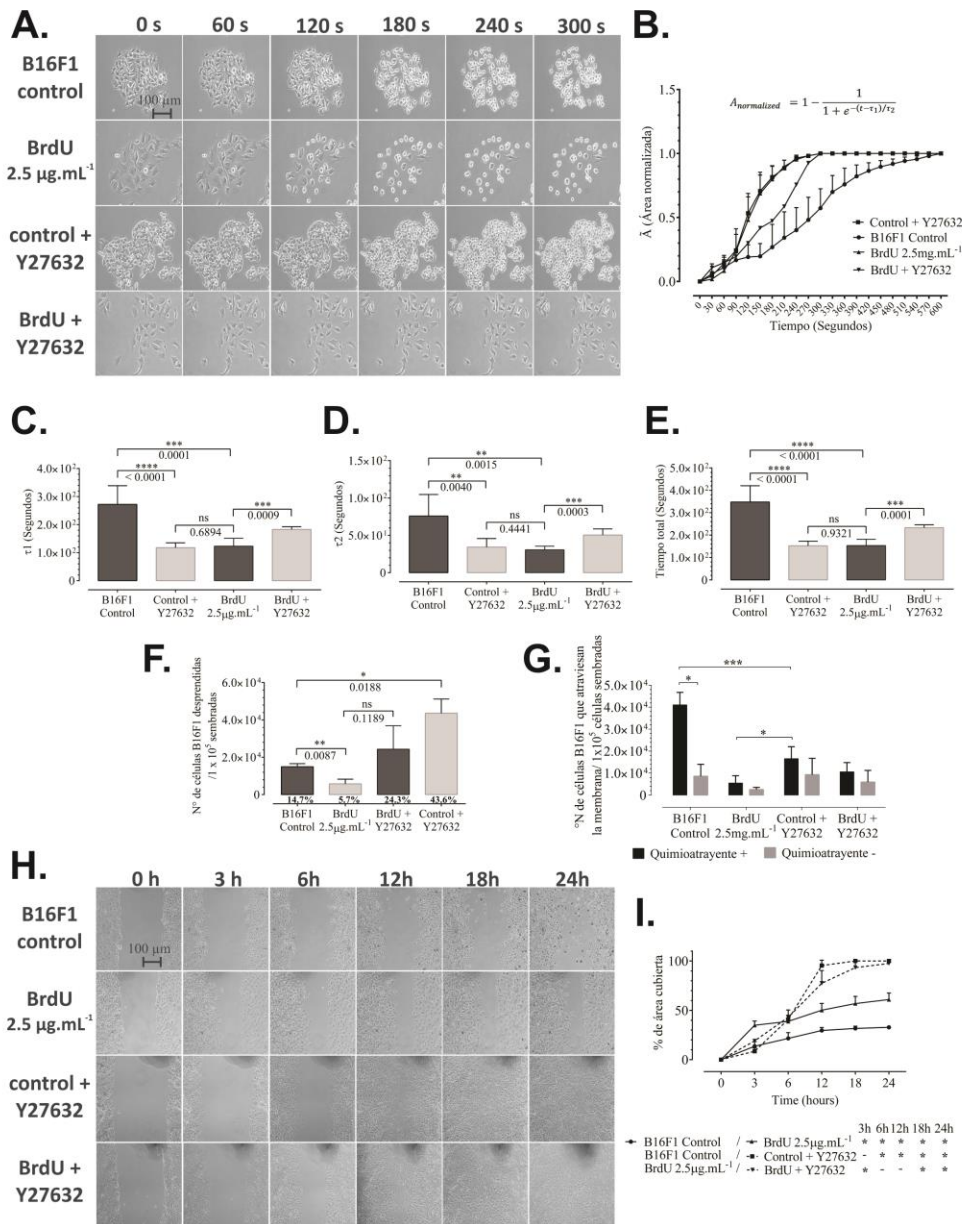
Tabla 11. Constante tTotal determinada a partir de la suma de τ_1 τ_2 y expresada en segundos para 7 réplicas independientes.

τ_{Total} (sg)	B16F1 Control									
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N
	445.47	346.20	342.10	341.49	338.27	409.10	214.12	348.107	72.264	7
	B16F1 Control +Y27632									
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N
	135.50	136.04	150.46	185.16	177.02	132.86	148.54	152.226	20.948	7
	BrdU 2.5 μg. mL⁻¹									
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N
	184.92	127.30	124.37	126.36	160.55	157.91	192.30	153.387	28.382	7
	BrdU + Y27632									
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 5	Replica 6	Replica 7	MEDIA	SD	N
	254.05	242.0	223.45	235.99	237.45	223.92	215.32	233.169	13.159	7

Tabla 12. Número de células desprendidas tras la adición de Tripsina-EDTA para 3 réplicas independientes.

Número de células desprendidas	B16F1 Control					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
	16823.7900	13908.6300	14111.6700	14948.030	1627.625	3
	B16F1 Control +Y27632					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
	37069.7300	51897.6200	41835.8400	43601.060	7569.914	3
	BrdU 2.5 μg. mL⁻¹					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
	3092.4860	7976.8780	6213.8730	5761.079	2473.477	3
	BrdU + Y27632					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
	16042.1800	18200.9900	38709.6800	24317.620	12510.550	3

Figura 3. Cambios en la circularidad, adhesión y migración de células B16F1 tras la exposición a BrdU. A. Imágenes representativas del *time-lapse* para la dinámica de circularidad por adición de tripsina-EDTA. B. Variación del área normalizada con respecto al tiempo durante el ensayo de circularidad; los datos se ajustaron a una ecuación sigmoidea de Boltzmann para determinar las constantes de tiempo τ_1 (C) y τ_2 (D) y el tiempo total de adhesión corresponde a la suma de las constantes (E). F. Número de células desprendidas tras adición de Tripsina-EDTA. G. Número de células que atraviesan la membrana en cámara tipo Boyden. H. Fotografías del ensayo de curación de herida para células representados como porcentaje de cierre de herida medido a las 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 18 h y 24 h (I). * representa una significancia estadística con valor $p < 0.05$.



Los cambios en la capacidad de circularidad celular están relacionados con las dinámicas de contractilidad y podrían influir en el desprendimiento celular (Sen and Kumar 2009; Srinivasan et al. 2017), por lo tanto se decidió evaluar el número de células B16F1 previamente expuestas a BrdU y Y27632, que se desprenden tras la adición de Tripsina-EDTA (Figura 3.F.). Se encontró que en comparación con el 14.7% de células control desprendidas, solo el 5.7% de las células expuestas a BrdU se desprenden del sustrato y este valor aumenta en 43.6% tras la adición de Y27632 para células control, y de manera no significativa para células en presencia de BrdU (Tabla 12).

La movilidad fue evaluada mediante ensayo de curación de herida y por migración en cámara Boyden. Tras la exposición a BrdU, el porcentaje de células B16F1 que atraviesan la membrana en cámara tipo Boyden disminuyó en un 86.6% en comparación con las células control (Figura 3.G.) y al exponer las células a Y27632, se observó disminución en las células control de un 60%, mientras que las expuestas a BrdU no se presentó variación significativa (Tabla 13). En el ensayo de curación de herida, las células expuestas a BrdU presentan mayor porcentaje de cierre comparadas con las células control (Figura 3.H-I), y tras el uso de Y27632, se aumenta este porcentaje de manera significativa tanto en células expuestas como en células control (Tabla 14.). Estos resultados permiten sugerir el favorecimiento de diferentes tipos de movilidad de que podrían estar relacionados con la expresión diferencial de las proteínas ROCK 2 Y VIM, sin embargo, se hizo necesario determinar si estos niveles de expresión coinciden con cambios en la expresión de los mRNAs correspondientes y de los miR-138-5p y miR-455-3p, que por predictores han sido descritos como reguladores de estos.

Tabla 13. Número de células que atravesaron la membrana en cámara Boyden para 4 réplicas independientes.

Número de células		B16F1 Control						
Que atraviesan la membrana		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	MEDIA	SD	N
Con quimio-atrayente		49300	40500	36900	37600	41075.000	5700.512	4
Sin quimio-atrayente		5900	5400	6400	16700	8600.000	5415.410	4
		B16F1 Control +Y27632						
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	MEDIA	SD	N
Con quimio-atrayente		14800	16500	11200	24000	16625.000	5390.346	4
Sin quimio-atrayente		1100	8600	8400	19100	9300.000	7406.754	4
		BrdU 2.5 μ g. mL ⁻¹						
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	MEDIA	SD	N
Con quimio-atrayente		7200	2800	2600	9400	5500.000	3356.585	4
Sin quimio-atrayente		2150	1300	3000	3600	2512.500	1003.639	4
		BrdU + Y27632						
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	MEDIA	SD	N
Con quimio-atrayente		6900	15700	7500	12400	10625.000	4185.192	4
Sin quimio-atrayente		3400	3000	3400	13900	5925.000	5320.010	4

Tabla 14. Porcentaje de cierre de herida determinado desde las 0 h hasta las 24 h para 3 réplicas independientes

% de cierre de herida	B16F1 Control					
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
0 h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3
3h	15.05	17.49	8.48	13.673	4.660	3
6 h	20.77	27.76	16.29	21.607	5.781	3
12 h	28.78	33.01	26.99	29.593	3.091	3
18 h	30.55	34.30	30.30	31.717	2.241	3
24 h	32.72	33.54	32.19	32.817	0.680	3
B16F1 Control +Y27632						
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
0 h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3
3h	5.856	12.162	7.753	8.591	3.235	3
6 h	40.275	45.106	36.863	40.748	4.142	3
12 h	100.000	96.731	89.345	95.359	5.458	3
18 h	100.000	100.000	100.000	100.000	0.000	3
24 h	100.000	100.000	100.000	100.000	0.000	3
BrdU 2.5 μ g. mL ⁻¹						
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
0 h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3
3h	29.95	37.51	37.29	34.917	4.303	3
6 h	32.03	41.74	42.68	38.817	5.896	3
12 h	42.65	51.84	56.05	50.180	6.852	3
18 h	50.27	55.90	64.51	56.893	7.172	3
24 h	54.71	60.44	67.81	60.987	6.567	3

44 Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

BrdU + Y27632						
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	MEDIA	SD	N
0 h	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	3
3h	17.96334	17.64926	21.40104	19.005	2.081	3
6 h	37.91863	39.63168	51.45333	43.001	7.370	3
12 h	69.10755	71.00050	92.22105	77.443	12.833	3
18 h	89.95190	89.91716	100.00000	93.290	5.811	3
24 h	97.05846	95.52456	100.00000	97.528	2.274	3

4.4 Variación en la expresión de los mRNAs Rock2 y Vim y de los mir-455-3p y miR-138-5p

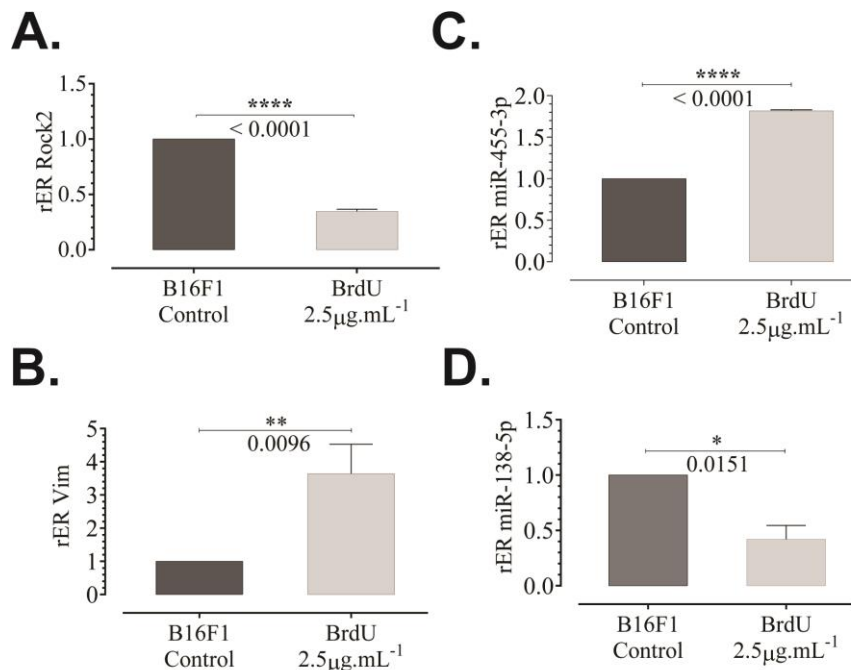
Resultados recientes de secuenciación obtenidos en el laboratorio de Fisiología molecular mediante Small RNAseq (datos no publicados), confirman la expresión diferencial, tras la exposición a BrdU, de conjuntos de miRNAs, que de acuerdo al predictor TargetScan, poseen como blanco molecular a Rock 2. Dentro de estos miRNAs se destacan los miR-455-3p y miR-138-5p cuya unión directa a la región 3'UTR del mRNA de Rock 2, ha sido demostrada mediante el ensayo de gen reportero de luciferasa en diferentes modelos celulares (J. Wu et al. 2018; Z. Zhu et al. 2016; Jiang et al. 2010). Con el objetivo de establecer variaciones en la expresión de estos miRNAs y el mRNA mensajero de Rock 2 en las células B16F1 expuestas a BrdU, se realizaron ensayos de RT-qPCR *stem loop* y RT-qPCR. Se observó que las células expuestas presentaban una disminución de 2.39 veces en los niveles de expresión relativa del miR-138-5p (Figura 4.D.-Tabla 18) y de 2.88 veces en Rock 2 (Figura 4.A.-Tabla 15) y un aumento de 1.8 veces para el miR-455-3p (Figura 4.C.- Tabla 17). Estos resultados indicarían que el miR-455-3p tendría mayor participación que miR-138-5p en la regulación a la baja del nivel de Rock 2, que coincidiría con lo observado en el producto proteico (Figura 2.A-C); sin embargo es posible que este último tenga participación en los fenómenos de movilidad mediante la regulación de otros genes importantes en las vías relacionadas como Vim, que también ha sido reportado como su blanco molecular (J. Zhang et al. 2016), por lo que se decidió evaluar la expresión de su mRNA. Se encontró que en células expuestas a BrdU, la expresión relativa de Vim aumentó 3.64 veces en comparación con las células

control (Figura 4.B.- Tabla 16), coincidente con los niveles de proteína (Figura 2.E-F). Estos resultados permiten sugerir que las variaciones en la expresión de Vim y Rock 2 observadas tras la exposición a BrdU, estarían reguladas por estos y otros miRNAs y que estas variaciones a su vez tendrían repercusiones importantes en los fenómenos de movilidad.

