

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MÉDICINA

**Expresión de microRNA en orina con
microRNA de tejido prostatico de pacientes
con cancer de prostata y en pacientes con
hiperplasia prostatica benigna en el Hospital
General**

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALIDAD UROLOGIA

PRESENTA:

DR. SAMUEL AHUMADA TAMAYO

ASESOR DE TESIS:

PACHECO GAHLER CARLOS

MORALES MONTOROGUE GUSTAVO



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Secretaría de Salud. Hospital General "Dr. Manuel Gea González".
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN**

1. TITULO.

EXPRESION DE microRNA DE ORINA Y TEJIDO PROSTATICO, EN PACIENTES CON CANCER DE PROSTATA O HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA EN EL HOSPITAL GENERAL "DR MANUEL GEA GONZALEZ".

Tipo de investigación:

Básica__ Farmacológica__ Epidemiológica_X_ Experimental__ Otra__

2. INVESTIGADORES:

División de Urología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

2.1 Investigador Responsable:

Dr. Carlos Pacheco Gahbler.

Jefe de la División de Urología. firma _____

2.2. Investigador Principal.

Dr. Samuel Ahumada Tamayo.

Residente de Cuarto año de Urología. firma _____

2.3. Investigador(es) asociado(s):

Dr. Jorge Gustavo Morales Montor.

Adscrito a la división de Urología. firma _____

Dr. Mauricio Cantellano Orozco.

Adscrito a la división de Urología. firma _____

Dr Carlos Martínez Arroyo

Adscrito a la división de Urología firma _____

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Dr. Rodríguez Dorantes Mauricio.

Investigador Responsable del INMEGEN. firma _____

QFB. Alberto Iván Salido Guadarrama

Investigador invitado del INMEGEN. firma _____

3. SEDE.

División de Urología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González",

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Secretaría de Salud.
Hospital General "Dr. Manuel Gea González".
PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

1. TITULO.

EXPRESION DE microRNA DE ORINA Y TEJIDO PROSTATICO, EN PACIENTES CON CANCER DE PROSTATA O HIPERPLASIA PROSTATICA BENIGNA EN EL HOSPITAL GENERAL "DR MANUEL GEA GONZALEZ".

Tipo de investigación:

Básica__ Farmacológica__ Epidemiológica X Experimental__ Otra__.

2. INVESTIGADORES:

División de Urología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

2.1 Investigador Responsable:

Dr. Carlos Pacheco Gahbler.

Jefe de la División de Urología. firma _____

2.2. Investigador Principal.

Dr. Samuel Ahumada Tamayo.

Residente de Cuarto año de Urología. firma _____

2.3. Investigador(es) asociado(s):

Dr. Jorge Gustavo Morales Montor.

Adscrito a la división de Urología. firma _____

Dr. Mauricio Cantellano Orozco.

Adscrito a la división de Urología. firma _____

Dr Carlos Martínez Arroyo

Adscrito a la división de Urología firma _____

Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

Dr. Rodríguez Dorantes Mauricio.

Investigador Responsable del INMEGEN. firma _____

QFB. Alberto Iván Salido Guadarrama

Investigador invitado del INMEGEN. firma _____

3. SEDE.

División de Urología del Hospital General "Dr. Manuel Gea González",
Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN).

4. ANTECEDENTES.

El cáncer de próstata (CaP) es la malignidad más frecuente en los hombres occidentales y es la segunda causa de muerte. Para la detección temprana de cáncer de próstata se realiza la valoración de antígeno prostático específico (APE) mas el tacto rectal (TR). Sin embargo el valor diagnostico de ambos métodos es limitado por la baja sensibilidad del Tacto rectal y la baja especificidad del antígeno prostático específico. Así que de acuerdo a consensos de estudios europeos y americanos el APE llevará a incremento de diagnostico de cáncer de próstata, con tasas de mortalidad bajas, por lo cual se requiere de biomarcadores para el diagnostico de cáncer de próstata sea garantizado.¹

Actualmente el diagnóstico definitivo de cáncer de próstata se realiza con la determinación histológica mediante el sistema de clasificación de Gleason para el carcinoma de próstata es el método dominante de todo el mundo en la investigación y en la práctica diaria, esta técnica fue desarrollado por el Dr. Donald F. Gleason, patólogo de Minnesota EUA, miembro del Grupo de Administración de Veteranos de Investigación Cooperativa de Urología (GAVICU). Este patólogo de 1960 a 1975, inscribió alrededor de 5.000 pacientes con cáncer de próstata en ensayos clínicos prospectivos aleatorizados. El sistema de clasificación de Gleason se basa enteramente en el patrón histológico de carcinoma, con la disposición de las células con la tinción de hematoxilina y eosina en secciones del tejido prostático este método es una categorización del patrón histológico el cual se ve con una ampliación baja (10-40 X) según el grado de diferenciación glandular y patrón de crecimiento del tumor en el estroma prostático. Con nueve patrones de crecimiento consolidado en cinco grados. Los cinco grados o patrones básicos se utilizan para generar un resultado histológico, que puede variar desde 2 a 10, añadiendo el patrón primario y secundario ejemplo Gleason 2+2=4 hasta Gleason de 5+5=10. El patrón primario es el que es predominante en la zona, por simple inspección visual. El segundo patrón es el segundo patrón más común. Si sólo un grado se observa en la muestra de tejido, éste grado se multiplica por dos para dar la puntuación. Si el segundo grado es inferior al 3% del total del tumor, es ignorado y solo se toma el patrón primario, el resultado del patrón primario se repite y se suma para dar la escala de Gleason. Este patrón de Gleason ha perdurado y en base a este resultado histológico sabemos que el paciente tiene o no cáncer de próstata.⁴

Dentro de los biomarcadores de los cuales se han encontrado están los microRNA son una clase de pequeños RNA endógenamente expresados moléculas de 18 – 25 nucleótidos no codificantes de proteínas, recordando el 30% del genoma humano es regulado por los microRNA; los microRNA controlan funciones celulares importantes como movimientos, diferenciación, proliferación y apoptosis celular. También se sabe que los microRNA tienen actividad oncogénica y tumor supresiva. Los miRNA 15^a y 16-1 tienen función supresora, por la regulación a la baja de BCL2; miRNA let 7a esta subregulado en cáncer de próstata tanto en linea celular como en tejido y tiene potencial oncogénico sobre E2F2 y CCND2.¹

Estudios recientes sobre los micro-arreglos de miRNA muestran que los patrones de expresión de los miRNA distinguen entre muestras de tejido canceroso y benigno, así como diferentes entidades tumorales. De la misma forma se ha estudiado que los miRNA tienen patrones de expresión en cáncer de próstata. Pero las publicaciones actuales aun son inconstantes probablemente resultado de diferentes métodos de normalización (micro-arreglos, reacción de cadena de polimerasa) así como de las diferentes muestras tumorales (cáncer inicia o avanzado). Puede existir miRNA sub-regulados o sub-expresados en cáncer de próstata (ejem miRNA 100, miRNA 221) o miRNA con actividad potencialmente oncogénica (miRNA 32, 26 a, Let7i) los cuales pueden estar sobre-expresados.¹ Es importante mencionar que Porkka en su revisión sobre la expresión de microRNA en cáncer de próstata del 2007 hace una comparación de pacientes con hiperplasia prostática benigna y pacientes con cáncer de próstata, dentro de sus resultados obtiene microRNA que solo se presentan o expresan en cáncer de próstata aquí hacen referencia al microRNA 100.² Mitchell y cols en su publicación de microRNA circulantes como marcadores sanguíneos estables para detección de cáncer del 2008 menciona a los microRNA expresados solamente en cáncer de próstata miR-100, miR125b, miR-141, miR-143, miR-205, miR-296.³ Estos resultados se obtuvieron posterior al análisis de dos grupos un grupo de 25 pacientes con cáncer de próstata y grupo control con 25 pacientes sanos. La expresión de microRNA 100 de este estudio ya comentado apoya los hallazgos de nuestro estudio con nuestros pacientes al expresarse el microRNA 100.³ Referente al microRNA 149 solo hemos visto su expresión en pacientes mexicanos, siendo una variante de expresión solo en nuestro país.

