



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**  
**FACULTAD DE MEDICINA**

**EVALUACIÓN DE MICRORNAS COMO MARCADORES BIOLÓGICOS DE  
CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL.**

**TESIS**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA**  
**ALBERTO IVAN SALIDO GUADARRAMA**

**TUTOR PRINCIPAL**  
**DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES, FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR**  
**DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ, INSTITUTO DE**  
**INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**  
**DR. VICENTE MADRID MARINA, FACULTAD DE MEDICINA**

Mexico, D.F a Febrero de 2016



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## Índice

<b>Agradecimientos</b> .....	<b>1</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>2</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>3</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>Cáncer de próstata</b> .....	<b>4</b>
<i>Incidencia y prevalencia del cáncer de próstata</i> .....	5
<i>Etiología y Factores de riesgo</i> .....	5
<i>Histología y clasificación</i> .....	6
<b>Diagnostico del CaP</b> .....	<b>9</b>
<i>Marcadores biológicos para el diagnostico y pronostico del CaP</i> .....	9
<i>Marcadores y métodos utilizados en el diagnostico contemporáneo del CaP</i> .....	10
<i>Nuevos marcadores moleculares</i> .....	12
<b>MicroRNAs</b> .....	<b>14</b>
<i>Biogénesis de microRNAs</i> .....	14
<i>Mecanismo de acción de los microRNAs</i> .....	16
<i>Alteraciones de los microRNAs y sus consecuencias en cáncer</i> .....	17
<i>Micrnas en cáncer de próstata</i> .....	18
<i>Evidencias del uso de miRNAs como marcadores moleculares en cáncer de próstata</i> .....	20
<b>Justificación</b> .....	<b>22</b>
<b>Planteamiento del problema</b> .....	<b>22</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>22</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>23</b>
<i>General</i> .....	23
<i>Particulares</i> .....	23
<b>Materiales y métodos</b> .....	<b>24</b>
<i>Cohorte de pacientes</i> .....	24
<i>Procesamiento de muestras de orina y extracción de RNA</i> .....	26
<i>Preparación de cDNA y Pre-amplificación y PCR en tiempo real</i> .....	26
<i>Procesamiento de arreglos TLDA y tratamiento de datos de PCR en tiempo real</i> .....	27
<i>Cultivo Celular</i> .....	28
<i>Transfección de miRNAs sintéticos</i> .....	28
<i>Ensayo de viabilidad celular</i> .....	29
<i>Ensayo de migración celular</i> .....	29
<i>Ensayo de gen reportero</i> .....	30
<i>Análisis de expresión global en células transfectadas con miR-100</i> .....	30
<i>Análisis bioinformático de datos de microarreglos</i> .....	31
<i>Análisis de anotación funcional de genes</i> .....	31
<i>Análisis estadístico</i> .....	32
<b>Resultados</b> .....	<b>32</b>
<i>Los miRNAs son moléculas estables y se pueden medir con robustez en muestras de orina</i> .....	32

<i>Identificación de miRNAs alterados significativamente en cáncer de próstata</i> .....	35
<i>Asociación de los niveles en orina de miR-100 y miR-200b con el resultado de biopsia de próstata</i> .....	39
<i>Evaluación del rendimiento diagnóstico del puntaje de miR-100/200b en orina sobre el resultado de biopsia de próstata</i> .....	42
<i>Evaluación del rendimiento diagnóstico del puntaje de miR-100/200b en orina sobre el resultado de biopsia de próstata en la zona gris de PSA</i> .....	45
<i>Caracterización de la expresión de miR-100 y evaluación funcional de su sobre-expresión en células de CaP</i> .....	48
<i>miR-100 disminuye la viabilidad y suprime la migración de células de CaP</i> .....	49
<i>miR-100 participa en la regulación de genes relacionados con el metabolismo celular y la migración celular</i> .....	51
<b>Discusión de resultados</b> .....	<b>53</b>
<b>Conclusión</b> .....	<b>59</b>
<b>Referencias</b> .....	<b>60</b>