Tabla 15. Radio de expresión relativa (rER) para Rock 2 con respecto al gen constitutivo GAPDH para 4 réplicas independientes.

rER Rock 2	B16F1 Control				BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
	1	1	1	1	0.3567	0.3423	0.3217	0.3654
	MEDIA		SD	N	MEDIA		SD	N
	1.000		0.000	4	0.347		0.019	4

Figura 4. Variación en la expresión del mRNA de Rock2, Vim y de los miR-455-3p y miR-138-5p en células B16F1 expuestas a BrdU. Radio de expresión diferencial (rER) por RT-qPCR para los mRNAs Rock2 (A) y Vim (B) normalizados con la expresión del gen constitutivo GAPDH. rER para los miRNAs miR-455-3p (C) y miR-138-5p (D) determinado por RT-qPCR stem loop y normalizado con la expresión del snRNA U6.



- 46 Expresión de la Cinasa ROCK 2 y de los microRNAs-138-5p y 455-3p en células de melanoma B16 expuestas a 5-Bromo-2'-deoxiuridina y su asociación con proliferación, adhesión, migración y viabilidad celular

Tabla 16. Radio de expresión relativa (rER) para Vim con respecto al gen constitutivo GAPDH para 4 réplicas independientes.

rER Vim	B16F1 Control				BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$			
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 4
	1	1	1	1	4.3342	2.5220	3.3179	4.3825
	MEDIA		SD	N	MEDIA		SD	N
	1.000		0.000	4	3.639		0.892	4

Tabla 17. Radio de expresión relativa (rER) para miR-455-3p con respecto al snRNA U6 para 3 réplicas independientes.

rER mir-455-3p	B16F1 Control			BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
	1	1	1	1.8330	1.8085	1.8136
	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N
	1.000	0.000	3	0.49	0.125	3

Tabla 18. Radio de expresión relativa (rER) para mir-138-5p con respecto al snRNA U6 para 3 réplicas independientes.

rER mir-138-5p	B16F1 Control			BrdU 2.5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$		
	Replica 1	Replica 2	Replica 3	Replica 1	Replica 2	Replica 3
	1	1	1	0.5508	0.3020	0.4056
	MEDIA	SD	N	MEDIA	SD	N
	1.000	0.000	3	0.419	0.125	3

5. Discusión

Procesos celulares de migración e invasión, involucran la reorganización del citoesqueleto celular con el fin de favorecer los cambios en la cito-arquitectura asociados con la movilidad (Hideki Yamaguchi and Condeelis 2007; Bonaventure, Domingues, and Larue 2013). En células de melanoma de ratón B16F1, la exposición al agente quimioterapéutico BrdU, induce cambios en la proliferación y pigmentación celular, conexas con alteraciones morfológicas relacionadas con fenotipos senescentes (Gómez, Rieber, and Rieber 1996; Masterson and O'Dea 2007; Levkoff, Marshall 2nd, et al. 2008). Aunque aún es desconocido el mecanismo de acción de la BrdU, el uso de este modelo experimental ha permitido avanzar en la identificación de variaciones en la expresión de mRNAs y miRNAs implicados en melanogénesis, control del ciclo celular y senescencia en melanoma (Price 1976; Gómez, Rieber, and Rieber 1995; Flórez and Gómez 2008). Sin embargo, poco se conoce sobre la posible asociación entre los cambios en la cito-arquitectura observados en células B16 inducidas por la exposición a BrdU y los cambios en la movilidad celular, así como la participación de la cinasa ROCK 2, cuya regulación mediada por miRNAs ha sido relacionada con los procesos de adhesión, movilidad y tumorigénesis en otros modelos celulares (El-Sibai et al. 2008; Rösel et al. 2008; Kümper et al. 2016; Y. Peng et al. 2019; Orgaz et al. 2020).

En el presente trabajo, se confirmó una disminución de 65.5% en la proliferación de células B16F1 tras la exposición durante 72 h a BrdU y se cuantificó el aumento en el área, diámetro, granulación y tamaño celular (Figura 1.). El aumento en la granulación podría deberse a un incremento en la cantidad de organelos celulares como lisosomas, fenómeno descrito para células senescentes, relacionado anteriormente con la exposición a BrdU (Epstein, Fukuyama, and Drake 1973; Garcia, Werner, and Szabo

1979; Flórez and Gómez 2008) y que coincide con la disminución en la proliferación y la senescencia evaluada por marcadores característicos como aumento en la expresión de la Histona H3K9m3 y la actividad β -galactosidasa asociada a senescencia (SA β -gal) en este mismo modelo (Tesis doctoral, datos no publicados). Al estimar la razón de cambio entre el área celular aparente y el diámetro de células expuestas a la BrdU (1.7 veces), se puede sugerir que el incremento en el área dependería no solamente de un aumento en el tamaño, sino que probablemente podrían estar implicados cambios en la reorganización del cito-esqueleto y de moléculas implicadas en su regulación como la proteína cinasa dependiente de Rho A, ROCK 2.

La modulación de la citoarquitectura por regulación de diversos procesos como la polimerización de F-actina y VIM, ha sido ampliamente descrita en células tumorales (Takao Kamai et al. 2003; Nakajima et al. 2003; Sadok et al. 2015); por lo tanto con el fin de determinar las posibles variaciones de ROCK 2, se evaluó su expresión tras la exposición a BrdU y las posibles alteraciones en su actividad con el uso del inhibidor Y27632. Se observa una disminución tanto de la proteína (Figura 2. A-C) como del mRNA (Figura 4.A.) de ROCK 2 en células expuestas a BrdU comparadas con las células control, coincidiendo con reportes anteriores donde también se encontró disminución de su expresión en células B16 inducidas a supresión de crecimiento por exposición a Genisteína (Escobar 2001). La disminución de la expresión o en la actividad de ROCK 2 podría tener relación con las alteraciones en la proliferación celular, ya que recientemente se le ha involucrado en la regulación de la expresión de la ciclina D1, CDK2 y CDK4 a través de la vía JNK / c-Jun (Tang et al. 2018) y su delección se ha relacionado con la inducción indirecta de senescencia (Kümper et al. 2016)

Tras la adición de Y27632, las células de melanoma B16 previamente expuestas a BrdU muestran un aumento en la expresión de VIM y una redistribución a nivel perinuclear (Figura 2. D-F), lo que coincide con la disminución de ROCK 2 y con una mayor capacidad de adhesión, posiblemente por mayor disponibilidad de VIM para unirse a complejos de adhesiones focales (Terriac et al. 2017). En cuanto a la F-actina, Y27632 modifica tanto la ubicación como extensión de las fibras en células previamente expuestas a BrdU, lo que permite sugerir que aunque la expresión ROCK 2 disminuye

por exposición a BrdU, ROCK 2 aún podría tener alguna participación en la estabilidad de F-actina, y que estas fibras distribuidas a lo largo del citoplasma contribuirían a la formación de estructuras adherentes con mayor estabilidad (Ridley and Hall 1992).

Los cambios en la morfología y la cito-arquitectura observados, podrían estar relacionados con alteraciones en la movilidad celular, por lo que a continuación, se evaluaron los fenómenos de adhesión, contractilidad y migración en células B16F1 expuestas a BrdU y al inhibidor de ROCK 2 Y27632. En células expuestas a la BrdU se observa un aumento en la capacidad de circularizarse y menor número de células desprendidas tras la adición de Tripsina-EDTA (Figura 3. A-F.). Estos resultados permiten sugerir que el desprendimiento celular no estaría dependiendo de la capacidad de circularizarse, sino que probablemente se encuentre más relacionado con la disminución en la expresión de ROCK 2, la redistribución de VIM y el aumento en la estabilidad de F-actina polimerizada (Figura 2) aquí reportados, u otros mecanismos que podrían ser inducidos por BrdU como alteraciones en las glucoproteínas de membrana (Manuel Rieber and Castillo 1984) o variaciones en la expresión de integrinas (Meleady and Clynes 2001) los cuales aumentarían la capacidad de adhesión (Giotto, Brunson, and Lotan 1980; M Rieber et al. 1984, 1989).

Los ensayos de movilidad muestran que la BrdU induce un aumento en la capacidad de cierre de herida (migración 2D) y una disminución en la capacidad de migración en cámaras de Boyden (migración 3D) (Figura 3. G-I.), procesos que además se observan alterados tras la adición de Y27632. Dado que estos dos ensayos de movilidad evalúan tipos diferentes de migración, los resultados permiten sugerir que la exposición a BrdU induce reorganización a nivel del citoesqueleto favoreciendo la migración en 2D, posiblemente con el uso de pseudópodos e independiente de la regulación mediada por ROCK2 (Small et al. 1998; Nobes and Hall 1995), mientras que en células control, la migración serían mayor en modelos 3D, favorecida por la reorganización peri nuclear de la F-actina (Figura 2.A), asociado posiblemente a un movimiento de tipo amebioide con una participación más importante e ROCK 2 (Wyckoff et al. 2006; Sahai and Marshall

2003). Estos resultados sugieren que la regulación de la expresión y actividad de ROCK 2 puede ser muy importante en la biología tumoral.

Debido a evidencias previas de la regulación de la expresión de ROCK 2 mediante regulación postranscripcional por miRNAs (X. Liu et al. 2011; Wong et al. 2011; F. Peng et al. 2013; Y. Zheng et al. 2018), se evaluaron las variaciones en la expresión de los miRNAs 138-5p y 455-3p que poseen como blanco molecular, determinado por ensayo de gen reportero de Luciferasa, a Rock 2 en diferentes modelos celulares (J. Wu et al. 2018; Z. Zhu et al. 2016; Jiang et al. 2010) y que por antecedentes del laboratorio obtenidos mediante Small RNAseq, al igual que otros conjunto de microRNAs con expresión al alta (129-5p, 30d-5p, 22-3p, 335-5p, 193b-3p y 144-3p) y a la baja (211-5p, 128-3p y 23a-3p), presentan una expresión diferencial en células expuestas a BrdU comparadas con células control (tesis Doctoral, datos no publicados). Los resultados confirman una expresión al alta de miR-455-3p y a la baja de miR-138-5p (Figura 4. C-D), sugiriendo que el miR-455-3p tendría mayor efecto sobre la regulación de Rock 2, posiblemente por la mayor cantidad de sitios de unión predichos mediante *TargetScan*; por otro lado el miR138-5p, posee además como blanco molecular al mRNA de Vim (Goto et al. 1998; Sin et al. 1998), cuya variación también fue determinada (Figura 4.B.) y su expresión al alta podría ser consecuencia de la sub-expresión encontrada para el miR-138-5p. Estos resultados fortalecen la hipótesis que una regulación mediada por microRNAs sobre Rock 2 resulta en parte por cambios de expresión al alta y a la baja de conjuntos de microRNAs en la que participan los miR-455-3p y miR-138-5p.