Los microRNA son pequeños RNA no codificantes expresados endógenamente que regulan la expresión de proteínas de genes no codificantes a nivel de translocación. Actúan en la degradación o prevención de la translocación de los RNAm. La primera transcripción de los miRNA (pri-miRNA) esta generado por el RNA polimerasa II. El cual subsecuentemente esta procesado por la enzima RNAasa III. Posteriormente la estructura intermedia (pre-miRNA) y finalmente el RNA maduro. La cadena única de miRNA maduras se unen a la secuencia de las cadenas que están localizadas en la región 3'-prima no trasladada del RNAm. De acuerdo a lo valorado la complementación incorrecta conlleva al mal enlaces del RNAm siendo el principal mecanismo de los miRNA.²

Los miRNA muestran un control fundamental en el proceso celular como en la diferenciación celular y en el tiempo de desarrollo de los organismos. La aberración de los mismos puede involucrar varias enfermedades humanas como el cáncer. La primera evidencia de que los microRNA juegan un papel en el cáncer fue en 2002 gracias a Calin mostro como el miRNA 15 y 16 actua en la delección de gen 13q14 en la Leucemia Linfocítica crónica. A partir de este hallazgo se han encontrado numerosas alteraciones de microRNA en cáncer. Evidencia acumulada comenta sobre la expresión aberrante sobre el cáncer Por lo cual también se sabe que los miRNA pueden actuar como oncogenes (onco miRNA) o como tumores represores. En base a esto estudios han encontrado microRNA presentes en cáncer de próstata.²

-El cáncer de Próstata (CaP) es el segundo tipo de neoplasia maligna más frecuente entre la población masculina. Las cifras más recientes indican que 782,600 nuevos casos fueron diagnosticados durante 2007 y el número de muertes asociadas a CaP durante ese año se estima en 254,000, lo que convierte al CaP en la sexta causa de muerte por cáncer en hombres, a nivel mundial ⁶. La información más reciente indica que entre 2006 y 2007, el segundo tipo de neoplasia maligna que más egresos hospitalarios ocasiono en México, fue el CaP. Más aun, en este mismo periodo, el CaP ocupó el primer lugar en cuanto a mayor número de muertes asociadas a neoplasias malignas ⁷. Actualmente, las principales pruebas diagnosticas son la exploración rectal y la evaluación del antígeno específico prostático (PSA). Sin embargo, aun prevalece la dificultad para diagnosticar el cáncer de próstata en etapas tempranas, debido a que en muchas alteraciones no relacionadas al cáncer de próstata, por ejemplo, la hiperplasia benigna prostática (HPB), se presentan características que guardan gran semejanza con las de las lesiones del cáncer de próstata ⁸. Esto conduce a la necesidad realizar monitoreos continuamente a lo largo de la vida de los pacientes para evaluar el posible desarrollo de CaP. A la fecha, no existen estudios realizados en población mexicana que correlacionen la regulación de genes durante el avance de la enfermedad como una firma molecular que pudiera ser utilizada como un posible marcador para el diagnostico y pronostico temprano de CaP. Con el desarrollo de la tecnología genómica, los esfuerzos se han concentrado en el estudio a nivel molecular de factores que están implicados en la iniciación y progresión del cáncer en humanos.

A pesar de la elevada tasa de morbilidad, a la fecha las causas exactas que llevan al desarrollo de adenocarcinoma prostático no han sido elucidadas. Tradicionalmente, el CaP se ha asociado a factores como la edad avanzada, la etnicidad y la historia familiar. Por otra parte, se tiene conocimiento de muchos factores putativos de riesgo entre los que se encuentran los andrógenos, la dieta, el tabaquismo, el sedentarismo la actividad física, factores sexuales y la obesidad. Aunque cambios en el estilo de vida y prevención de la exposición a contaminantes químicos parecen ayudar a disminuir la incidencia de la enfermedad, su papel en la etiología del CaP no se ha establecido claramente ⁹. La patogénesis del cáncer involucra una interacción entre factores ambientales y genéticos. Más aun, se piensa que los factores genéticos contribuyen en un 42% al riesgo del desarrollo y progreso de la enfermedad¹⁰. Aunado a esto, los estudios más recientes indican que los andrógenos tienen un papel importante en el establecimiento de la enfermedad. Variaciones de genes que participan en la biosíntesis y metabolismo de estos andrógenos han sido asociadas con el desarrollo y progreso del CaP. El CaP cursa por diferentes estadios desde andrógeno dependiente a andrógeno independiente o refractaria a terapia hormonal, siendo esta última fase la más agresiva y de mal pronóstico para el paciente ¹¹.

La identificación de marcadores moleculares asociados al CaP, constituyen un aporte científico que ha mejorado la capacidad para detectar individuos en riesgo de padecer CaP.

El marcador más utilizado actualmente para el diagnóstico de CaP es el antígeno prostático específico (PSA). El PSA es una glicoproteína que se produce en el epitelio de la próstata de manera exclusiva y está presente en pequeñas cantidades en el suero de varones sanos y se acumula con la edad. Los rangos de normalidad, sin embargo, depende de variables poblacionales o raciales¹². A pesar de su alta sensibilidad, la prueba de niveles en suero de PSA carece de especificidad ya que no permite establecer una diferencia confiable entre la HPB, el CaP de tipo agresivo y el no agresivo¹³. A nivel genético, el *PCA3* ha tenido un papel significativo como marcador de diagnóstico no invasivo en orina. El *PCA3* es un mRNA específico de próstata, probablemente no codificante, cuya expresión se encuentra anormalmente elevada en neoplasias prostáticas, en comparación con tejidos adyacentes no-neoplásicos¹⁴. Otro marcador que ha sido reportado como altamente sobre-expresado en tejido de CaP es el gen que codifica para la proteína alfa metil CoA racemasa (*AMACR*)¹⁵.

En un estudio reciente realizado con la finalidad de encontrar genes con elevada expresión en un conjunto de muestras de CaP se identificó a un gen de fusión presente en el 80% de los casos de CaP y ausente en tejido prostático benigno. Esta fusión involucra al gen *EGR*, miembro de la familia de genes *ETS*, que se une a la región 5' no traducida (UTR por sus siglas en inglés) del gen *TMPRSS2*. Este último codifica para una serina proteasa que responde a la señalización por andrógenos¹⁶. A pesar del valor diagnóstico que presentan el mensajero *PCA3*, el gen *AMACR* y el gen de fusión *EGR-TMPRSS2*, no existe a la fecha un marcador histológico o molecular que permita hacer una predicción temprana del CaP con adecuada exactitud, en especial, del fenotipo agresivo del mismo.