## Lista de Tablas

Tabla I. Características clínicas.....	25
Tabla II. Lista de miRNAs con cambios de expresión diferencial en el estudio exploratorio inicial.....	38
Tabla III. Resultados de la validación de miRNAs seleccionados en un mayor número de muestras.....	39
Tabla IV. Razón de oportunidades (OR) ajustado y resultados del análisis ROC para los modelos de regresión logística univariable y multivariable univariable en la cohorte entera.....	44
Tabla V. Razón de oportunidades (OR) ajustado y resultados del análisis ROC para los modelos de regresión logística univariable y multivariable univariable en la zona gris de PSA.....	46

## Lista de Figuras

Figura 1. Anatomía y fisiología de la próstata.....	4
Figura 2. Esquema del sistema de clasificación Gleason .....	8
Figura 3. Biogénesis y el mecanismo de acción de los miRNAs .....	17
Figura 4. Estabilidad miARN y sus niveles en muestras de orina. ....	37
Figura 5. Categorías de miRNAs en cada muestra después de la filtración por Ct.....	36
Figura 6. miRNAs diferencialmente expresados en el estudio de exploración. ....	37
Figura 7. Asociación de los niveles de miR-100 y miR-200b en orina con los resultados de biopsia de próstata.....	41
Figura 8. Análisis ROC.....	44
Figura 9. Curva de decisión de análisis del efecto de los modelos de predicción en la detección del CaP.....	47
Figura 10. Expresión de miR-100 y evaluación de la transfección de miR-100 en células de CaP.....	49
Figura 11. Efecto de miR-100 sobre la viabilidad y la migración celular.....	50
Figura 12. Mapa de volcán.....	52
Figura 13. Procesos biológicos con sobre-representación de genes regulados por miR-100 .....	53



## **Agradecimientos**

A mis padres, hermanos y tíos por su apoyo, aliento y enseñanzas durante todo este tiempo.

Particularmente, a Sandra por ser colega, maestra, arbitro en ocasiones, por la inteligencia que te caracteriza, por tu confianza; pero sobre todo, por ser cómplice y compañera en este trayecto.

A mis compañeros de laboratorio y del INMEGEN por su apoyo, por su confianza y aliento. Particularmente, quiero agradecer a Pily a Susy por todas las experiencias, las discusiones académicas, los viajes, la comida y la bebida.

Agradezco al Doctor Mauricio Rodríguez Dorantes por las oportunidades brindadas y por su apoyo y amistad incondicional.

A los Doctores Ignacio Camacho Arroyo, Paty García López, y Mahara Valverde por la revisión crítica y sus aportaciones para mejorar este trabajo.

A la Universidad Nacional de México y al Instituto Nacional de Medicina Genómica.

A todas las personas que de una u otra forma me han brindado experiencia, enseñanzas, consejos, aliento y confianza

## **Resumen.**

El cáncer de próstata (CaP) es el cáncer más frecuente en hombres en México y en Occidente. Desde el advenimiento de la medición del antígeno prostático específico (PSA) en suero, hemos visto una disminución significativa en la mortalidad por CaP. A pesar de ello, el uso del PSA en suero ha conducido a que muchos hombres con hiperplasia benigna (HPB) o cáncer indolente sean sometidos a biopsias prostáticas innecesarias y al sobre-tratamiento. Se ha demostrado que los microRNAs (miRNAs) tienen un gran potencial como biomarcadores. En este estudio nos hemos centrado en el desarrollo de una estrategia para identificar y medir la expresión de miRNAs en muestras de orina asociadas a CaP. Identificamos una firma molecular de miRNAs asociada a CaP, consistente de miR-100 y miR-200b. Con un análisis de regresión logística multivariable, se construyó un modelo base que incluye las variables clínicas: edad, PSA, % de PSA libre y examen digital rectal (DRE) y un segundo compuesto por el modelo base, más miR-100/200b. Un análisis ROC demostró que nuestro modelo combinado superó significativamente la capacidad del PSA (valor de  $p < 0,001$ ) y el modelo de base ( $p$ -valor = 0,010) para discriminar entre pacientes con CaP y HPB. Al evaluar el subgrupo de pacientes en la zona gris de los niveles de PSA, el rendimiento del modelo combinado para predecir los casos de CaP fue significativamente superior a PSA (valor de  $p < 0,001$ ) y el modelo de base ( $p$ -valor = 0,009). Por otra parte, un análisis de curva de decisión demostró que el uso de nuestro modelo combinado aumenta el beneficio clínico para los pacientes y produce una reducción sustancial en biopsias innecesarias. Adicionalmente, corroboramos que miR-100 disminuye la viabilidad y la migración de células de CaP y que regula la expresión de genes que están relacionados con procesos biológicos de metabolismo celular, motilidad, adhesión y remodelación de la matriz extracelular.