En conjunto, los resultados del presente trabajo permiten sugerir que ROCK 2 participa en la regulación de los cambios morfológicos y proliferativos observados en células de melanoma B16 por la exposición a la BrdU y que en la regulación de su expresión estarían involucrados los miR-455-3p y miR-138-5p. Estos resultados son consistentes con lo reportado en la literatura sobre el papel de ROCK 2 en la progresión tumoral a partir de su papel coordinador de la movilidad celular (Vigil et al. 2012; Kümper et al. 2016; Srinivasan et al. 2017) y permiten proponer que la inhibición de ROCK 2 (por regulación de su expresión mediada por miRNAs) podría ser considerada como una

terapia anticancerosa (Nakajima et al. 2003; F. Peng et al. 2013; X. Li et al. 2018; Y. Zheng et al. 2018). Adicionalmente, además de confirmar los cambios morfológicos asociados a senescencia inducida por la exposición a BrdU, se aporta evidencia experimental sobre variaciones en la movilidad tumoral relacionadas con estos cambios, las cuales apoyan la hipótesis del uso de BrdU como potencial agente terapéutico inductor de senescencia, que podría ser un adyuvante que mejore la actividad antitumoral (Masterson and O'Dea 2007). Sin embargo, aún queda por evaluar si las alteraciones en la movilidad asociada a la inducción de senescencia por este u otros mecanismos, son en efecto ventajosas en modelos *in vivo*, así como la participación en estos procesos celulares de otras moléculas que modifican su expresión por la exposición a la BrdU.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

- La disminución en la expresión de ROCK2 tras la inducción de senescencia por exposición durante 72 h a BrdU, aumenta en células B16F1 su capacidad de adhesión, circularidad y extensión, disminuyendo su movilidad.
- La exposición a BrdU genera una expresión diferencial de 455-3p, regulador de Rock2, lo cual conlleva a pensar que este podría convertirse en un target terapéutico en la disminución de migración en melanoma. Por consiguiente, el avance en el conocimiento de su comportamiento coordinado y de su regulación sobre otros blancos moleculares es crucial en la comprensión de la senescencia inducida por BrdU, que potenciaría su efecto antitumoral.

6.2 Recomendaciones

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo, se considera que futuros ensayos deberían estar encaminados en avanzar en la asociación de los cambios morfológicos y la movilidad producidos por la BrdU en otros modelos celulares, evaluar la variación exógena de los miRNAs 138-5p y 455-3p y otros relacionados con la expresión del mRNA de Rock2 u otras cinasas relacionadas con movilidad como el mRNA de Rock1 y evaluar la participación de los miRNAs 138-5p y 455-3p en la regulación de procesos asociados a proliferación (control del ciclo celular).

A. Anexo: Diseño de primers para RT-qPCR *stem loop* del miR-455-3p

mmu-miR-455-3p

Mature sequence mmu-miR-455-3p

>mmu- miR-455-3p MIMAT0003742

5'GCAGTCCACGGGCATATACAC 3'

15984 reads, 101 experiments

- **Stem-loop miR-455-3p**

5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTGTAT 3'

- **Forward miR-455-3p**

5'CGGCGCAGTCCACGGGCAT 3'

- **Reverse Universal oligonucleótido**

5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'

Construcción

Reverse	Forward
5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'	
5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTGTAT 3'	5'CGGCGCAGTCCACGGGCAT 3'
STEM-LOOP	miR-455-3p

Parte1: qPCR

mmu-mir-455-3p

PASO 1. Hibridación del microRNA mir-455-3p con el oligonucleótido stem-loop

5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTGTAT 3'

AGGGTCC

5'GTCGTATCCAGTGC

3'TATGTGCAGCATAGGTCACG

CTTATGG

AGGGTCC

5'GCAGTCCACGGGCATATACACGTCGTATCCAGTGC

3'TATGTGCAGCATAGGTCACG

CTTATGG

PASO 2. Polimerización

AGGGTCC

5'GCAGTCCACGGGCATATACACGTCGTATCCAGTGC

CGTCAGGTGCCCGTATATGTGCAGCATAGGTCACG

CTTATGG

Producto

5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTTCGCACTGGATACGACGTGTATATGCCCGTGGACTGC 3'

Parte 2: q-PCR miR-455-3p

PASO 1. Hibridación del cDNA stem-loop con oligonucleótido Forward miR-455-3p

5' **GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC** **TA** **GGTATTTCGCACTGGATACGAC** **GTGTAT** **ATGCCCGTGGACTGC** 3' 3' TACGGGCACCTGACGCGGC 5'

PASO 2. Polimerización

CAGCATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGCACATA TACGGGCACCTGACGCGGC 5'
5' **GTCGTATCCAGTGCAGGGTCC** **TA** **GGTATTTCGCACTGGATACGAC** **GTGTAT** **ATGCCCGTGGACTGC** 3'

Producto Forward

CAGCATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGCACATA TACGGGCACCTGACGCGGC 5'

PASO 3. Hibridación del producto anterior con el oligonucleótido Reverse

5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3' 5' TACGGGCACCTGACGCGGC 3'
CAGCATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGCACATA TACGGGCACCTGACGCGGC 5'

PASO 4. Polimerización

5' GTGCAGGGTCCGAGGT ATTTCGCACTGGATACGAC **GTGTAT** **ATGCCCGTGGTCTGC** GCCG 3'
CAGCATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGCACATA TACGGGCACCTGACGCGGC 5'

Producto Reverse

5' GTGCAGGGTCCGAGGT ATTTCGCACTGGATACGAC **GTGTAT** **ATGCCCGTGGTCTGC** GCCG 3'

PASO 5. Detección SYBR GREEN

CAGCATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGCACATA TACGGGCACCTGACGCGGC 5'
* * * * *
5' GTGCAGGGTCCGAGGT ATTTCGCACTGGATACGAC **GTGTAT** **ATGCCCGTGGTCTGC** GCCG 3'

B. Anexo: Diseño de primers para RT-qPCR *stem loop* del miR-138-5p

mmu-mir-138-5p

1. Mature sequence mmu-miR-138-5p

>mmu-miR-138-5p MIMAT0000150
5'AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG 3'
271461 reads, 88 experiments

- Stem-loop miR-138-5p

5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGCCT 3'

- Forward miR-138-5p

5'CGGCAGCTGGTGGTGTGAAT 3'

- Reverse Universal oligonucleótido

5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'

Construcción

Reverse		Forward
5'GTGCAGGGTCCGAGGT 3'		5'CGGCAGCTGGTGGTGTGAAT 3'
5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGCCT 3'		5'AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG 3'
STEM-LOOP		miR-138-5p

Parte 1: RT-PCR stem-loop

Secuencias del microRNA y del stem-loop

1. Mature sequence mmu-miR-138-5p

>mmu-miR-138-5p MIMAT0000150
5'AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG 3'
271461 reads, 88 experiments

2. Oligonucleótido stem-loop

5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGCCT 3'

```

      AGGGTCC
5'GTCGTATCCAGTGC
3'TCCGGCCAGCATAGGTCACG
      CTTATGG
  
```

PASO 1. Hibridación del microRNA mir-138-5p con el oligonucleótido stem-loop

```

      AGGGTCC
5'AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGTCGTATCCAGTGC
      3'TCCGGCCAGCATAGGTCACG
      CTTATGG
  
```

PASO 2. Polimerización

```

      AGGGTCC
5'AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCGTCGTATCCAGTGC
3'TCGACCACAACACTTAGTCCGGCCAGCATAGGTCACG
      CTTATGG
  
```

Producto

5'GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGTATTCGCACTGGATACGACCGGCCTGATTCACAACACCAGCT 3'

Parte 2: q-PCR miR-138-5p**PASO 1. Hibridación del cDNA stem-loop con oligonucleótido Forward miR-138-5p**

3' TAAGTGTGTTGGTCGACGGC 5'
 5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGATTTCGACTGGATACGACCGGCCTGATTCAACACCAGCT 3'

PASO 2. Polimerización

3' CATTATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGGCCGGACTAAGTGTGTTGGTCGACGGC 5'
 5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCAGGATTTCGACTGGATACGACCGGCCTGATTCAACACCAGCT 3'

Producto Forward

3' CATTATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGGCCGGACTAAGTGTGTTGGTCGACGGC 5'

PASO 3. Hibridación del producto anterior con el oligonucleótido Reverse

5' GTGCAGGGTCCGAGGT 3'
 3' CATTATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGGCCGGACTAAGTGTGTTGGTCGACGGC 5'

PASO 4. Polimerización

5' GTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCGGCCTGATTCAACACCAGCTGCCG 3'
 3' CATTATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGGCCGGACTAAGTGTGTTGGTCGACGGC

Producto Reverse

5' GTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCGGCCTGATTCAACACCAGCTGCCG 3'

PASO 5. Detección SYBR GREEN

3' CATTATAGGTCACGTCCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGGCCGGACTAAGTGTGTTGGTCGACGGC 5'
 * * * * *
 5' GTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTGGATACGACCGGCCTGATTCAACACCAGCTGCCG 3'

C. Anexo: Diseño de primers para RT-qPCR stem loop del snRNA U6

U6 small nuclear RNA

>M10329.1 Mouse 4.8S U6 small nuclear RNA

```

5' TGGAACGATACAGAGAAGATTTAGCA 3'
5' GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTTGGAACGATACAGAGAAGATTTAGCATGGCCCTCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTT3'
5' TGGCTTTAAGCACTTCGCAA 5'
  
```

• Stem-loop U6-1

```

5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAATATG 3'
https://www.nature.com/articles/srep39899/tables/1
  
```

• Forward U6

```
5' TGGAACGATACAGAGAAGATTTAGCA 3'
```

• Reverse U6

```

5' AACGCTTCACGAATTTGCGT 3'
3' TGGCTTTAAGCACTTCGCAA 5'
  
```

PASO 1. Hibridación del U6 con el oligonucleótido stem-loop

```
5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAATATG 3'
```

```

          AGGGTCC
5' GTCGTATCCAGTGC
3' GTATAAACAGCATAGGTCACG
          CTTATGG
  
```

```

          T
          T
5' .....TGGCCCTCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTGTCGTATCCAGTGC
          AGGGTCC
3' GTATAAACAGCATAGGTCACG
          CTTATGG
  
```

PASO 2. Polimerización

```

          T
          T
5' .....TGGCCCTCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTGTCGTATCCAGTGC
          AGGGTCC
3' GTATAAACAGCATAGGTCACG
          CTTATGG
  
```

Producto

SECUENCIA DEL U6

```

5' GTGCTCGCTTCGGCAGCACATATACTAAAATTTGGAACGATACAGAGAAGATTTAGCATGGCCCTCGCAAGGATGACACGCAAATTCGTGAAGCGTTCATATTTT3'
5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTATCCTTGGCAGGGGCCATGCTAAATCTTCTCTCTGT
ATCGTTCCAATTTTAGTATATGTGCTGCCGAAGCGAGCAC 3'
  
```

Parte 2: q-PCR U6

PASO 1. Hibridación del cDNA stem-loop con oligonucleótido Forward U6

```

5' TGGAACGATACAGAGAAGATTTAGCA 3'
3' ACGATTTAGAAGAGACATAGCAAGGT 5'
  
```

```

          3' ACGATTTAGAAGAGACATAGCAAGGT 5'
5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTATCCTTGGCAGGGGCCATGCTAAATCTTCTCTGTATCCTTCTCTGT
TATATGTGCTGCCGAAGCGAGCAC 3'
  
```

PASO 2. Polimerización

```

3' CAGCATAGTGCAGTCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGTTTATACCTTGGAGTGTCTTAAACGCACAGTAGGAACGGCTCCCGGTACGATTTAGAAGAGACATAGCAAGGT 5'
5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAATATGGAACGCTTCACGAATTTGCGTGTATCCTTGGCAGGGGCCATGCTAAATCTTCTCTGTATCCTTCTCTGT
TATATGTGCTGCCGAAGCGAGCAC 3'
  
```

Producto Forward

```
3' CAGCATAGTGCAGTCCAGGCTCCATAAGCGTGACCTATGCTGTTTATACCTTGGAGTGTCTTAAACGCACAGTAGGAACGGCTCCCGGTACGATTTAGAAGAGACATAGCAAGGT 5'
```