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias cortas de RNA no codificantes, de 18 a 22 nucleótidos que se expresan en varios organismos eucariontes¹⁷. Los primeros estudios revelaron que la expresión de los miRNAs *let-7* y *lin-4* influye en el desarrollo y ciclo celular de *Caenorhabditis elegans*¹⁸ y que la pérdida de su función altera su desarrollo normal. Estudios subsiguientes describen patrones de expresión de miRNAs que son específicos de una etapa del desarrollo o de un tipo de tejido en especial en vertebrados¹⁹. Estos hallazgos sugieren que los miRNAs desempeñan un papel en el control de la expresión génica en eucariontes, al menos tan importante como el de los factores de transcripción.

Los miRNAs se procesan a partir de un precursor primario (pri-miRNA) que puede estar contenido en diferentes regiones génicas; intrónica, exónica, o en una región no traducida (UTR). La RNA polimerasa II se encarga de la transcripción del pri-miRNA, el cual, al igual que un mRNA, se encuentra poliadenilado y tienen CAP en el extremo 5'²⁰. Cada pri-miRNA puede contener uno o más miRNAs, cada uno dentro de una secuencia de 60 a 80 nucleótidos que se encuentra plegada sobre sí misma para formar una estructura en forma de horquilla, la cual es referida como pre-miRNA. Sin embargo, la mayoría de los pri-miRNAs están organizados en grupos o "clusters" dentro de una misma región cromosómica y presentan patrones de expresión similares, lo que sugiere que su transcripción se realiza en forma de policistrones que están regulados bajo un mismo promotor²¹. A continuación, las horquillas de pre-miRNAs son reconocidas y escindidas dentro del núcleo celular por la acción de un complejo microprocesador que incluye a la enzima Drosha y su elemento asociado DGCR8. Una vez escindido, el pre-miRNA

en forma de horquilla, contiene un segmento de dos nucleótidos en el extremo 3' que es característico del corte producido por drosha. Este rasgo permite al factor nuclear de exportación, conocido como exportina 5, reconocer al pre-miRNA y transportarlo al citoplasma en una manera dependiente de RAN guanosina trifosfato²². Una vez en el citoplasma, otro complejo que incluye a la RNasa tipo III, Dicer, y a la proteína trans-activadora de unión a RNA (TRBP), realiza un segundo corte sobre el pre-miRNA para generar una molécula de RNA de doble cadena de 18 a 24 nucleótidos de longitud, que contiene dos potenciales miRNAs maduros. Este dúplex de RNA se asocia a un complejo proteínico denominado complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Una de las dos cadenas de RNA es seleccionada por el RISC para actuar como cadena guía, esta cadena constituye el miRNA maduro. La cadena restante, también denominada cadena "pasajero" es degradada por la acción de la proteína del complejo RISC, Argonauta 2 (Ago 2). Se piensa que el RISC selecciona la cadena con menor estabilidad termodinámica de apareamiento como la cadena guía, al mismo tiempo que degrada a la cadena pasajero, más estable. Sin embargo, Ro y colaboradores muestran evidencia de que ambas cadenas del dúplex de RNA son susceptibles de ser incorporadas al RISC y co-existir en ciertos tejidos, para actuar sobre diferentes poblaciones de mRNAs²³.

El crecimiento celular durante el desarrollo animal depende de señales moleculares que coordinan cuidadosamente los procesos de proliferación y de muerte celular, y la velocidad a la cual estos se llevan a cabo. Sin embargo, el cáncer se caracteriza por un crecimiento celular en el cual la identidad de las células se ha perdido, existe proliferación extensa y alteración del proceso de muerte celular. Interesantemente, las primeras pistas de la asociación entre los miRNAs y la presencia de un fenotipo cancerígeno en humanos provinieron de los estudios mencionados en *C. elegans*. La demostración de que la pérdida funcionalidad de *lin-4* resulta en anormalidades en la diferenciación de linajes celulares específicos del nematodo³¹, condujo a establecer una analogía con los procesos de formación de tumores en los que existe una falla en la ejecución del programa de diferenciación celular. Posteriormente, estudios realizados en *Drosophila* mostraron que el miRNA *bantam* estimula la proliferación celular y, al mismo tiempo, previene la apoptosis²⁴; lo que sugiere que los homólogos putativos de *bantam* en vertebrados podrían actuar como oncogenes.

El vínculo más directo entre la función de miRNAs y el cáncer en humanos fue quizá demostrado en el estudio realizado por Calin y colaboradores en 2002. En dicho estudio se observó que miR-15a y miR-16-1 se encuentran codificados en la región cromosómica 13q14, que frecuentemente se encuentra deletada en pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL). Por consiguiente, *miR-15a* y *miR-16-1* se encuentran ausentes o sub-expresados en tejidos de pacientes con B-CLL²⁰. Más aun, posteriormente se reportó que ambos miRNAs tenían como blanco de acción la región 3'UTR del transcrito del gen *BCL2*, el cual resulta ser un potente inhibidor de la apoptosis (Cimmino et al., 2005). Lo anterior sugiere contundentemente una actividad supresora de tumores para estos dos miRNAs.

Posteriormente, se demostró la expresión de una firma molecular específica de 13 miRNAs, que incluye a *miR-15a* y *miR-16-1*, asociada a la aparición y progreso de la B-CLL²⁰.

Más de la mitad de los miRNAs se encuentran localizados en regiones del genoma humano susceptibles de sufrir amplificaciones, deleciones o rearrreglos en tumores malignos, lo que refuerza las hipótesis acerca del importante papel de los miRNAs en la patogénesis del cáncer²⁰. Por otra parte, estudios subsecuentes han mostrado que los perfiles de expresión de los miRNAs proporcionan información importante acerca del estado de diferenciación y el linaje celular en diferentes tipos de tumores. Estos perfiles de expresión de miRNAs, también permiten la clasificación del tejido de origen de tumores pobremente diferenciados con mayor exactitud de la que permite el análisis de expresión de mRNAs de las mismas muestras³². Con base en esta información, podría decirse que la historia del desarrollo de un tumor está reflejada en su patrón de expresión de miRNAs particular. En el estudio mencionado, también se muestra que más de la mitad de los miRNAs examinados se encuentran expresados a un nivel inferior en tumores, en comparación con tejidos sanos del mismo tipo e independientemente del tipo celular, lo que refleja el papel de los miRNAs en la diferenciación celular terminal y que la diferenciación incompleta en células cancerosas está fuertemente asociada a su disminuida expresión.

La progresión del CaP es un proceso que implica múltiples alteraciones moleculares, muchas de las cuales se reflejan en cambios de la expresión genética de las células. Debido al papel regulatorio de los miRNA en la expresión de diversos genes y a su especificidad tisular, es evidente que la identificación de miRNAs relacionados al CaP podría aportar valiosa información sobre las alteraciones moleculares asociadas a la patogénesis del CaP. Recientemente, se han reportado diversos estudios de la expresión de miRNAs en muestras clínicas de CaP. Un trabajo sobre el perfil de expresión de 228 miRNAs en 56 muestras de CaP y 7 de tejido prostático normal, se logró identificar la expresión diferencial significativa de 42 miRNAs. De los miRNAs identificados, 39 (87%) se encontraban sobre-expresados y 6 (13%) estaban sub-expresados, en las muestras de CaP⁴¹. Alternativamente, en otro estudio, analizaron el perfil de expresión para 319 miRNAs en 9 muestras de CaP y 4 de HPB y lograron detectar 50 miRNAs expresados diferencialmente. De estos, 36 (72%) mostraron estar sub-expresado en muestras de CaP, mientras que 14 (28%) se encontraban sobre-expresadas en las mismas muestras². Entre estos dos estudios existen discrepancias que pueden ser atribuibles en gran medida a las diferentes metodologías aplicadas, lo que indica que el análisis del perfil de expresión de miRNAs en muestras clínicas de CaP no es un asunto trivial. Reportes más recientes, han mostrado que la expresión de miRNAs se encuentra regulada a la baja de manera significativa en tejidos de CaP con respecto a tejido protático benigno datos que coinciden con los reportados en el trabajo de Porkka et al. de 2007. Interesantemente, dicho trabajo mostró que es posible separar a las muestras de HPB de las de CaP, con base en su perfil de expresión de miRNAs particular. Más aun, las muestras de carcinomas fueron clasificadas de acuerdo a su dependencia androgénica.