**Abstract.**

Prostate cancer (PCa) is the more common cancer type in men in the western world, including Mexico. Since the advent of prostate specific antigen (PSA), a significant decrease in prostate cancer mortality has been observed. Despite the reduction in the number of deaths, PCa detection using PSA has led to overdiagnosis and overtreatment of many men with benign prostatic hyperplasia (BPH) or indolent cancer, in order to save one man from dying from PCa. It has been shown that microRNAs (miRNAs) in biofluids are potential biomarkers for PCa. In this study we focused on developing a strategy to measure the association of urine miRNAs with PCa and evaluate their performance as predictors of disease. We identified and validated a molecular signature consisting of miR-100 and miR-200b. Using a multivariate logistic regression analysis, we constructed a base model including the variables age, PSA, % free PSA and digital rectal examination (DRE); and a combined model composed of the base model plus the miR-100/200b signature. A ROC analysis showed that our combined model significantly improved the ability of PSA ( $p < 0.001$ ) and the base model ( $p$ -value = 0.010) to discriminate between patients with PCa and BPH. When assessing the subgroup of patients in the gray zone of PSA levels, the performance of the combined model to predict cases of PCa was significantly superior to the use of PSA alone ( $p < 0.001$ ) or the the base model ( $p$ -value < 0.009). Even more, a decision curve analysis showed that the use of our combined model increases the clinical benefit by reducing substantially the number of unnecessary biopsies. Additionally, we corroborated that miR-100 decreases the viability and inhibits the migration capability of PCa cells. Trough a gain of function experiment, we found that miR-100 regulates the expression of a set of genes that are associated with biological processes of cellular metabolism, motility, adhesion and extracellular matrix remodeling.

## Introducción

### Cáncer de próstata.

#### ***Anatomía y fisiología de la próstata***

La próstata es una glándula exocrina del sistema reproductivo masculino en mamíferos, que se localiza en la base de la vejiga y rodea completamente a la uretra. Anatómicamente, se divide en 4 regiones glandulares o zonas: la zona periuretral o de transición, que ocupa el 5% de la próstata; la zona central, cruzada por los conductos eyaculadores, que supone un 25% de la glándula; la zona fibromuscular o anterior y la zona periférica que ocupan un 70% del volumen glandular. Histológicamente, la próstata consiste de dos tipos celulares principales: el estroma y el epitelio. El estroma está compuesto de células de musculo liso, fibroblastos y células endoteliales. Por otra parte, el epitelio, se compone de 4 subtipos celulares distintos: epitelio basal, epitelio secretor, células neuroendócrinas y células madre [1].

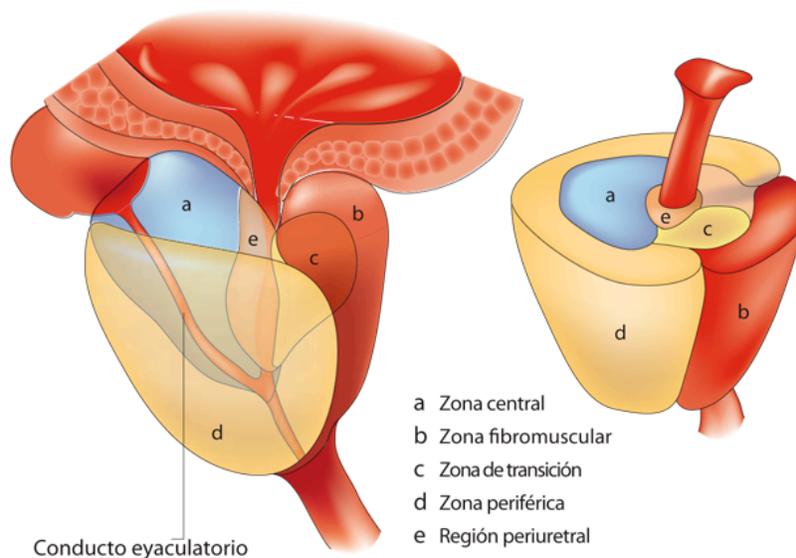


Figura 1. Anatomía y fisiología de la próstata. La mayoría de las lesiones de cáncer ocurren en la zona periférica de la glándula, pocas ocurren en la zona de transición y casi ninguna en la zona central. La mayoría de las lesiones de HPB tienen lugar en la zona de transición. Adaptado de [1].