Bibliografía

- Abbott, J, and H Holtzer. 1968. "The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells, V. The Effect of 5-Bromodeoxyuridine on Cloned Chondrocytes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 59 (4): 1144–51. <https://doi.org/10.1073/pnas.59.4.1144>.
- Acuña Merchán, Lizbeth, Patricia Sánchez Quintero, and Paula Ramírez Barbosa. 2017. "BOLETÍN DE INFORMACIÓN TÉCNICA ESPECIALIZADA, CUENTA DE ALTO COSTO." Bogotá D.C. www.cuentadealtocosto.org.
- Ahn, Jessica, Victoria Sanz-Moreno, and Christopher J Marshall. 2012. "The Metastasis Gene NEDD9 Product Acts through Integrin B3 and Src to Promote Mesenchymal Motility and Inhibit Amoeboid Motility." *Journal of Cell Science* 125 (7): 1814 LP – 1826. <https://doi.org/10.1242/jcs.101444>.
- Amano, Mutsuki, Kazuyasu Chihara, Nao Nakamura, Takako Kaneko, Yoshiharu Matsuura, and Kozo Kaibuchi. 1999. "The COOH Terminus of Rho-Kinase Negatively Regulates Rho-Kinase Activity." *Journal of Biological Chemistry* 274 (45): 32418–24. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.32418>.
- Amano, Mutsuki, Masaaki Ito, Kazushi Kimura, Yuko Fukata, Kazuyasu Chihara, Takeshi Nakano, Yoshiharu Matsuura, and Kozo Kaibuchi. 1996. "Phosphorylation and Activation of Myosin by Rho-Associated Kinase (Rho-Kinase)." *Journal of Biological Chemistry* 271 (34): 20246–49. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.34.20246>.
- Amano, Mutsuki, Masanori Nakayama, and Kozo Kaibuchi. 2010. "Rho-Kinase/ROCK: A Key Regulator of the Cytoskeleton and Cell Polarity." *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)* 67 (9): 545–54. <https://doi.org/10.1002/cm.20472>.
- Anisimov, V. 1994. "The Sole DNA Damage Induced by Bromodeoxyuridine Is Sufficient for Initiation of Both Aging and Carcinogenesis in Vivo." *Annals of the New York Academy of Sciences* 719 (1): 494–501. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb56854.x>.
- Bartel, David P. 2004. "Review MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function." *Cell* 116: 281–97. http://bartellab.wi.mit.edu/publication_reprints/Bartel_Cell_review04.pdf.
- Belle, Patricia A Van, Rosalie Elenitsas, Kapaettu Satyamoorthy, Jonathan T Wolfe, Dupont Guerry, Lynne Schuchter, Timothy J Van Belle, et al. 1999. "Progression-Related Expression of B3 Integrin in Melanomas and Nevi." *Human Pathology* 30 (5): 562–67. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(99\)90202-2](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0046-8177(99)90202-2).
- Bemis, Lynne T, Robert Chen, Carol M Amato, Elizabeth H Classen, Steven E Robinson, David G Coffey, Paul F Erickson, Yiqun G Shellman, and William A Robinson. 2008. "MicroRNA-137 Targets Microphthalmia-Associated Transcription Factor in Melanoma Cell Lines." *Cancer Research* 68 (5): 1362 LP – 1368. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/5/1362.abstract>.
- Ben-Ze'ev, A, and A Raz. 1985. "Relationship between the Organization and Synthesis of

- Vimentin and the Metastatic Capability of B16 Melanoma Cells." *Cancer Research* 45 (6): 2632—2641. <http://europepmc.org/abstract/MED/4039222>.
- Bonaventure, Jacky, Melanie J Domingues, and Lionel Larue. 2013. "Cellular and Molecular Mechanisms Controlling the Migration of Melanocytes and Melanoma Cells." *Pigment Cell & Melanoma Research* 26 (3): 316–25. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12080>.
- Bray, Freddie, Jacques Ferlay, Isabelle Soerjomataram, Rebecca L Siegel, Lindsey A Torre, and Ahmedin Jemal. 2018. "Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries." *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.
- Byers, H., T. Etoh, J. Doherty, A J. Sober, and M. Mihm Jr. 1991. "Cell Migration and Actin Organization in Cultured Human Primary, Recurrent Cutaneous and Metastatic Melanoma. Time-Lapse and Image Analysis." *The American Journal of Pathology* 139 (2): 423–35. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1867326>.
- Byers, Hugh Randolph, Takafumi Etoh†, Jacqueline Vink, Nancy Franklin, Sebastiano Gattoni-Celli, and Martin C Mihm Jr. 1992. "Actin Organization and Cell Migration of Melanoma Cells Relate to Differential Expression of Integrins and Actin-Associated Proteins." *The Journal of Dermatology* 19 (11): 847–52. <https://doi.org/10.1111/j.1346-8138.1992.tb03795.x>.
- Call, Katherine M., and William G. Thilly. 1991. "5-Azacytidine Inhibits the Induction of Transient TK-Deficient Cells by 5-Bromodeoxyuridine a Novel Hypothesis for the Facilitation of Hypermethylation by 5-Bromodeoxyuridine." *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 248 (1): 101–14. [https://doi.org/10.1016/0027-5107\(91\)90092-3](https://doi.org/10.1016/0027-5107(91)90092-3).
- Caramuta, Stefano, Suzanne Egyházi, Monica Rodolfo, Daniela Witten, Johan Hansson, Catharina Larsson, and Weng-Onn Lui. 2010. "MicroRNA Expression Profiles Associated with Mutational Status and Survival in Malignant Melanoma." *Journal of Investigative Dermatology* 130 (8): 2062–70. <https://doi.org/10.1038/JID.2010.63>.
- Carreira, Suzanne, Jane Goodall, Laurence Denat, Mercedes Rodriguez, Paolo Nuciforo, Keith S Hoek, Alessandro Testori, Lionel Larue, and Colin R Goding. 2006. "Mitf Regulation of Dia1 Controls Melanoma Proliferation and Invasiveness." *Genes & Development* 20 (24): 3426–39. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>.
- Caselitz, J, M Jänner, E Breitbart, K Weber, and M Osborn. 1983. "Malignant Melanomas Contain Only the Vimentin Type of Intermediate Filaments." *Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histopathology* 400 (1): 43–51. <https://doi.org/10.1007/BF00627007>.
- Chen, Jiamin, Harriet E Feilotter, Geneviève C Paré, Xiao Zhang, Joshua G W Pemberton, Cherif Garady, Dulcie Lai, Xiaolong Yang, and Victor A Tron. 2010. "MicroRNA-193b Represses Cell Proliferation and Regulates Cyclin D1 in Melanoma." *The American Journal of Pathology* 176 (5): 2520–29. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.091061>.
- Chen, Si-Yang, Yuan Du, and Jian Song. 2018. "MicroRNA-340 Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition by Impairing ROCK-1-Dependent Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway in Epithelial Cells from Human Benign Prostatic Hyperplasia." *Chinese Medical Journal* 131 (16): 2008–12. <https://doi.org/10.4103/0366-6999.238145>.
- Clark, Edwin A, Todd R Golub, Eric S Lander, and Richard O Hynes. 2000. "Genomic Analysis of Metastasis Reveals an Essential Role for RhoC." *Nature* 406 (6795): 532–35. <https://doi.org/10.1038/35020106>.
- Cohen, Cynthia, Angel Zavala-Pompa, Judy H Sequeira, Mamoru Shoji, Deborah G

- Sexton, George Cotsonis, Francesca Cerimele, Baskaran Govindarajan, Nada Macaron, and Jack L Arbiser. 2002. "Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Is an Early Event in Melanoma Progression." *Clinical Cancer Research* 8 (12): 3728 LP – 3733. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/8/12/3728.abstract>.
- Comi, P, S Ottolenghi, B Giglioli, G Migliaccio, A R Migliaccio, E Bassano, S Amadori, G Mastroberardino, and C Peschle. 1986. "Bromodeoxyuridine Treatment of Normal Adult Erythroid Colonies: An In Vitro Model for Reactivation of Human Fetal Globin Genes." *Blood*. Vol. 68. www.bloodjournal.org.
- "Cuenta de Alto Costo, Asamblea General Ordinaria, Anexo Técnico." 2020.
- Cukierman, Edna, Roumen Pankov, Daron R Stevens, and Kenneth M Yamada. 2001. "Taking Cell-Matrix Adhesions to the Third Dimension." *Science* 294 (5547): 1708 LP – 1712. <https://doi.org/10.1126/science.1064829>.
- Damsky, William E., David P. Curley, Manjula Santhanakrishnan, Lara E. Rosenbaum, James T. Platt, Bonnie E. Gould Rothberg, Makoto M. Taketo, et al. 2011. "β-Catenin Signaling Controls Metastasis in Braf-Activated Pten-Deficient Melanomas." *Cancer Cell* 20 (6): 741–54. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.10.030>.
- Djordjevic, B, and W Szybalski. 1960. "Genetics of Human Cell Lines. III. Incorporation of 5-Bromo- and 5-Iododeoxyuridine into the Deoxyribonucleic Acid of Human Cells and Its Effect on Radiation Sensitivity." *The Journal of Experimental Medicine* 112 (3): 509–31. <https://doi.org/10.1084/jem.112.3.509>.
- Doyle, Andrew D, Nicole Carvajal, Albert Jin, Kazue Matsumoto, and Kenneth M Yamada. 2015. "Local 3D Matrix Microenvironment Regulates Cell Migration through Spatiotemporal Dynamics of Contractility-Dependent Adhesions." *Nature Communications* 6 (1): 8720. <https://doi.org/10.1038/ncomms9720>.
- El-Sibai, Mirvat, Olivier Pertz, Huan Pang, Shu-Chin Yip, Mike Lorenz, Marc Symons, John S Condeelis, Klaus M Hahn, and Jonathan M Backer. 2008. "RhoA/ROCK-Mediated Switching between Cdc42- and Rac1-Dependent Protrusion in MTLn3 Carcinoma Cells." *Experimental Cell Research* 314 (7): 1540–52. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2008.01.016>.
- Epstein, William L, Kimie Fukuyama, and Thomas E Drake. 1973. "Ultrastructural Effects of Thymidine Analogs on Melanosomes and Virus Activation in Cloned Hamster Melanoma Cells in Culture." *YALE JOURNAL OF BIOLOGY AND MEDICINE*. Vol. 46. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2592023/pdf/yjbm00160-0147.pdf>.
- Escobar, Lina Maria. 2001. "Expresión Diferencial Del Gen Rock Alfa e Inhibición Del Crecimiento de Células de Melanoma Humano y Murino Inducido Por La Genisteina y La L-Tirosina in Vitro." Pontificia Universidad Javeriana.
- Esteva, Andre, Brett Kuprel, Roberto A Novoa, Justin Ko, Susan M Swetter, Helen M Blau, and Sebastian Thrun. 2017. "Dermatologist-Level Classification of Skin Cancer with Deep Neural Networks." *Nature* 542 (January): 115. <http://dx.doi.org/10.1038/nature21056>.
- Fan, Tao, Shunlin Jiang, Nancy Chung, Ali Alikhan, Christina Ni, Chyi-Chia Richard Lee, and Thomas J Hornyak. 2011. "EZH2-Dependent Suppression of a Cellular Senescence Phenotype in Melanoma Cells by Inhibition of P21/CDKN1A Expression." *Molecular Cancer Research : MCR* 9 (4): 418–29. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0511>.
- Felicetti, Federica, M Cristina Errico, Lisabianca Bottero, Patrizia Segnalini, Antonella Stoppacciaro, Mauro Biffoni, Nadia Felli, et al. 2008. "The Promyelocytic Leukemia Zinc Finger–MicroRNA-221/-222 Pathway Controls Melanoma Progression through