Teniendo cuatro de los cinco carcinomas sin tratamiento hormonal agrupados en un subgrupo; mientras que los cuatro refractarios a terapia hormonal, se localizaron dentro un subgrupo propio. Esto muestra que la expresión de los miRNAs en un tejido tumoral pueden proporcionar información valiosa que permita su clasificación y que puede ser aprovechada en el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico de tipos de cáncer que actualmente carecen de marcadores moleculares exactos, como en el caso del CaP.

5. MARCO DE REFERENCIA.

1.- Mahn y Cols. Realizó un análisis de los microRNA obtenidos en suero y de tejido prostático de pacientes con cáncer de próstata y con hiperplasia prostática benigna. Incluyó 37 pacientes con cáncer de próstata que se realizó prostatectomía radical, 18 pacientes con hiperplasia prostática benigna que se les realizó resección transuretral de próstata, 8 pacientes con cáncer de próstata metastásico, 20 hombres sanos. Encontraron 4 microRNA oncogénicos (miR-26a, miR-32, miR-195, miR-let7i) los cuales se presentaron en pacientes con cáncer de próstata tanto a nivel sérico como en tejido prostático. Estos microRNA fueron negativos en pacientes con hiperplasia prostática benigna.

2.- Mitchell y col. Realizó en su estudio un análisis de pacientes, 25 pacientes con cáncer de próstata y 25 pacientes sanos éstos los casos controles. Se obtuvo y analizó muestras de sangres de ambos grupos y se analizó muestras de tejido de pacientes con cáncer de próstata y de pacientes sanos. De estos dos grupos se obtuvo una muestra de 6 miRNA expresados solo en pacientes con cáncer de próstata miR-100, miR-125b, miR-141, miR-143, miR-205, miR-296. De los miRNA previos solo un miRNA miR-141 se sobreexpresó de una manera muy significativa en los pacientes con cáncer de próstata más no en los pacientes sanos.

3.- Yamada y cols. en su estudio realizó una análisis y determinación de microRNA en tejido urotelial y en orina para la detección de microRNA relacionados con carcinoma Urotelial. Su muestreo 100 pacientes con carcinoma urotelial y 74 pacientes sanos, ambos grupos se valoró a nivel urinario y a nivel de tejido urotelial. De este análisis solo se sobre expreso miR-96 and miR-183 en los pacientes con carcinoma Urotelial tanto a nivel de tejido como en muestra urinaria, no sobre-expresándose en pacientes sanos.

4.- Ambs y cols. en su estudio analizó la expresión de microRNA en dos grupos uno con cáncer de próstata y el otro grupo tejido prostático sin cáncer, del primer grupo fueron 60 pacientes y del segundo 16 pacientes, como resultado y conclusión de este estudio se obtuvo sobre expresión de microRNA los cuales solo se sobre expresaron en cáncer de próstata no así en tejido prostático normal entre los microRNA sobre expresados miR-32, miR-182, miR-31, miR-26a, miR-200c, miR-196a, miR-106b-25 mir-25, mir-93, and mir-106b.

5.- Schaefer y cols realizó en su estudio la valoración de pacientes 76 pacientes con cáncer de próstata y 79 pacientes con tejido prostático sano. Determinó microRNA sobre-expresados (miR-96, miR-182, miR-183, miR-375) solamente en pacientes con cáncer de próstata.

Mahn y Cols. 2011	37 Cáncer de próstata 18 Hiperplasia prostática 8 Cáncer de próstata metastásico. 20 pacientes sanos	Se encontraron 4 microRNA oncogénicos : miR-26a, miR-32, miR-195, miR-let7i
Mitchell y cols. 2008	25 pacientes cáncer de próstata 25 pacientes con hiperplasia prostática	Se encontraron 6 microRNA oncogénicos : miR-100, miR-125b, miR-141, miR-143, miR-205, miR-296

Yamada y cols. 2010	100 cáncer Urotelial 74 pacientes sanos	Se encontró microRNA oncogénicos sobre expresados miR-96 and miR-183
Ambs y cols. 2008	60 cáncer de próstata 16 hiperplasia prostática.	microRNA oncogénicos sobre expresados: miR-32, miR-182, miR-31, miR-26a, miR-200c, miR-196a, miR-106b-25 mir-25, mir-93, and mir-106b.
Schaefe y cols. 2009	76 cáncer de próstata 79 hiperplasia prostática	microRNA oncogénicos : miR-96, miR-182, miR-183, miR- 375.

6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

¿Cuál es la expresión de microRNA en orina y en tejido prostático en pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata o con hiperplasia prostática benigna?

7. JUSTIFICACIÓN.

La detección de cáncer de próstata en Estados Unidos ha aumentado en las últimas dos décadas debido a que anualmente se realizan aproximadamente 1 millón de biopsias. A pesar de esto, durante el 2007 se registraron 28.000 muertes por esta enfermedad. En México es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres, con una tasa de 17.9 por 100 000 habitantes. Sabemos que la especificidad del APE y el tacto rectal (TR) va del 24% al 37%. Más del 75% de los hombres con valores de APE en el rango de 2.5-10-ng/ml y/o con TR sospechoso tiene una primera biopsia negativa. Por lo que el valor predictivo positivo de la biopsia es muy bajo; de persistir la sospecha de CaP se recomienda una biopsia de repetición. Sin embargo, esta nueva muestra resultará nuevamente negativa a cáncer en aproximadamente el 80% de estas, aunado al costo económico, la ansiedad, malestar del procedimiento y las complicaciones asociadas a la misma.

El uso del APE para el diagnóstico de CaP de forma aislada o en sus combinaciones: la correlación del APE con el volumen de la próstata, el tiempo de duplicación, la densidad del APE y algunos modelos estadísticos, han permitido mejorar la especificidad, pero aún así no resuelven este problema. El valor predictivo positivo del APE en “zona gris” (2.5 – 10ng/dl) es menor al 25%. La fracción libre del APE (% fl APE) solo ha proporcionado un incremento del 20% en la especificidad.

Los hombres con niveles séricos elevados de APE y los resultados de la biopsia de próstata negativa presentan un dilema ante la carencia de un estudio diagnóstico exacto. Por la necesidad de pruebas para aumentar la probabilidad de la detección de CaP y reducir el número de biopsias de repetición innecesarias se han estudiado numerosos marcadores tumorales.

Es por ello, que la identificación potencial de microRNA como elementos constitutivos de la firma molecular de HPB y CaP, un fluido como la orina mas el estudio del tejido prostático, representa una posible herramienta que contribuya al desarrollo de nuevas estrategias de diagnostico oportuno y acertado de la enfermedad prostática.

8. OBJETIVO.

Describir la expresión de los microRNA en orina y en tejido prostático en pacientes con cáncer de próstata o hiperplasia prostática.

9. HIPÓTESIS.

No se requiere de hipótesis por ser un estudio descriptivo.