### ***Incidencia y prevalencia del cáncer de próstata***

Alrededor del mundo, cerca de 1,094,916 casos de CaP fueron diagnosticados para el 2012 (14.8 % del total de casos) y ocasiono el 6.6 % % de todas las defunciones en hombres con cáncer, esto lo hace el segundo tumor con mayor incidencia y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres. Cabe destacar que en los países occidentales, el CaP es el tipo de neoplasia maligna mas frecuente entre la población masculina [2]. Particularmente en México, el CaP representa el 21.4% de todas las incidencias de cáncer en varones. La edad promedio al momento del diagnostico es de 65 años y según las tasas de incidencia ajustadas por edad, el CaP afecta a 27 por cada cien mil. En 2102, el 16.5% de las defunciones por cáncer fueron debidas al CaP, convirtiéndolo en la primera causa de muerte por cáncer en hombres [2, 3].

### ***Etiología y Factores de riesgo***

#### ***Edad.***

El factor de riesgo mas prevalente para el CaP es la edad. Alrededor del 90% de los casos de CaP son detectados en hombres mayores de 65 años y los datos indican que a partir de los 50 años la incidencia y la mortalidad se incrementan exponencialmente [4].

#### ***Etnicidad.***

La incidencia es mayor en la población afroamericana. El riesgo de CaP se eleva 2.5 veces en los hombres con ascendencia africana [5].

#### ***Historia familiar.***

La presencia de cáncer de próstata en familiares de primer grado aumenta el riesgo de 2 a 3 veces [6]. Varios loci de susceptibilidad a cáncer de próstata familiar, así como polimorfismos, se han identificado, pero aquellos que predominan en los carcinomas familiares no ha sido identificados aun [7].

### Hormonas.

Los andrógenos tienen un papel importante en el establecimiento de la enfermedad. Variaciones de genes que participan en las vías androgénicas han sido asociadas con el desarrollo y progreso del CaP. De hecho, el CaP cursa por diferentes estadios desde andrógeno dependiente a andrógeno independiente o refractario a terapia hormonal, siendo esta última fase la más agresiva y de mal pronóstico para el paciente [8].

### Otros factores.

La patogénesis del CaP involucra una interacción entre factores ambientales y genéticos y se tiene conocimiento de muchos factores putativos de riesgo entre los que se encuentran la dieta, el tabaquismo, el sedentarismo la actividad física, factores sexuales y la obesidad. Aunque los cambios en el estilo de vida y la 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].

### ***Histología y clasificación***

La próstata puede presentar diversos tipos de lesiones. Las alteraciones benignas mas predominantes son la hiperplasia prostática benigna (HPB) y la neoplasia intraepitelial prostática (NIP). La HPB ocurre principalmente en la zona de transición y se trata de una hiperplasia benigna de del tejido epitelial y del estroma prostático. La HPB no es considerada como precursor del CaP, dado que tienen surgen de diferentes regiones de la próstata. Por otra parte, la NIP se caracteriza por la presencia de células anaplasicas y proliferativas dentro de los ductos y los acinos prostáticos. La NIP es considerada como precursora del CaP [10, 11].

### Escala Gleason

La agresividad del tumor se puede determinar mediante un examen del patrón microscópico de las células cancerosas por parte de un patólogo. El sistema de