- Multiple Oncogenic Mechanisms." *Cancer Research* 68 (8): 2745 LP – 2754. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/68/8/2745.abstract>.
- Felicetti, Federica, M Cristina Errico, Patrizia Segnalini, Gianfranco Mattia, and Alessandra Carè. 2008. "MicroRNA-221 and -222 Pathway Controls Melanoma Progression." *Expert Review of Anticancer Therapy* 8 (11): 1759–65. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.11.1759>.
- Feng, Yangbo, Philip V LoGrasso, Olivier Defert, and Rongshi Li. 2016. "Rho Kinase (ROCK) Inhibitors and Their Therapeutic Potential." *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (6): 2269–2300. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00683>.
- FitzGerald, M G, D P Harkin, S Silva-Arrieta, D J MacDonald, L C Lucchina, H Unsal, E O'Neill, et al. 1996. "Prevalence of Germ-Line Mutations in P16, P19ARF, and CDK4 in Familial Melanoma: Analysis of a Clinic-Based Population." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93 (16): 8541–45. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8710906>.
- Flørenes, Vivi Ann, Martina Skrede, Kjersti Jørgensen, and Jahn M Nesland. 2004. "Deacetylase Inhibition in Malignant Melanomas: Impact on Cell Cycle Regulation and Survival." *Melanoma Research* 14 (3): 173–81. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15179185>.
- Flórez, Óscar, and Luis Alberto. Gómez. 2008. "Expresión diferencial de ARNs pequeños en células de melanoma inducidas a supresión de crecimiento in vitro." *Bioquímica*. Universidad Nacional de Colombia. <http://eds.a.ebscohost.com.ezproxy.unal.edu.co/eds/detail/detail?vid=2&sid=e81e3236-0391-48e3-b816-49637e9373b2%40sessionmgr4001&hid=4213&bdata=Jmxhbmc9ZXMmc2l0ZT1lZHMtbGI2ZQ%3D%3D#AN=unc.000385548&db=cat02704a>.
- Flórez Vargas, Óscar Roberto, and L A Gomez. 2008. "Expresión Diferencial de Dos MicroRNAs Asociados Con El Silenciamiento de La Ciclina D1 En Células de Melanoma B16 En Senescencia Inducida Por La 5-Bromo-2-Desoxiuridina." *Revista de La Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*. <http://ezproxy.unal.edu.co/login?url=http://search.ebscohost.com/login.aspx?direct=true&db=cat02704a&AN=unc.000385548&lang=es&site=eds-live>.
- Fukata, Y, N Oshiro, N Kinoshita, Y Kawano, Y Matsuoka, V Bennett, Y Matsuura, and K Kaibuchi. 1999. "Phosphorylation of Adducin by Rho-Kinase Plays a Crucial Role in Cell Motility." *The Journal of Cell Biology* 145 (2): 347–61. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10209029>.
- Gao, Xianzheng, Huaying Zhao, Changying Diao, Xiaohui Wang, Yilin Xie, Yaqing Liu, Jing Han, and Mingzhi Zhang. 2018. "MiR-455-3p Serves as Prognostic Factor and Regulates the Proliferation and Migration of Non-Small Cell Lung Cancer through Targeting HOXB5." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 495 (1): 1074–80. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.11.123>.
- Garbe, Claus, and Ulrike Leiter. 2009. "Melanoma Epidemiology and Trends." *Clinics in Dermatology* 27 (1): 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2008.09.001>.
- Garcia, Raul I., Irving Werner, and George Szabo. 1979. "Effect of 5-Bromo-2'-Deoxyuridine on Growth and Differentiation of Cultured Embryonic Retinal Pigment Cells." *In Vitro* 15 (10): 779–88. <https://doi.org/10.1007/BF02618304>.
- Giotta, G J, K W Brunson, and R Lotan. 1980. "The Effects of 5-Bromodeoxyuridine on Cyclic AMP Levels and Cytoskeletal Organization in Malignant Melanoma Cells." *Cell Biology International Reports* 4 (1): 105–16. [https://doi.org/10.1016/0309-1651\(80\)90015-6](https://doi.org/10.1016/0309-1651(80)90015-6).

- Githens, S, R Pictet, P Phelps, and W J Rutter. 1976. "5-Bromodeoxyuridine May Alter the Differentiative Program of the Embryonic Pancreas." *The Journal of Cell Biology* 71 (2): 341–56. <https://doi.org/10.1083/jcb.71.2.341>.
- Glud, Martin, Valentina Manfé, Edyta Biskup, Line Holst, Anne Marie Ahlburg Dirksen, Nina Hastrup, Finn C. Nielsen, Krzysztof T. Drzewiecki, and Robert Gniadecki. 2011. "MicroRNA MiR-125b Induces Senescence in Human Melanoma Cells." *Melanoma Research* 21 (3): 253–56. <https://doi.org/10.1097/CMR.0b013e328345333b>.
- Goldstein, Alisa M, May Chan, Mark Harland, Elizabeth M Gillanders, Nicholas K Hayward, Marie-Francoise Avril, Esther Azizi, et al. 2006. "High-Risk Melanoma Susceptibility Genes and Pancreatic Cancer, Neural System Tumors, and Uveal Melanoma across GenoMEL." *Cancer Research* 66 (20): 9818 LP – 9828. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/66/20/9818.abstract>.
- Gómez, L., M. Rieber, and M. Rieber. 1995. "Decrease in Actin Gene Expression in Melanoma Cells Compared to Melanocytes Is Partly Counteracted by BrdU-induced Cell Adhesion and Antagonized by L-tyrosine Induction of Terminal Differentiation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 216 (1).
- . 1996. "PCR-Mediated Differential Display and Cloning of a Melanocyte Gene Decreased in Malignant Melanoma and Up-Regulated with Sensitization to DNA Damage." *DNA and Cell Biology* 15 (5): 423–27. <https://doi.org/10.1089/dna.1996.15.423>.
- Goto, Hidemasa, Hidetaka Kosako, Kazushi Tanabe, Maki Yanagida, Minoru Sakurai, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, and Masaki Inagaki. 1998. "Phosphorylation of Vimentin by Rho-Associated Kinase at a Unique Amino-Terminal Site That Is Specifically Phosphorylated during Cytokinesis." *Journal of Biological Chemistry* 273 (19): 11728–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11728>.
- Gray-Schopfer, Vanessa, Claudia Wellbrock, and Richard Marais. 2007. "Melanoma Biology and New Targeted Therapy." *Nature* 445 (February): 851. <http://dx.doi.org/10.1038/nature05661>.
- Gunturiz, María Luz., and Luis Alberto. Gómez. 2011. "Expresión de Los Genes Que Regulan La Síntesis de Melanina: MITF-M, TRP1 y TRP2 En Células de Melanoma Maligno B16 y A375." In *Instituto Nacional de Salud*, 51. Bogotá: Biomédica.
- Guo, Weinan, Huina Wang, Yuqi Yang, Sen Guo, Weigang Zhang, Yu Liu, Xiuli Yi, et al. 2017. "Down-Regulated MiR-23a Contributes to the Metastasis of Cutaneous Melanoma by Promoting Autophagy." *Theranostics* 7 (8): 2231–49. <https://doi.org/10.7150/thno.18835>.
- Guy, Gery P, Cheryll C Thomas, Trevor Thompson, Meg Watson, Greta M Massetti, and Lisa C Richardson. 2015. "Vital Signs: Melanoma Incidence and Mortality Trends and Projections — United States, 1982–2030." *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 64 (21): 591–96. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4584771/>.
- Haass, Nikolas K., Keiran S.M. Smalley, and Meenhard Herlyn. 2003. "The Role of Altered Cell–Cell Communication in Melanoma Progression." *Journal of Molecular Histology* 35 (3): 309–18. <https://doi.org/10.1023/B:HIJO.0000032362.35354.bb>.
- Hafliadóttir, Benedikta S, Kristín Bergsteinsdóttir, Christian Praetorius, and Eiríkur Steingrímsson. 2010. "MiR-148 Regulates Mitf in Melanoma Cells." *PLOS ONE* 5 (7): e11574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011574>.
- Hall, A. 2005. "Rho GTPases and the Control of Cell Behaviour." *Biochemical Society Transactions* 33 (5): 891 LP – 895. <http://www.biochemsoctrans.org/content/33/5/891.abstract>.

- Hanniford, D, M F Segura, J Zhong, E Philips, X Jirau-Serrano, F Darvishian, R S Berman, et al. 2015. "Identification of Metastasis-Suppressive MicroRNAs in Primary Melanoma." *J Natl Cancer Inst* 107 (3). <https://doi.org/10.1093/jnci/dju494>.
- Hauptman, Nina, and Damjan Glavač. 2013. "Long Non-Coding RNA in Cancer." *International Journal of Molecular Sciences* 14 (3): 4655–69. <https://doi.org/10.3390/ijms14034655>.
- Haycock, J W. 1993. "Polyvinylpyrrolidone as a Blocking Agent in Immunochemical Studies." *Analytical Biochemistry* 208 (2): 397–99. <https://doi.org/https://doi.org/10.1006/abio.1993.1068>.
- Hendrix, M J, E A Seftor, Y W Chu, R E Seftor, R B Nagle, K M McDaniel, S P Leong, K H Yohem, A M Leibovitz, and F L Jr Meyskens. 1992. "Coexpression of Vimentin and Keratins by Human Melanoma Tumor Cells: Correlation with Invasive and Metastatic Potential." *Journal of the National Cancer Institute* 84 (3): 165–74. <https://doi.org/10.1093/jnci/84.3.165>.
- Hill, B T, A Tsuboi, and R Baserga. 1974. "Effect of 5-Bromodeoxyuridine on Chromatin Transcription in Confluent Fibroblasts." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71 (2): 455–59. <https://doi.org/10.1073/pnas.71.2.455>.
- Hodis, Eran, Ian R. Watson, Gregory V. Kryukov, Stefan T. Arold, Marcin Imielinski, Jean-Philippe Theurillat, Elizabeth Nickerson, et al. 2012. "A Landscape of Driver Mutations in Melanoma." *Cell* 150 (2): 251–63. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>.
- Hoek, Keith S, Ossia M Eichhoff, Natalie C Schlegel, Udo Döbbeling, Nikita Kobert, Leo Schaerer, Silvio Hemmi, and Reinhard Dummer. 2008. "In Vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States." *Cancer Research* 68 (3): 650–56. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-2491>.
- Hoek, Keith S, and Colin R Goding. 2010. "Cancer Stem Cells versus Phenotype-Switching in Melanoma." *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (6): 746–59. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>.
- Hofmann, Uta B, Johan R Westphal, Goos N P van Muijen, and Dirk J Ruiter. 2000. "Matrix Metalloproteinases in Human Melanoma." *Journal of Investigative Dermatology* 115 (3): 337–44. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00068.x>.
- Holst, Line Marie Broksø, Bogumil Kaczkowski, Martin Glud, Ewa Futoma-Kazmierczak, Lennart Friis Hansen, and Robert Gniadecki. 2010. "The MicroRNA Molecular Signature of Atypic and Common Acquired Melanocytic Nevi: Differential Expression of MiR-125b and Let-7c." *Experimental Dermatology* 20 (3): 278–80. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0625.2010.01163.x>.
- Hombach, Sonja, and Markus Kretz. 2013. "The Non-Coding Skin: Exploring the Roles of Long Non-Coding RNAs in Epidermal Homeostasis and Disease." *BioEssays* 35 (12): 1093–1100. <https://doi.org/10.1002/bies.201300068>.
- Hoshino, T, T Nagashima, K G Cho, R L Davis, J Donegan, M Slusarz, and C B Wilson. 1989. "Variability in the Proliferative Potential of Human Gliomas." *Journal of Neuro-Oncology* 7 (2): 137–43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550593>.
- Huntington, Jonathan T, Janiel M Shields, Channing J Der, Colby A Wyatt, Ulrike Benbow, Craig L Slingluff, and Constance E Brinckerhoff. 2004. "Overexpression of Collagenase 1 (MMP-1) Is Mediated by the ERK Pathway in Invasive Melanoma Cells: Role of BRAF Mutation and Fibroblast Growth Factor Signaling." *The Journal of Biological Chemistry* 279 (32): 33168–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405102200>.