10. DISEÑO.

10. 1. Número de muestras a estudiar

a) **Descriptivo**

10.2. Conocimiento que tienen los investigadores de los factores del estudio.

a) **Abierto**

10.3. Participación del investigador.

a) **Observacional.**

10.4. Tiempo en que suceden los eventos.

b) **Prospectivo.**

10.5. Relación que guardan entre sí los datos.

a) **Transversal.**

11. MATERIALES Y MÉTODO.

11.1. Universo de estudio

Todos los pacientes que acudan al servicio de Urología, del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”.

11.2. **Muestra:** 30 pacientes aproximadamente. (a)

Estos pacientes deben tener un APE sérico mayor a 4ng/dl y/o tacto rectal con sospecha clínica de cáncer de próstata programados para biopsia prostática, muestra de orina y tejido prostático.

La muestra de 30 pacientes se determina en base a la disponibilidad del reactivo para realizar el análisis de los microRNA de orina y de tejido prostático. El cual está calculado para 30 pacientes.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio:

Secuencial

11.3. Criterios de selección:

11.3.1. Criterios de Inclusión.

Pacientes del sexo masculino, mayores de 40 años de edad con antígeno prostático mayor a 4ng/dl y/o tacto rectal sospechoso que cuenten con biopsia de próstata o muestra de tejido prostático, pacientes que acepten participar en el estudio que acuden al servicio de urología del Hospital “Dr. Manuel Gea González”.

La población de estudio consistirán de hombres con diagnóstico clínico de CaP, con grado Gleason promedio de 7 (intervalo: 6 a 8) y hombres con diagnóstico clínico de HPB.

11.3.2. Criterios de exclusión.

Pacientes con presencia de Urolitiasis, infección urinaria, obstrucción del tracto urinario inferior, catéter transuretral permanente e imposibilidad de lograr una emisión espontánea de orina.

11.3.3 Criterios de eliminación.

Pacientes con muestras de orina insuficientes o inadecuadas para la amplificiación del MicroRNA.

11.4. Definición de variables:

Tacto rectal:

-Negativo o normal: próstata con consistencia aulada, no fija, no aumentada de consistencia.

-Positiva o anormal: Próstata indurada, con nodulaciones. Fija.

MicroRNA:

En orina y en Tejido prostático, tipo 100 y 149.

Variable	Tipo de variable	Indicador
Tacto Rectal	Nominal	Negativo Positivo.
microRNA. En Orina En tejido Prostático	Nominal microRNA 100 microRNA 149	Positivo Negativo.
EDAD	Cuantitativo	Años
Diagnóstico por biopsia.	Nominal	Hiperplasia prostática Cáncer de próstata.

11.5. Descripción de procedimientos.

Pacientes masculinos con APE >4ng/dl y o TR con sospecha de cáncer de próstata sometidos a biopsia de prostata.



Tacto rectal con masaje prostático y obtención de 20 a 30cc de orina, toma de tejido prostático.



Amplificación de MicroRNA.

Micro RNA positivo

MicroRNA Negativo.

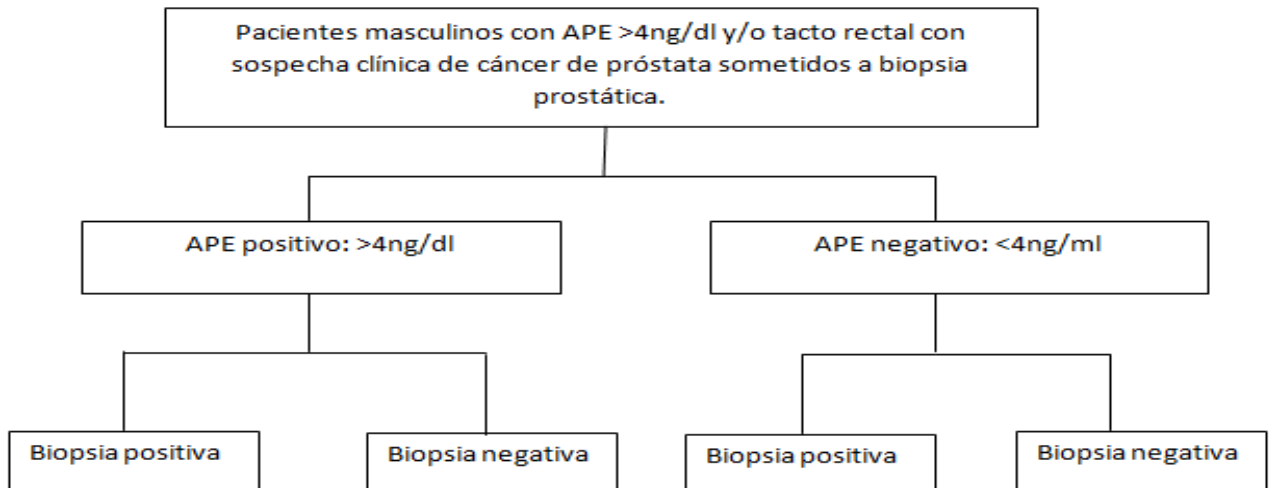


Orina

tejido

orina

tejido

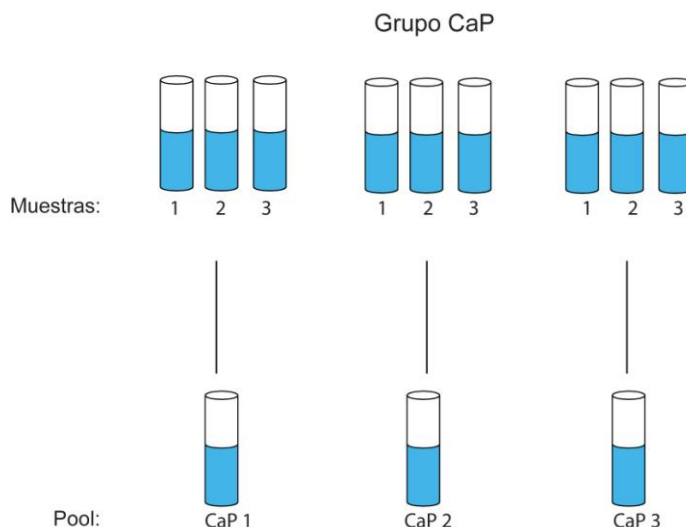


Colecta y procesamiento de muestras:

Las muestras de orina se obtendrán de pacientes que acuden al servicio de urología del Hospital General Manuel Gea González; Ciudad de México, México. Todos los participantes serán informados y proporcionarán su consentimiento por escrito para la realización de este estudio, su muestra solo será utilizada y procesada para este estudio, la muestra de orina será aportada de manera gratuita y la biopsia de próstata que se realice será costada por el paciente. **La población de estudio consistirán de hombres con diagnóstico clínico de CaP, con grado Gleason promedio de 7 (intervalo: 6 a 8) y hombres con diagnóstico clínico de HPB.** Obtención de muestras de orina de pacientes con HPB y de CaP así como tejido de pacientes con HPB y de CaP. Todos los pacientes serán de origen mexicano. La colecta de muestras se realizarán de la siguiente manera: Treinta mL de orina se colectarán después de la aplicación de masaje prostático rectal (DRE) realizado por un médico urólogo, Las muestras de orina se mezclaran con 5 mL de una solución amortiguadora (RNAlater® RNA Stabilization Reagent, AMBION, Austin TX, USA) para estabilización del RNA y se mantendrán en refrigeración a -70°C hasta la extracción del mismo. La obtención del tejido prostático se realizará por RTUP de pacientes con HPB y por tejido prostático con CaP de los pacientes sometidos a Prostatectomía radical. Importante mencionar que el tejido prostático tomado no se realizara corte en espejo en parafina.

Grupos del diseño experimental.

Las muestras se clasificaran en dos grupos: CaP e HPB. Con la finalidad de optimizar los ensayos de cuantificación por PCR en tiempo real, en cada grupo se conformaran 3 bloques o “pools” constituidos 3 muestras cada uno, para un total de 9 muestras por grupo. La cantidad de RNA en cada bloque se mantendrán aproximadamente constante (70 a 75 nanogramos) en un volumen final de 3 microlitros y se llevo a cabo el análisis de cuantificación, por triplicado.



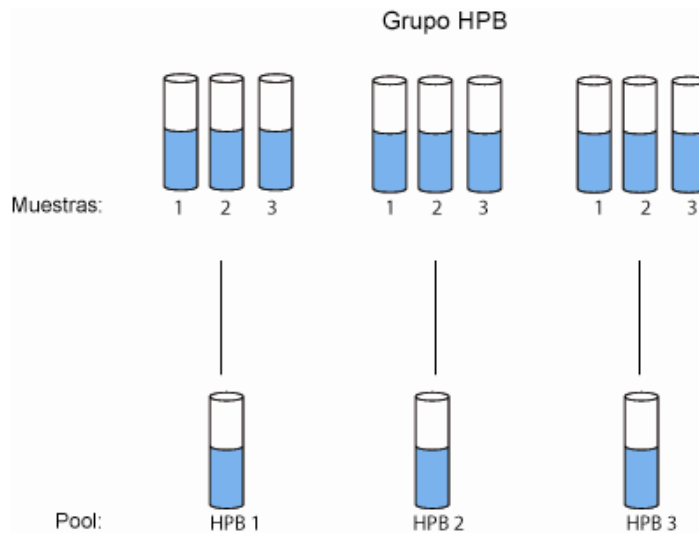


Figura 3. Formación de grupos y bloques para análisis de muestras. Combinación aleatoria en bloques o pools de 3 muestras para cada grupo, CaP e HPB. Cada pool fue analizado por triplicado.

Estudio de la expresión de miRNAs en muestras de orina de pacientes con CaP y HPB.

Extracción de RNA total y microRNAs de diferentes muestras de orina.

Cada muestra se centrifugará a 3,000rpm durante 15 minutos a 15°C y se decantará el sobrenadante para obtener una pastilla que contiene el paquete celular. La pastilla se lavará, agregando 10mL de PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos) a pH= 7.4; se centrifugará a 3,000rpm durante 10 minutos a 15°C y se decantará el sobrenadante.

A continuación se prosiguió con el protocolo del kit comercial (RNeasy® Mini Kit, Qiagen Inc., Valencia CA, USA). El protocolo considera que el RNA se aísla y purifica gracias a las condiciones que permiten su unión selectiva a una membrana de sílica. Primero, se disolvió la pastilla en 400µL de Buffer RLT para favorecer la lisis celular y se agitó en vortex para homogenizar la muestra. Con la finalidad de incrementar la selectividad de la unión del RNA con la matriz de sílice, se añadieron 400µL de Etanol al 70%. Posteriormente, se vertieron 400uL de la muestra en una columna, donde el RNA se une a la membrana, colocada previamente sobre un tubo de recolección de 2mL; se centrifugó a 10,000rpm durante 15 segundos y se descartó el sobrenadante. Este paso se repitió hasta eluir el volumen total de muestra por la columna. Posteriormente, se añadió un volumen de 700µL de Buffer RW1 para lavar la columna, se centrifugó a 10,000rpm durante 15 segundos y se descartó el tubo con el sobrenadante. Se transfirió la columna a un nuevo tubo de recolección de 2mL. Se realizó un lavado

con 500µL de Buffer RPE, se centrifugó a 10,000rpm durante 15 segundos y se decantó el sobrenadante. Nuevamente, se agregaron 500µl de Buffer RPE y se centrifugó a 10,000rpm durante 2 minutos. Se decantó el sobrenadante y se centrifugó a 10,000rpm durante 30 segundos. La columna se transfirió a un tubo de 1.5ml con tapa y se agregaron 10µl de agua libre de RNAsas en el centro de la columna sin tocar la membrana, para eluir el RNA. Se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10,000rpm durante 1 minuto. Una vez colectada la elusión, la concentración de RNA se determinó por medición espectrofotométrica a 260 nm, empleando el equipo NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA USA). Para evaluar la calidad de la extracción se utilizó la proporción de absorbancias 260nm/280nm.

Transcripción reversa (RT) de microRNAs.

La reacción de RT se realizará haciendo uso del kit comercial, TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription kit, (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA). La técnica de RT para fragmentos de RNA mayores a 200 pb, permite su transcripción a cDNA, mediante el uso de cebadores lineales. La diferencia fundamental, en este caso, es el uso de cebadores con diseño de tallo y asa que se unen al extremo 3' del miRNA durante la reacción de RT (Figura 4), lo que incrementa la especificidad y la capacidad de discriminar entre secuencias de miRNAs maduros muy similares. En segundo lugar, la estructura de doble cadena de la porción de tallo previene que los cebadores formen un apareamiento con precursores de miRNAs. Finalmente, La base que proporciona la porción de asa aumenta la estabilidad del heteroduplex de miRNA y DNA, lo que mejora la eficiencia de la reacción de RT.

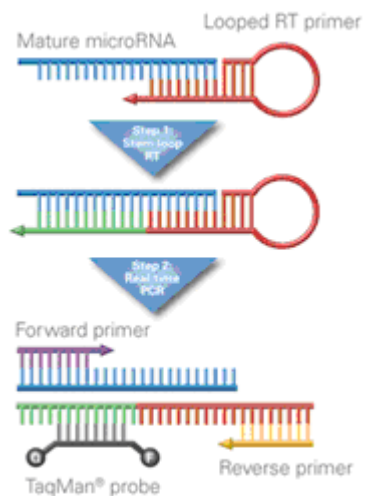


Figura 4. Principio químico de la reacción de RT y de cuantificación por PCR en tiempo real

La reacción de RT se realizó a partir de 75 ng de RNA total aislado. Se utilizaron 0.8 µL de los cebadores RT primers Megaplex™ (10x), 0.2 µL de dNTPs con dTTP

(100mM), 1.5 μ L de la Transcriptasa reversa Multiscribe (50 U/ μ L), 0.8 μ L de solución amortiguadora para RT (10x), 0.8 μ L de $MgCl_2$ (25mM), 0.1 μ L de Inhibidor de RNAsa (20U/ μ L) y 0.2 μ L de H_2O libre de nucleasas, todos ellos reactivos del kit mencionado. La reacción, en un volumen final de 7.5, se incubó en el equipo termociclador GeneAmp® PCR System 9700 (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) bajo las siguientes condiciones: 16 °C por 2 min (alineamiento de los cebadores); seguido de 40 ciclos a 42 °C por 1 min y 50°C por 1 seg (transcripción reversa); e inactivación de la reacción a 85°C por 5 min.

Pre-amplificación de microRNAs.