- Hurk, Karin Van den, Hanneke E.C. Niessen, Jürgen Veeck, Joost J. van den Oord, Maurice A.M. van Steensel, Axel zur Hausen, Manon van Engeland, and Véronique J.L. Winnepenninckx. 2012. "Genetics and Epigenetics of Cutaneous Malignant Melanoma: A Concert out of Tune." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1826 (1): 89–102. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.03.011>.
- Ishizaki, T, M Maekawa, K Fujisawa, K Okawa, A Iwamatsu, A Fujita, N Watanabe, et al. 1996. "The Small GTP-Binding Protein Rho Binds to and Activates a 160 KDa Ser/Thr Protein Kinase Homologous to Myotonic Dystrophy Kinase." *The EMBO Journal* 15 (8): 1885–93. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8617235>.
- Jiang, Lu, Xiqiang Liu, Antonia Kolokythas, Jinsheng Yu, Anxun Wang, Caroline E Heidbreder, Fei Shi, and Xiaofeng Zhou. 2010. "Downregulation of the Rho GTPase Signaling Pathway Is Involved in the MicroRNA-138-Mediated Inhibition of Cell Migration and Invasion in Tongue Squamous Cell Carcinoma." *International Journal of Cancer* 127 (3): 505–12. <https://doi.org/10.1002/ijc.25320>.
- Ju, Robert J, Samantha J Stehbens, and Nikolas K Haass. 2018. "The Role of Melanoma Cell-Stroma Interaction in Cell Motility, Invasion, and Metastasis." *Frontiers in Medicine* 5 (November): 307. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00307>.
- Kamai, T, K Arai, S Sumi, T Tsujii, M Honda, T Yamanishi, and K.-I. Yoshida. 2002. "The Rho/Rho-Kinase Pathway Is Involved in the Progression of Testicular Germ Cell Tumour." *BJU International* 89 (4): 449–53. <https://doi.org/10.1046/j.1464-4096.2001.01920.x>.
- Kamai, Takao, Toshihiko Tsujii, Kyoko Arai, Kentaro Takagi, Hidekazu Asami, Yuji Ito, and Hiroyuki Oshima. 2003. "Significant Association of Rho/ROCK Pathway with Invasion and Metastasis of Bladder Cancer." *Clinical Cancer Research* 9 (7): 2632 LP – 2641. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/9/7/2632.abstract>.
- Kitazawa, Toshio, Masumi Eto, Terence P Woodsome, and David L Brautigan. 2000. "Agonists Trigger G Protein-Mediated Activation of the CPI-17 Inhibitor Phosphoprotein of Myosin Light Chain Phosphatase to Enhance Vascular Smooth Muscle Contractility." *Journal of Biological Chemistry* 275 (14): 9897–9900. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9897>.
- Kosary, Carol L, Sean F Altekruze, Jennifer Ruhl, Richard Lee, and Lois Dickie. 2014. "Clinical and Prognostic Factors for Melanoma of the Skin Using SEER Registries: Collaborative Stage Data Collection System, Version 1 and Version 2." *Cancer* 120 (S23): 3807–14. <https://doi.org/10.1002/cncr.29050>.
- Kumar, S., M. Vijayan, and P Reddy. 2017. "MicroRNA-455-3p as a Potential Peripheral Biomarker for Alzheimer's Disease." *Human Molecular Genetics*, no. 26(19). <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx267>.
- Kümper, Sandra, Faraz K Mardakheh, Afshan McCarthy, Maggie Yeo, Gordon W Stamp, Angela Paul, Jonathan Worboys, et al. 2016. "Rho-Associated Kinase (ROCK) Function Is Essential for Cell Cycle Progression, Senescence and Tumorigenesis." *eLife* 5 (January): e12994–e12994. <https://doi.org/10.7554/eLife.12203>.
- Kunz, Manfred. 2013. "MicroRNAs in Melanoma Biology." In , 103–20. https://doi.org/10.1007/978-94-007-5590-1_6.
- Kuphal, Silke, Richard Bauer, and Anja-Katrin Bosserhoff. 2005. "Integrin Signaling in Malignant Melanoma." *Cancer and Metastasis Reviews* 24 (2): 195–222. <https://doi.org/10.1007/s10555-005-1572-1>.
- Lämmermann, Tim, and Michael Sixt. 2009. "Mechanical Modes of 'amoeboid' Cell Migration." *Current Opinion in Cell Biology* 21 (5): 636–44. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.05.003>.

- Larson, Allison R, Karen A Dresser, Qian Zhan, Cecilia Lezcano, Bruce A Woda, Benafsha Yosufi, John F Thompson, et al. 2014. "Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Correlates with Increasing Morphologic Dysplasia in Melanocytic Tumors." *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 27 (7): 936–44. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.224>.
- Larue, Lionel, Mayuko Kumasaka, and Colin R Goding. 2003. "β-Catenin in the Melanocyte Lineage." *Pigment Cell Research* 16 (3): 312–17. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0749.2003.00050.x>.
- Lauffenburger, D A, and A F Horwitz. 1996. "Cell Migration: A Physically Integrated Molecular Process." *Cell* 84 (3): 359–69. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81280-5](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81280-5).
- Lawrence, Michael, Petar Stojanov, Paz Polak, Gregory Kryukov, and Kristian Cibulskis. 2013. "Mutational Heterogeneity in Cancer and the Search for New Cancer Genes." *Nature* 499 (7457): 214–18. <https://doi.org/10.1038/nature12213>.
- Leung, T, X Q Chen, E Manser, and L Lim. 1996. "The P160 RhoA-Binding Kinase ROK Alpha Is a Member of a Kinase Family and Is Involved in the Reorganization of the Cytoskeleton." *Molecular and Cellular Biology* 16 (10): 5313–27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC231530/>.
- Leung, Thomas, Edward Manser, Lydia Tan, and Louis Lim. 1995. "A Novel Serine/Threonine Kinase Binding the Ras-Related RhoA GTPase Which Translocates the Kinase to Peripheral Membranes." *Journal of Biological Chemistry* 270 (49): 29051–54. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.49.29051>.
- Levkoff, Lindsay H, Marshall Gregory P, Heather H Ross, Maria Caldeira, Brent A Reynolds, Meryem Cakiroglu, Christopher L Mariani, Wolfgang J Streit, and Eric D Laywell. 2008. "Bromodeoxyuridine Inhibits Cancer Cell Proliferation In Vitro and In Vivo." *Neoplasia* 10: 804–16. <https://doi.org/10.1593/neo.08382>.
- Levkoff, Lindsay H, Gregory P Marshall 2nd, Heather H Ross, Maria Caldeira, Brent A Reynolds, Meryem Cakiroglu, Christopher L Mariani, Wolfgang J Streit, and Eric D Laywell. 2008. "Bromodeoxyuridine Inhibits Cancer Cell Proliferation in Vitro and in Vivo." *Neoplasia (New York, N.Y.)* 10 (8): 804–16. <https://doi.org/10.1593/neo.08382>.
- Li, Huiqin, Yang Sheng, Ying Zhang, Nan Gao, Xiangyun Deng, and Xiugui Sheng. 2017. "MicroRNA-138 Is a Potential Biomarker and Tumor Suppressor in Human Cervical Carcinoma by Reversely Correlated with TCF3 Gene." *Gynecologic Oncology* 145 (3): 569–76. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.01.018>.
- Li, Man, Baogang Zhang, Baocun Sun, Xuan Wang, Xinchao Ban, Tao Sun, Zhiyong Liu, and Xiulan Zhao. 2010. "A Novel Function for Vimentin: The Potential Biomarker for Predicting Melanoma Hematogenous Metastasis." *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR* 29 (1): 109. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-29-109>.
- Li, Xiaojie, Jianya He, Miaomiao Shao, Bai Cui, Fei Peng, Jiao Li, Yan Ran, et al. 2018. "Downregulation of MiR-218-5p Promotes Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells via Activation of CD44-ROCK Signaling." *Biomedicine & Pharmacotherapy* 106 (October): 646–54. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.151>.
- Lian, Christine Guo, Yufei Xu, Craig Ceol, Feizhen Wu, Allison Larson, Karen Dresser, Wenqi Xu, et al. 2012. "Loss of 5-Hydroxymethylcytosine Is an Epigenetic Hallmark of Melanoma." *Cell* 150 (6): 1135–46. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.07.033>.
- Littlefield, John W, and Elizabeth A Gould. 1960. "The Toxic Effect of 5-Bromodeoxyuridine on Cultured Epithelial Cells." *Journal of Biological Chemistry*

- 235 (4): 1129–33. <http://www.jbc.org/content/235/4/1129.short>.
- Liu, S., M. Tetzlaff, A. Liu, B Liegl-Atzwanger, J Guo, and X Xu. 2012. “Loss of MicroRNA-205 Expression Is Associated with Melanoma Progression.” *Lab Invest* 92 (7): 1084–96. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2012.62>.
- Liu, Xiqiang, Cheng Wang, Zujian Chen, Yi Jin, Yun Wang, Antonia Kolokythas, Yang Dai, and Xiaofeng Zhou. 2011. “MicroRNA-138 Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma Cell Lines.” *The Biochemical Journal* 440 (1): 23–31. <https://doi.org/10.1042/BJ20111006>.
- Maekawa, Midori, Toshimasa Ishizaki, Shuken Boku, Naoki Watanabe, Akiko Fujita, Akihiro Iwamatsu, Takashi Obinata, Kazumasa Ohashi, Kensaku Mizuno, and Shuh Narumiya. 1999. “Signaling from Rho to the Actin Cytoskeleton Through Protein Kinases ROCK and LIM-Kinase.” *Science* 285 (5429): 895 LP – 898. <http://science.sciencemag.org/content/285/5429/895.abstract>.
- Masterson, Joanne C., and Shirley O’Dea. 2007. “5-Bromo-2-Deoxyuridine Activates DNA Damage Signalling Responses and Induces a Senescence-like Phenotype in P16-Null Lung Cancer Cells.” *Anti-Cancer Drugs* 18 (9): 1053–68. <https://doi.org/10.1097/CAD.0b013e32825209f6>.
- Matsui, T, M Maeda, Y Doi, S Yonemura, M Amano, K Kaibuchi, S Tsukita, and S Tsukita. 1998. “Rho-Kinase Phosphorylates COOH-Terminal Threonines of Ezrin/Radixin/Moesin (ERM) Proteins and Regulates Their Head-to-Tail Association.” *The Journal of Cell Biology* 140 (3): 647–57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9456324>.
- Matthews, Natalie H., Wen-Qing. Li, Abrar A. Qureshi, Martin A. Weinstock, and Eunyong Cho. 2017. “Etiology and Therapy.” In , edited by MD William H. Ward, MD and Jeffrey M. Farma. Philadelphia,PA, USA. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.15586/codon.cutaneousmelanoma.2017> Edited.
- McBride, Shirley, Derek Walsh, Paula Meleady, Noel Daly, and Martin Clynes. 1999. “Bromodeoxyuridine Induces Keratin Protein Synthesis at a Posttranscriptional Level in Human Lung Tumour Cell Lines.” *Differentiation* 64 (3): 185–93. <https://doi.org/10.1046/J.1432-0436.1999.6430185.X>.
- Meleady, Paula, and Martin Clynes. 2001. “Bromodeoxyuridine Induces Integrin Expression at Transcriptional (A2 Subunit) and Post-Transcriptional (B1 Subunit) Levels, and Alters the Adhesive Properties of Two Human Lung Tumour Cell Lines.” *Cell Communication & Adhesion* 8 (February): 45–59.
- Meng, Fanjun, Yuxia Zhang, Xing Li, Juan Wang, and Zhiyu Wang. 2017. “Clinical Significance of MiR-138 in Patients with Malignant Melanoma through Targeting of PDK1 in the PI3K/AKT Autophagy Signaling Pathway.” *Oncology Reports* 38 (3): 1655–62. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5838>.
- Mueller, Daniel W, and Anja-Katrin Bosserhoff. 2010. “The Evolving Concept of ‘Melano-MiRs’– MicroRNAs in Melanomagenesis.” *Pigment Cell & Melanoma Research* 23 (5): 620–26. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00734.x>.
- Mueller, Daniel W, Michael Rehli, and Anja K Bosserhoff. 2009. “MiRNA Expression Profiling in Melanocytes and Melanoma Cell Lines Reveals MiRNAs Associated with Formation and Progression of Malignant Melanoma.” *Journal of Investigative Dermatology* 129: 1740–51. <https://doi.org/10.1038/jid.2008.452>.
- Müller, D W, and A-K Bosserhoff. 2008. “Integrin B3 Expression Is Regulated by Let-7a MiRNA in Malignant Melanoma.” *Oncogene* 27 (August): 6698. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.282>.
- Nakagawa, Osamu, Kazuko Fujisawa, Toshimasa Ishizaki, Yuji Saito, Kazuwa Nakao,