En la reacción de pre-amplificación, el cDNA producto de la reacción de RT es empleado como molde para la generación de una segunda hebra de cDNA mediante la acción de una DNA polimerasa y de esta manera mejorar la capacidad de detectar pequeñas cantidades de miRNAs durante la cuantificación por PCR en tiempo real. Para la reacción se empleó el kit comercial TaqMan® PreAmp Master Mix Kit (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) En un tubo de microcentrífuga se mezclaron 12.50 uL del concentrado MastermiX TaqMan (2x), 2.50 uL de cebadores Megaplex™ PreAmp Primers (10x), 2.50 uL del producto de la RT y 7.50 uL de H_2O libre de nucleasas; para obtener un volumen final de 25 uL. La reacción se preparó por triplicado y se incubo en el mismo equipo empleado para la reacción de RT, bajo las siguientes condiciones de termociclado: 95°C por 10 min, 55 °C por 2 min y 72 °C por 2 min (activación de la enzima DNA polimerasa), seguidos por 12 ciclos de 95 °C por 15 min (desnaturalización) y 60 °C por 4 min (alineamiento y extensión), finalizando con 99.9 °C por 1 seg para inactivar la reacción.

Cuantificación relativa de microRNAs por PCR en tiempo real.

El principio del ensayo comercial empleado para la detección y cuantificación de miRNAs por PCR en tiempo real (TaqMan™ MicroRNA Assays, Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA), se basa en el sistema TaqMan™, en el que se emplean sondas que incorporan en su extremo 5´ un fluoróforo reportero y en el extremo 3´, un adaptador que favorece la especificidad de la unión con el templado.

El ensayo de cuantificación de microRNAs por PCR en tiempo real se llevó a cabo utilizando la plataforma de arreglos de baja densidad TaqMan® Human MicroRNA Cards v2.0 (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA). La plataforma contiene sondas con diseño TaqMan™ para la identificación de 373 miRNAs específicos de humano, previamente validadas en cuanto a la falta de reactividad cruzada entre diferentes miRNAs. También incluye sondas para la detección de tres RNA nucleolares pequeños (*MammU6*, *RNU44* y *RNU48*), utilizados como controles endógenos positivos para la cuantificación y comparación de los resultados entre diferentes muestras; más 5 sondas para miRNAs de planta y ratón, utilizados como controles negativos (*ath-miR159a*, *mmu-miR-672*, *mmu-miR-674*, *mmu-miR-871* y *mmu-miR-872*) (figura 4). La reacción se preparó utilizando 450 uL de concentrado Master mix universal de PCR TaqMan, 9 uL del Producto de la pre-amplificación y 441 uL de H_2O libre de nucleasas, para obtener un volumen final de 900 uL.

Par cada ensayo, la mezcla de reacción se cargó en una placa de arreglos. Se centrifugó a 331g durante un minuto. La amplificación por PCR y detección en tiempo real se realizó en el equipo ABI 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) bajo las siguientes condiciones de termociclado: 50°C por 2 min y 95°C por 15 seg (activación), seguidos por 40 ciclos de 95 °C por 1 min (desnaturalización) y 60 °C por 2 min (alineamiento y extensión). Las lecturas realizadas por el equipo son corregidas con respecto a una línea base de la señal (p. ej. eliminación del ruido de fondo) y transformadas a valores de Ct. Para identificar miRNAs con diferencia de expresión, se realizó una cuantificación relativa de microRNAs mediante análisis comparativo de los valores de CT entre las muestras con HPB y CaP ó método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Apendice A), utilizando el software Data assist DataAssist™ (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) y el código Bioconductor del entorno de programación R. Dicho método permite normalizar la fluorescencia detectada durante el proceso de amplificación, respecto a un control endógeno y reportar la cantidad de miRNAs en la muestra problema con respecto a un estándar; en este caso, CaP e HPB, respectivamente. Para determinar cambios estadísticamente significativos se aplicó una prueba t de student.

Es importante señalar que después de correr el análisis de microRNA en orina y en tejido prostático tanto en pacientes con cáncer de próstata como con hiperplasia prostática al final solo se expresaron los dos microRNA mencionados el 100 y el 149.

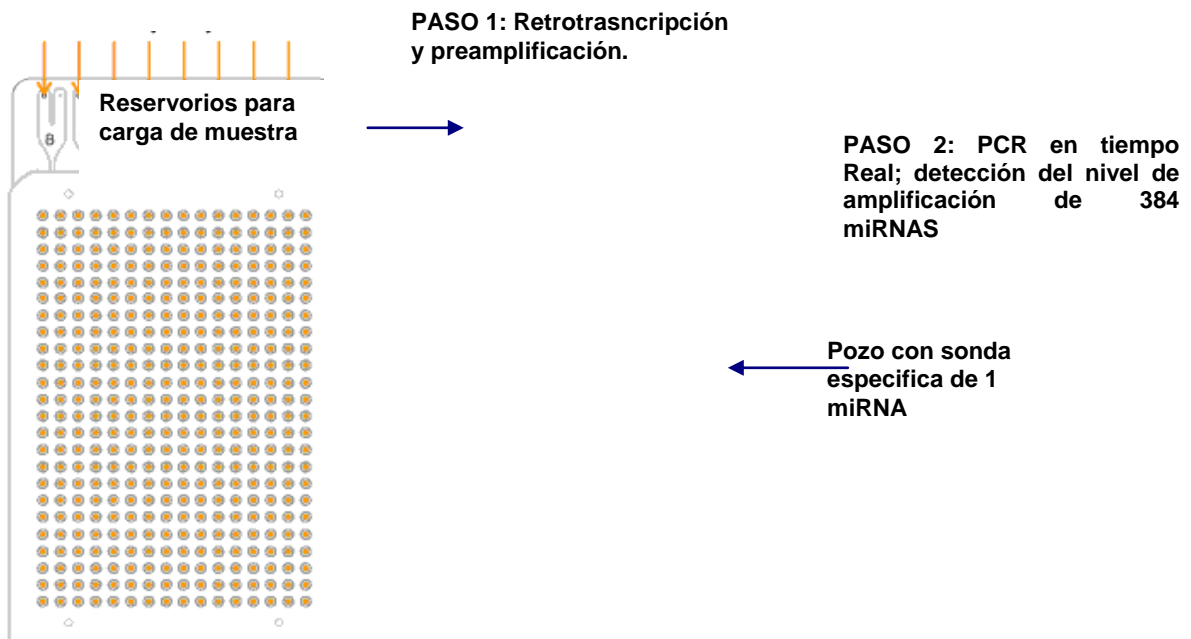


Figura 4. Esquema del arreglo TLDA para análisis de miRNAs en tiempo real. El arreglo contiene 384 pozos con sondas fluorescentes específicas para medir simultáneamente el nivel de expresión de 373 miRNAs, los RNA nucleolares: *MammU6*, *RNU44* y *RNU48* (controles endógenos positivos) y para los miRNAs: *ath-miR159a*, *mmu-miR-672*, *mmu-miR-674*, *mmu-miR-871* y *mmu-miR-872* (controles negativos) de estos 373 miRNA al analizar las muestras de orina y de tejido solo marcaron para un grupo de 2 microRNA 100 y 149.

11.6. Hoja de captura de datos:

Ver hoja de captura de datos

11.7. Calendario.

- 1.- Revisión bibliográfica 2 mes.
- 2.- Elaboración del protocolo: 3 mes.
- 3.- Obtención de la información. 5 meses.
- 4.- Procesamiento y análisis de los datos. 2 mes.
- 5.- Elaboración del informe técnico final. 1 mes.
- 6.- Divulgación de los resultados. 1 mes.

11.8. Recursos.

1 1.8. 1. Recursos Humanos.

Investigador principal: Dr. Samuel Ahumada Tamayo.