- and Shuh Narumiya. 1996. "ROCK-I and ROCK-II, Two Isoforms of Rho-Associated Coiled-Coil Forming Protein Serine/Threonine Kinase in Mice." *FEBS Letters* 392 (2): 189–93. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00811-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00811-3).
- Nakajima, Masahide, Kazutaka Hayashi, Yasuhiro Egi, Ken-ichi Katayama, Yusaku Amano, Masayoshi Uehata, Makio Ohtsuki, et al. 2003. "Effect of Wf-536, a Novel ROCK Inhibitor, against Metastasis of B16 Melanoma." *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 52 (4): 319–24. <https://doi.org/10.1007/s00280-003-0641-9>.
- Nowakowski, R S, S B Lewin, and M W Miller. 1989. "Bromodeoxyuridine Immunohistochemical Determination of the Lengths of the Cell Cycle and the DNA-Synthetic Phase for an Anatomically Defined Population." *Journal of Neurocytology* 18 (3): 311–18. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2746304>.
- Nyholm, Anne Marie, Catharina M Lerche, Valentina Manfé, Edyta Biskup, Peter Johansen, Niels Morling, Birthe Mørk Thomsen, Martin Glud, and Robert Gniadecki. 2014. "MiR-125b Induces Cellular Senescence in Malignant Melanoma." *BMC Dermatology* 14 (April): 8. <https://doi.org/10.1186/1471-5945-14-8>.
- Obernosterer, Gregor, Philipp J F Leuschner, Mattias Alenius, and Javier Martinez. 2006. "Post-Transcriptional Regulation of MicroRNA Expression." *RNA (New York, N.Y.)* 12 (7): 1161–67. <https://doi.org/10.1261/rna.2322506>.
- Orgaz, Jose L, Eva Crosas-Molist, Amine Sadok, Anna Perdrix-Rosell, Oscar Maiques, Irene Rodriguez-Hernandez, Jo Monger, et al. 2020. "Myosin II Reactivation and Cytoskeletal Remodeling as a Hallmark and a Vulnerability in Melanoma Therapy Resistance." *Cancer Cell* 37 (1): 85-103.e9. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccell.2019.12.003>.
- Peñalosa, Natalia. 2000. "Expresión Del Gen PRL-1 En Células de Melanoma Murino B-16 Inducidas a Supresión Del Crecimiento Con El Sensibilizador a La Radiación Ultravioleta: Bromodesoxiuridina." Universidad Nacional de Colombia.
- Peng, F, J Jiang, Y Yu, R Tian, X Guo, X Li, M Shen, et al. 2013. "Direct Targeting of SUZ12/ROCK2 by MiR-200b/c Inhibits Cholangiocarcinoma Tumourigenesis and Metastasis." *British Journal of Cancer* 109 (12): 3092–3104. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.655>.
- Peng, Yueting, Zhongyuan Chen, Yu Chen, Shun Li, Ying Jiang, Hong Yang, Chunhui Wu, et al. 2019. "ROCK Isoforms Differentially Modulate Cancer Cell Motility by Mechanosensing the Substrate Stiffness." *Acta Biomaterialia* 88 (April): 86–101. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.02.015>.
- Prados, Michael D, Wendy Seiferheld, Howard M Sandler, Jan C Buckner, Theodore Phillips, Christopher Schultz, Raul Urtasun, et al. 2004. "Phase III Randomized Study of Radiotherapy plus Procarbazine, Lomustine, and Vincristine with or without BUdR for Treatment of Anaplastic Astrocytoma: Final Report of RTOG 9404." *International Journal of Radiation Oncology • Biology • Physics* 58 (4): 1147–52. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.08.024>.
- Price, Peter M. 1976. "The Effect of 5-Bromodeoxyuridine on Messenger RNA Production in Cultured Cells." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis* 447 (3): 304–11. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(76\)90053-8](https://doi.org/10.1016/0005-2787(76)90053-8).
- Rambow, F, A Bechadergue, F Luciani, G Gros, M Domingues, J Bonaventure, G Meurice, J C Marine, and L Larue. 2016. "Regulation of Melanoma Progression through the TCF4/MiR-125b/NEDD9 Cascade." *J Invest Dermatol* 136 (6): 1229–37. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2016.02.803>.
- Rauth, Sikha, and Richard L. Davidson. 1993. "Suppression of Tyrosinase Gene Expression by Bromodeoxyuridine in Syrian Hamster Melanoma Cells Is Not Due to

- Its Incorporation into Upstream or Coding Sequences of the Tyrosinase Gene.” *Somatic Cell and Molecular Genetics* 19 (3): 285–93.
<https://doi.org/10.1007/BF01233076>.
- Rebhun, Robert B, Hua Cheng, Jeffrey E Gershenwald, Dominic Fan, Isaiah J Fidler, and Robert R Langley. 2010. “Constitutive Expression of the Alpha4 Integrin Correlates with Tumorigenicity and Lymph Node Metastasis of the B16 Murine Melanoma.” *Neoplasia (New York, N. Y.)* 12 (2): 173–82.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20126475>.
- Ridley, Anne J., and Alan Hall. 1992. “The Small GTP-Binding Protein Rho Regulates the Assembly of Focal Adhesions and Actin Stress Fibers in Response to Growth Factors.” *Cell* 70 (3): 389–99. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90163-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90163-7).
- Rieber, M, M S Rieber, C Urbina, and R Lira. 1984. “Relationship of a Novel Extracellular Matrix Glycoprotein to Cell Detachment in Highly Metastatic B16 Melanoma: Modulating Effect of Bromodeoxyuridine.” *International Journal of Cancer* 34 (3): 427–32. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910340322>.
- . 1989. “Differential Response of Adherent and Unanchored Melanoma Cells to Bromodeoxyuridine Evidenced by Specific Lectin-Binding Protein Changes.” *International Journal of Cancer* 43 (5): 841—844.
<https://doi.org/10.1002/ijc.2910430517>.
- Rieber, Manuel, and Miguel A Castillo. 1984. “Unequal Forms of 140–110 KD Glycoproteins in B16 Melanoma Cells with Differing Detachment Properties and Metastatic Behavior: Influence of Bromodeoxyuridine.” *International Journal of Cancer* 33 (6): 765–70. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910330609>.
- Riento, Kirsi, and Anne J Ridley. 2003. “ROCKs: Multifunctional Kinases in Cell Behaviour.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (June): 446.
<https://doi.org/10.1038/nrm1128>.
- Rigel, Darrell S, and John A Carucci. 2008. “Malignant Melanoma: Prevention, Early Detection, and Treatment in the 21st Century.” *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 50 (4): 215–36. <https://doi.org/10.3322/canjclin.50.4.215>.
- Rösel, Daniel, Jan Brábek, Ondřej Tolde, Claudia T Mierke, Daniel P Zitterbart, Carina Raupach, Kristýna Bicanová, et al. 2008. “Up-Regulation of Rho/ROCK Signaling in Sarcoma Cells Drives Invasion and Increased Generation of Protrusive Forces.” *Molecular Cancer Research* 6 (9): 1410 LP – 1420.
<http://mcr.aacrjournals.org/content/6/9/1410.abstract>.
- Routhier, Alissa, Michelle Astuccio, Deanna Lahey, Nicholas Monfredo, Alyssa Johnson, William Callahan, Amy Partington, et al. 2010. “Pharmacological Inhibition of Rho-Kinase Signaling with Y-27632 Blocks Melanoma Tumor Growth.” *Oncology Reports* 23 (3): 861–67. https://doi.org/10.3892/or_00000708.
- Saalbach, Anja, Anne Wetzels, Uwe-Frithjof Haustein, Michael Sticherling, Jan C Simon, and Ulf Anderjegg. 2005. “Interaction of Human Thy-1 (CD 90) with the Integrin Avβ3 (CD51/CD61): An Important Mechanism Mediating Melanoma Cell Adhesion to Activated Endothelium.” *Oncogene* 24 (29): 4710–20.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208559>.
- Sadok, Amine, Afshan Mccarthy, John Caldwell, Ian Collins, Michelle D Garrett, Maggie Yeo, Steven Hooper, et al. 2015. “Therapeutics, Targets, and Chemical Biology Rho Kinase Inhibitors Block Melanoma Cell Migration and Inhibit Metastasis.” <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2156>.
- Sahai, Erik, Raquel Garcia-Medina, Jacques Pouyssegur, and Emmanuel Vial. 2007. “Smurf1 Regulates Tumor Cell Plasticity and Motility through Degradation of RhoA

- Leading to Localized Inhibition of Contractility." *The Journal of Cell Biology* 176 (1): 35 LP – 42. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605135>.
- Sahai, Erik, and Christopher J Marshall. 2003. "Differing Modes of Tumour Cell Invasion Have Distinct Requirements for Rho/ROCK Signalling and Extracellular Proteolysis." *Nature Cell Biology* 5 (8): 711–19. <https://doi.org/10.1038/ncb1019>.
- Sanz-Moreno, Victoria, Gilles Gadea, Jessica Ahn, Hugh Paterson, Pierfrancesco Marra, Sophie Pinner, Erik Sahai, and Christopher J Marshall. 2008. "Rac Activation and Inactivation Control Plasticity of Tumor Cell Movement." *Cell* 135 (3): 510–23. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.043>.
- Sanz-Moreno, Victoria, Cedric Gaggioli, Maggie Yeo, Jean Albrengues, Fredrik Wallberg, Amaya Viros, Steven Hooper, et al. 2011. "ROCK and JAK1 Signaling Cooperate to Control Actomyosin Contractility in Tumor Cells and Stroma." *Cancer Cell* 20 (2): 229–45. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.06.018>.
- Sarkar, Debina, Euphemia Y Leung, Bruce C Baguley, Graeme J Finlay, and Marjan E Askarian-Amiri. 2015. "Epigenetic Regulation in Human Melanoma: Past and Future." *Epigenetics* 10 (2): 103–21. <https://doi.org/10.1080/15592294.2014.1003746>.
- Sarrabayrouse, Guillaume, Cindy Synaeve, Kevin Leveque, Gilles Favre, and Anne-Françoise Tilkin-Mariamé. 2007. "Statins Stimulate In Vitro Membrane FasL Expression and Lymphocyte Apoptosis through RhoA/ROCK Pathway in Murine Melanoma Cells 1,2." *Neoplasia* 9: 1078–90. <https://doi.org/10.1593/neo.07727>.
- Satou, Wataru, Toshikazu Suzuki, Takeharu Noguchi, Hideki Ogino, Michihiko Fujii, and Dai Ayusawa. 2004. "AT-Hook Proteins Stimulate Induction of Senescence Markers Triggered by 5-Bromodeoxyuridine in Mammalian Cells." *Experimental Gerontology* 39 (2): 173–79. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.exger.2003.10.008>.
- Schadendorf, Dirk, David Fisher, Claus Garbe, Jeffrey Gershenwald, Jean-Jacques Grob, Alan Halpern, Meenhard Herlyn, et al. 2015. "Melanoma." *NATURE REVIEWS* 1. <https://doi.org/doi:10.1038/nrdp.2015.3>.
- Schefe, Jan H, Kerstin E Lehmann, Ivo R Buschmann, Thomas Unger, and Heiko Funke-Kaiser. 2006. "Quantitative Real-Time RT-PCR Data Analysis: Current Concepts and the Novel 'Gene Expression's CT Difference' Formula." *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)* 84 (11): 901–10. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>.
- Segura, Miguel F, Douglas Hanniford, Silvia Menendez, Linsey Reavie, Xuanyi Zou, Silvia Alvarez-Diaz, Jan Zakrzewski, et al. 2009. "Aberrant MiR-182 Expression Promotes Melanoma Metastasis by Repressing FOXO3 and Microphthalmia-Associated Transcription Factor." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (6): 1814 LP – 1819. <http://www.pnas.org/content/106/6/1814.abstract>.
- Selma Silagi. 1971. "Modification of Malignancy by 5-Bromodeoxyuridine: Studies of Reversibility and Immunological Effects." *Society for In Vitro Biology* 7. <https://sci-hub.se/https://www.jstor.org/stable/4291590>.
- Sen, Shamik, and Sanjay Kumar. 2009. "Cell-Matrix De-Adhesion Dynamics Reflect Contractile Mechanics." *Cellular and Molecular Bioengineering* 2 (2): 218–30. <https://doi.org/10.1007/s12195-009-0057-7>.
- Sheppard, Karen E, and Grant A McArthur. 2013. "The Cell-Cycle Regulator CDK4: An Emerging Therapeutic Target in Melanoma." *Clinical Cancer Research* 19 (19): 5320 LP – 5328. <http://clincancerres.aacrjournals.org/content/19/19/5320.abstract>.
- Shoshan, Einav, Aaron K. Mobley, Russell R. Braeuer, Takafumi Kamiya, Li Huang, Mayra E. Vasquez, Ahmad Salameh, et al. 2015. "Reduced Adenosine-to-Inosine

- MiR-455-5p Editing Promotes Melanoma Growth and Metastasis." *Nature Cell Biology* 17 (3): 311–21. <https://doi.org/10.1038/ncb3110>.
- Silagi, Selma. 1971. "Modification of Malignancy by 5-Bromodeoxyuridine." *In Vitro* 7 (2): 105. <https://doi.org/10.1007/BF02628269>.
- Sin, W C, X Q Chen, T Leung, and L Lim. 1998. "RhoA-Binding Kinase Alpha Translocation Is Facilitated by the Collapse of the Vimentin Intermediate Filament Network." *Molecular and Cellular Biology* 18 (11): 6325–39. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.11.6325>.
- Sommer, Lukas. 2011. "Generation of Melanocytes from Neural Crest Cells." *Pigment Cell and Melanoma Research* 24 (3): 411–21. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2011.00834.x>.
- Spiering, Désirée, and Louis Hodgson. 2011. "Dynamics of the Rho-Family Small GTPases in Actin Regulation and Motility." *Cell Adhesion & Migration* 5 (2): 170–80. <https://doi.org/10.4161/cam.5.2.14403>.
- Srinivasan, Srisathya, Vandhana Ashok, Sagarajit Mohanty, Alakesh Das, Sreya Das, Sushant Kumar, Shamik Sen, and Rahul Purwar. 2017. "Blockade of Rho-Associated Protein Kinase (ROCK) Inhibits the Contractility and Invasion Potential of Cancer Stem like Cells." *Oncotarget; Vol 8, No 13*. <https://www.oncotarget.com/article/15248/>.
- Struikmans, H., D.H. Rutgers, G.H. Jansen, C.A.F. Tulleken, I. van der Tweel, and J.J. Battermann. 1997. "S-Phase Fraction, 5-Bromo-2'-Deoxy-Uridine Labelling Index, Duration of S-Phase, Potential Doubling Time, and DNA Index in Benign and Malignant Brain Tumors." *Radiation Oncology Investigations* 5 (4): 170–79. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1520-6823\(1997\)5:4<170::AID-ROI2>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1520-6823(1997)5:4<170::AID-ROI2>3.0.CO;2-V).
- Sumi, Tomoyuki, Kunio Matsumoto, and Toshikazu Nakamura. 2001. "Specific Activation of LIM Kinase 2 via Phosphorylation of Threonine 505 by ROCK, a Rho-Dependent Protein Kinase." *Journal of Biological Chemistry* 276 (1): 670–76. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007074200>.
- Sun, Yuanyuan, Yan Wang, Hainan Yang, Yan Xu, and Haipeng Yu. 2018. "MiR-455-3p Functions as a Tumor Suppressor in Colorectal Cancer and Inhibits Cell Proliferation by Targeting TPT1." *Int J Clin Exp Pathol*. Vol. 11. www.ijcep.com/.
- Suzuki, Toshikazu, Eriko Michishita, Hideki Ogino, Michihiko Fujii, and Dai Ayusawa. 2002. "Synergistic Induction of the Senescence-Associated Genes by 5-Bromodeoxyuridine and AT-Binding Ligands in HeLa Cells." *Experimental Cell Research* 276 (2): 174–84. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5524>.
- T., Hsu, and C . Somers. 1961. "Effect of 5-Bromodeoxyuridine on Mamalian Chromosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 47 (3): 396–403. <https://doi.org/10.1073/pnas.47.3.396>.
- Tang, Lian, Fan Dai, Yan Liu, Xiaoqiang Yu, Chao Huang, Yuqin Wang, and Wenjuan Yao. 2018. "RhoA/ROCK Signaling Regulates Smooth Muscle Phenotypic Modulation and Vascular Remodeling via the JNK Pathway and Vimentin Cytoskeleton." *Pharmacological Research* 133: 201–12. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.05.011>.
- Taupin, Philippe. 2007. "BrdU Immunohistochemistry for Studying Adult Neurogenesis: Paradigms, Pitfalls, Limitations, and Validation." *Brain Research Reviews* 53 (1): 198–214. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2006.08.002>.
- Terriac, Emmanuel, Giovanna Coceano, Zahra Mavajian, A G Tijmen Hageman, F Andreas Christ, Ilaria Testa, Franziska Lautenschläger, and K B Annica Gad. 2017. "Vimentin Levels and Serine 71 Phosphorylation in the Control of Cell-Matrix

- Adhesions, Migration Speed, and Shape of Transformed Human Fibroblasts." *Cells* . <https://doi.org/10.3390/cells6010002>.
- Totsukawa, G, Y Yamakita, S Yamashiro, D J Hartshorne, Y Sasaki, and F Matsumura. 2000. "Distinct Roles of ROCK (Rho-Kinase) and MLCK in Spatial Regulation of MLC Phosphorylation for Assembly of Stress Fibers and Focal Adhesions in 3T3 Fibroblasts." *The Journal of Cell Biology* 150 (4): 797–806. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953004>.
- Tsao, Hensin, Xue Zhang, Eric Benoit, and Frank G Haluska. 1998. "Identification of PTEN/MMAC1 Alterations in Uncultured Melanomas and Melanoma Cell Lines." *Oncogene* 16 (June): 3397. <http://dx.doi.org/10.1038/sj.onc.1201881>.
- Vigil, Dominico, Tai Young Kim, Ana Plachco, Andrew J Garton, Linda Castaldo, Jonathan A Pachter, Hanqing Dong, et al. 2012. "ROCK1 and ROCK2 Are Required for Non-Small Cell Lung Cancer Anchorage-Independent Growth and Invasion." *Cancer Research* 72 (20): 5338 LP – 5347. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2373>.
- Wang, H F, H Chen, M W Ma, J A Wang, T T Tang, L S Ni, J L Yu, Y Z Li, and B X Bai. 2013. "MiR-573 Regulates Melanoma Progression by Targeting the Melanoma Cell Adhesion Molecule." *Oncol Rep* 30 (1): 520–26. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2451>.
- Wang, Wen, Lan-Juan Zhao, Ye-Xiong Tan, Hao Ren, and Zhong-Tian Qi. 2012. "MiR-138 Induces Cell Cycle Arrest by Targeting Cyclin D3 in Hepatocellular Carcinoma." *Carcinogenesis* 33 (5): 1113–20. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs113>.
- Wang, Yemin, Jen-Wei Huang, Ming Li, Webster K Cavenee, Patrick S Mitchell, Xiaofeng Zhou, Muneesh Tewari, Frank B Furnari, and Toshiyasu Taniguchi. 2011. "MicroRNA-138 Modulates DNA Damage Response by Repressing Histone H2AX Expression." *Molecular Cancer Research : MCR* 9 (8): 1100–1111. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-11-0007>.
- Wojcik, Andrzej, Clemens von Sonntag, and Günter Obe. 2003. "Application of the Biotin-DUTP Chromosome Labelling Technique to Study the Role of 5-Bromo-2'-Deoxyuridine in the Formation of UV-Induced Sister Chromatid Exchanges in CHO Cells." *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 69 (2): 139–44. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(02\)00415-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(02)00415-3).
- Wolf, Katarina, Yi I Wu, Yueying Liu, Jörg Geiger, Eric Tam, Christopher Overall, M Sharon Stack, and Peter Friedl. 2007. "Multi-Step Pericellular Proteolysis Controls the Transition from Individual to Collective Cancer Cell Invasion." *Nature Cell Biology* 9 (8): 893–904. <https://doi.org/10.1038/ncb1616>.
- Wong, Carmen Chak-Lui, Chun-Ming Wong, Edmund Kwok-Kwun Tung, Sandy Leung-Kuen Au, Joyce Man-Fong Lee, Ronnie Tung-Ping Poon, Kwan Man, and Irene Oi-Lin Ng. 2011. "The MicroRNA MiR-139 Suppresses Metastasis and Progression of Hepatocellular Carcinoma by down-Regulating Rho-Kinase 2." *Gastroenterology* 140 (1): 322–31. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.10.006>.
- Wrathall, J R, C Oliver, S Silagi, and E Essner. 1973. "Suppression of Pigmentation in Mouse Melanoma Cells by 5-Bromodeoxyuridine: Effects on Tyrosinase Activity and Melanosome Formation." *The Journal of Cell Biology* 57 (2): 406–23. <https://doi.org/10.1083/jcb.57.2.406>.
- Wu, Heng, Vikas Goel, and Frank G Haluska. 2003. "PTEN Signaling Pathways in Melanoma." *Oncogene* 22 (20): 3113–22. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206451>.
- Wu, Jian, Jibo Liu, Yaqin Ding, Mingying Zhu, Kan Lu, Jing Zhou, Xin Xie, et al. 2018. "MiR-455-3p Suppresses Renal Fibrosis through Repression of ROCK2 Expression

- in Diabetic Nephropathy.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 503 (2): 977–83. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2018.06.105>.
- Xiao, Ling, Hui Zhou, Xiang-Ping Li, Juan Chen, Chao Fang, Chen-Xue Mao, Jia-Jia Cui, et al. 2016. “MicroRNA-138 Acts as a Tumor Suppressor in Non Small Cell Lung Cancer via Targeting YAP1.” *Oncotarget* 7 (26): 40038–46. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9480>.
- Yamaguchi, Hideki, and John Condeelis. 2007. “Regulation of the Actin Cytoskeleton in Cancer Cell Migration and Invasion.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1773 (5): 642–52. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.07.001>.
- Yamaguchi, Hiroto, Miyuki Kasa, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, and Toshio Hakoshima. 2006. “Molecular Mechanism for the Regulation of Rho-Kinase by Dimerization and Its Inhibition by Fasudil.” *Structure* 14 (3): 589–600. <https://doi.org/10.1016/j.str.2005.11.024>.
- Yamaguchi, Hiroto, Yukiko Miwa, Miyuki Kasa, Ken Kitano, Mutsuki Amano, Kozo Kaibuchi, and Toshio Hakoshima. 2006. “Structural Basis for Induced-Fit Binding of Rho-Kinase to the Inhibitor Y-27632.” *The Journal of Biochemistry* 140 (3): 305–11. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj172>.
- Yang, C H, J Yue, S R Pfeffer, C R Handorf, and L M Pfeffer. 2011. “MicroRNA MiR-21 Regulates the Metastatic Behavior of B16 Melanoma Cells.” *J Biol Chem* 286 (45): 39172–78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.285098>.
- Yoneda, Atsuko, Hinke A B Multhaupt, and John R Couchman. 2005. “The Rho Kinases I and II Regulate Different Aspects of Myosin II Activity.” *The Journal of Cell Biology* 170 (3): 443–53. <https://doi.org/10.1083/jcb.200412043>.
- Zhang, H, H Zhang, M Zhao, Z Lv, X Zhang, X Qin, H Wang, et al. 2013. “MiR-138 Inhibits Tumor Growth Through Repression of EZH2 in Non-Small Cell Lung Cancer.” *Cellular Physiology and Biochemistry* 31 (1): 56–65. <https://doi.org/10.1159/000343349>.
- Zhang, Jun, Dan Liu, Zhuo Feng, Jun Mao, Chunying Zhang, Ying Lu, Jiazhi Li, Qingqing Zhang, Qing Li, and Lianhong Li. 2016. “MicroRNA-138 Modulates Metastasis and EMT in Breast Cancer Cells by Targeting Vimentin.” *Biomedicine & Pharmacotherapy* 77: 135–41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biopha.2015.12.018>.
- Zhao, Yongxiang, Mingyu Yan, Ye Yun, Jianguo Zhang, Ruimin Zhang, Yan Li, Xiangming Wu, Qiang Liu, Wei Miao, and Haishan Jiang. 2017. “MicroRNA-455-3p Functions as a Tumor Suppressor by Targeting EIF4E in Prostate Cancer.” *Oncology Reports* 37 (4): 2449–58. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5502>.
- Zheng, Fang, Yi-Ji Liao, Mu-Yan Cai, Tian-Hao Liu, Shu-Peng Chen, Pei-Hong Wu, Long Wu, et al. 2015. “Systemic Delivery of MicroRNA-101 Potently Inhibits Hepatocellular Carcinoma In Vivo by Repressing Multiple Targets.” *PLOS Genetics* 11 (2): e1004873. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004873>.
- Zheng, Fang, Yi-Ji Liao, Mu-Yan Cai, Yan-Hui Liu, Tian-Hao Liu, Shu-Peng Chen, Xiu-Wu Bian, et al. 2012. “The Putative Tumour Suppressor MicroRNA-124 Modulates Hepatocellular Carcinoma Cell Aggressiveness by Repressing ROCK2 and EZH2.” *Gut* 61 (2): 278–89. <https://doi.org/10.1136/gut.2011.239145>.
- Zheng, Hongjun, David Ramnarain, Britta A Anderson, Eric Tycksen, Ryan Nunley, and Audrey McAlinden. 2018. “MicroRNA-138 Inhibits Osteogenic Differentiation and Mineralization of Human Dedifferentiated Chondrocytes by Regulating RhoC and the Actin Cytoskeleton.” *JBMR Plus* 3 (2): e10071–e10071. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10071>.

- Zheng, Yansong, Lianguang Xiang, Mingliu Chen, and Chunhui Xiang. 2018. "MicroRNA- 130a Inhibits the Proliferation, Migration and Invasive Ability of Hepatocellular Carcinoma Cells by Downregulating Rho- kinase 2." *Molecular Medicine Reports* 18 (3): 3077–84. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9283>.
- Zhou, Jin, Li-Qun Zhao, Mo-Miao Xiong, Xiu-Qin Wang, Guan-Rui Yang, Zong-Liang Qiu, Min Wu, and Zhi-Hua Liu. 2003. "Gene Expression Profiles at Different Stages of Human Esophageal Squamous Cell Carcinoma." *World Journal of Gastroenterology* 9 (1): 9–15. <https://doi.org/10.3748/wjg.v9.i1.9>.
- Zhu, N, R Lalla, P Eves, La H Brown, A King, E H Kemp, J W Haycock, and S Macneil. 2004. "Melanoma Cell Migration Is Upregulated by Tumour Necrosis Factor- α and Suppressed by α -Melanocyte-Stimulating Hormone." *British Journal of Cancer* 90: 1457–63. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601698>.
- Zhu, Ziqiang, Jinshan Tang, Jianqiang Wang, Gang Duan, Lei Zhou, and Xiaoqing Zhou. 2016. "MiR-138 Acts as a Tumor Suppressor by Targeting EZH2 and Enhances Cisplatin-Induced Apoptosis in Osteosarcoma Cells." Edited by Aamir Ahmad. *PLOS ONE* 11 (3): e0150026. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0150026>.