Actividad: Revisión bibliográfica, elaboración del protocolo, obtención de la información, recolección de datos, tomas de muestras orina y tejido, procesamiento y análisis de los datos, análisis de resultados, Divulgación de los resultados.

Número de horas por semana 10 horas.

Investigador responsable: Dr. Carlos Pacheco Gahbler.

Actividad: Asesoramiento, supervisión y análisis de los resultados obtenidos

Número de horas por semana 4 horas.

Investigador asociado: QFB. Alberto Ivan Salido Guadarrama

Actividad: Revisión bibliográfica, procesamiento y análisis de las muestras de orina y tejido prostático amplificación de microRNA en el INMEGEN. Número de horas por semana 7 horas.

Investigador asociado : Dr. Jorge Gustavo Morales Montor
Actividad: Supervisión, análisis de datos y resultados
Número de horas por semana 4 horas.

11.8.2. Recursos materiales.

Los recursos que se requiere adquirir son:

1 caja de guantes: 40 pesos.

1 tubo de gel: 30 pesos.

60 tubos de transporte: 500 pesos

Kit para la amplificación: 10 000 pesos.

11.8.3. Recursos financieros.

La obtención de los tubos de transporte y los insumos para la realización de la amplificación de MicroRNA serán aportados por el **INMEGEN**. Los pacientes con las muestras de orina y de tejido tanto de pacientes con cáncer de próstata como con hiperplasia prostática serán aportados por el **Hospital General “Dr. Manuel Gea González”**.

Desglose la cantidad erogada para cada uno de los siguientes rubros:

Cargo	Sueldo * Neto mensual	Sueldo por hora /160	Multiplique por núm hrs a la semana ⁽¹⁾	Multiplique por núm de semanas ⁽²⁾
Jefe de Departamento y asesor responsable	2,560	160	640	8,320
Investigador principal- residente	6,400	160	1,600	20,800
Adscrito asociado	2,560	160	640	8,320
Investigador asociado:QFB	4,480	160	1,120	14,560

				Total Recursos humanos 52,000
--	--	--	--	----------------------------------

*Sueldo a mayo 2012

(1) Número de horas a la semana que dedica al protocolo

(2) Número de semanas que durará el protocolo

Total de Recursos Humanos	Materiales, reactivos y procedimientos	Equipo	Mantenimiento	Servicios generales	Total
52,000	10570			5,000	67,570

12. VALIDACIÓN DE DATOS.

l) La expresión del microRNA será expresada como frecuencias simples y porcentaje.

13. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS.

Se usarán tablas para presentar los resultados

14. CONSIDERACIONES ÉTICAS.

"Todos los procedimientos estarán de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud.

Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección II, investigación con riesgo mínimo, se anexa hoja de consentimiento informado

Título segundo, Capítulo VI De la investigación en órganos, tejidos y sus derivados, productos y **cadáveres** de seres humanos artículos 59 (obtención, conservación, utilización preparación suministro y destino final.) y 60 (además del debido respeto al cadáver humano, la observación del título decimocuarto en cuanto a la materia de control sanitario de la disposición de órganos, tejidos y cadáveres de seres humanos.)

Titulo tercero. De la investigación de nuevos **recursos profilácticos**, de **diagnóstico, terapéuticos y de rehabilitación**. Capítulo I Artículos 61-64

Cuando se realice investigación en seres humanos sobre nuevos (o se modifiquen) recursos profilácticos, dx., terapéuticos o rehabilitación, además deberán solicitar autorización de la Secretaría presentando documentación requerida (ver Ley).

15. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Mahn,Lukas,Heukamp,Sebastian (2011) Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *J Urology*77:1265e9 -1265e16.
2. Porkka, Pfeiffer, Waltering, Vessella (2007) microRNA Expression profiling in prostate cancer. *Cancer Research*;67(13) 01Julio2007.
3. Mitchell Parkin, Kroh,Fritz ,wyman (2008) Circulating microRNA as stable blood-based markers for cancer detection. *The National Academy of Sciences of the USA* 5, 30,10513-10518.
4. Peter A Humphrey, (2004) Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate *Modern Pathology* (2004) 17, 292–306.
5. Yamada, Enokida, Kojima, Kawakami, Chiyomaru (2010) MiR-96 and miR-183 detection in urine serve as potential tumor markers of urothelial carcinoma: correlation with stage and grade, and comparison with urinary cytology *Japanese Cancer Association cancer Sci*-10.1111/j.1349-7006.
6. Garcia,M., Jemal,A., Ward,E.M., Center,M.M., Hao,Y., Siegel,R.L., and Thun,M.J. (2007). *Global Cancer Facts & Figures 2007*. American Cancer Society.
7. INEGI. Estadísticas a Proposito del dia mundial contra el cancer 2009. 2009.
8. De Marzo,A.M., Meeker,A.K., Zha,S., Luo,J., Nakayama,M., Platz,E.A., Isaacs,W.B., and Nelson,W.G. (2003). Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 62, 55-62.
9. Schulz,W.A., Burchardt,M., and Cronauer,M.V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.* 9, 437-448.
10. Rubin,M.A. and De Marzo,A.M. (2004). Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod. Pathol.* 17, 380-388.
11. Pienta,K.J. and Bradley,D. (2006). Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 1665-1671.
12. Reynolds,M.A., Kastury,K., Groskopf,J., Schalken,J.A., and Rittenhouse,H. (2007). Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett.* 249, 5-13.
13. You,J., Cozzi,P., Walsh,B., Willcox,M., Kearsley,J., Russell,P., and Li,Y. (2010). Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 73, 10-22.
14. Bussemakers,M.J., van,B.A., Verhaegh,G.W., Smit,F.P., Karthaus,H.F., Schalken,J.A., Debruyne,F.M., Ru,N., and Isaacs,W.B. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 59, 5975-5979.
15. Rubin,M.A., Zhou,M., Dhanasekaran,S.M., Varambally,S., Barrette,T.R., Sanda,M.G., Pienta,K.J., Ghosh,D., and Chinnaiyan,A.M. (2002). alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 287, 1662-1670.
16. Tomlins,S.A., Laxman,B., Varambally,S., Cao,X., Yu,J., Helgeson,B.E., Cao,Q., Prensner,J.R., Rubin,M.A., Shah,R.B., Mehra,R., and Chinnaiyan,A.M. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* 10, 177-188.

17. Bushati, N. and Cohen, S.M. (2007). microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 175-205.
18. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
19. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294, 853-858.
20. Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10, 1957-1966.
21. Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376-385.
22. Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
23. Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* 35, 5944-5953.
24. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 3, e85.
25. Rajewsky, N. and Socci, N.D. (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev. Biol.* 267, 529-535.
26. Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004). Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
27. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102-114.
28. Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719-723.
29. Parker, R. and Sheth, U. (2007). P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635-646.
30. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318, 1931-1934.
31. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855-862.
32. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.
33. Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., and Allgayer, H. (2008). MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor *Pcd4* and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128-2136.

34. Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y.Y. (2008). MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* 18, 350-359.
35. Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628-9632.
36. Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B.E., Cao, Q., Prensner, J.R., Rubin, M.A., Shah, R.B., Mehra, R., and Chinnaiyan, A.M. (2008). Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* 10, 177-188.
37. Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376-385.
38. Rajewsky, N. and Succi, N.D. (2004). Computational identification of microRNA targets. *Dev. Biol.* 267, 529-535.
39. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102-114.
40. Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719-723.
41. Volinia, A., Calin, C., Chang-Gong, (2006) microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets February 14, 2006 ,vol. 103, no. 7, 2257–2261.