clasificación tumoral más comúnmente utilizado es la escala Gleason [12, 13]. Este sistema asigna una calificación basada en la arquitectura y el nivel de diferenciación celular de las glándulas dentro del tumor. Un grado Gleason de 1 se asigna a tumores con glándulas bien definidas y separadas, mientras que uno de 5 corresponde a tumores en donde la estructura celular ordenada y bien definida de las glándulas se pierde. Los tumores a menudo presentan mas de un patrón en diferentes regiones e incluso en el mismo núcleo de una sola biopsia. Para tener en cuenta esto, la puntuación de Gleason se obtiene mediante la suma del grado presente mas predominante y del segundo grado más predominante. Por ejemplo, 3 + 4, donde 3 sería el patrón más común y 4 el segundo patrón más común observado en la biopsia. Dado que el grado Gleason individual puede variar de 1 a 5, la puntuación (o suma) puede variar de 1 a 5 + 1 + 5 o desde 2 a 10. Generalmente, los tumores detectados cubren del 5 al 10. En algunas ocasiones, cuando un pequeño componente del tumor en una prostatectomía radical tiene un patrón más alto que los dos patrones más predominantes, entonces el componente menor se añade como una calificación terciaria (por ejemplo, 60% del patrón 3, 35% del patrón 4% y 5% del patrón 5, se debe informar como 3 + 4 con grado terciario de 5). Con cada incremento en la puntuación (por ejemplo, de Gleason 6 a 7), hay un aumento en la agresividad del tumor. Un cáncer de alto grado se refiere comúnmente a una puntuación Gleason de 8 a 10 (el grupo más agresivo), pero también pueden incluir tumores con Gleason 7.

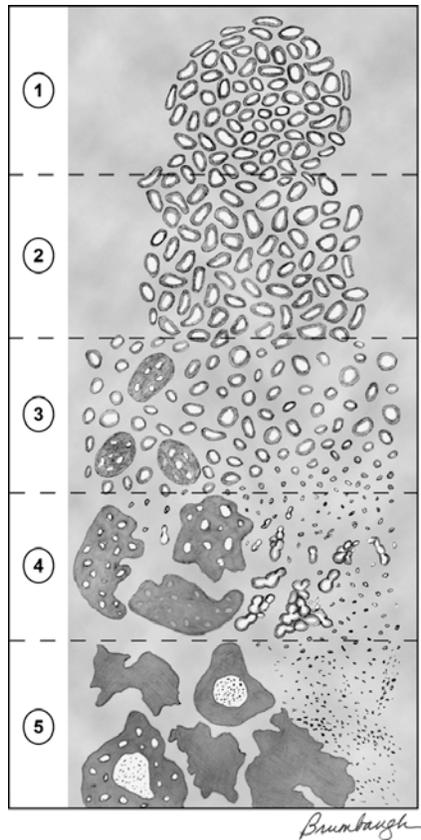


Figura 2. Esquema del sistema de clasificación Gleason. Adaptado de (Epstein et. Al [12])

### Escala TNM

El estadio tumoral se refiere al grado al cual el tumor ha comprometido la próstata o se ha diseminado. Al igual que con otros tumores, los casos de CaP que involucran sólo una pequeña porción de la próstata se tratan con más éxito que los que se han extendido a lo largo de la glándula. Del mismo modo, los tumores que permanecen confinados a la próstata también se tratan con más éxito que aquellos que se han extendido más allá de los confines de la glándula. Por último, los tumores que se han diseminado y que han formado metástasis en sitios distantes a la próstata (por ejemplo, los ganglios linfáticos o en hueso) tienen el peor pronóstico. La escala TNM ha sido empleada para estadificar a los tumores. De acuerdo a la nomenclatura de dicha escala aplicada al CaP, los tumores T1 confinados a la próstata y con examen rectal digital (DRE) normal, son clínicamente no significativos; tumores T2, siguen estando

organoconfinados pero presentan DRE sospechoso; los tumores T3 penetran la cápsula extracelular y se infiltran en las vesículas seminales y los tumores T4 infiltran estructuras distintas de las vesículas seminales. N y M describen los procesos de metástasis, que dictan la implicación de los ganglios linfáticos regionales o la aparición de metástasis a distancia [4, 12].

### **Diagnostico del CaP.**

El CaP clínicamente localizado generalmente no causa síntomas. La disminución del flujo urinario y el aumento de la frecuencia urinaria son síntomas comunes asociados con el envejecimiento, pero no necesariamente están relacionados con la presencia de CaP. Es por esta razón que las pruebas de detección temprana se han desarrollado con el fin de identificar el cáncer mientras permanezca confinado a la próstata. Las recomendaciones modernas para el "screening" de detección de CaP todas incorporar la medición de niveles de antígeno prostático específico (PSA) sérico; adicionalmente, otros métodos de detección pueden o no ser incluidos tales como el examen rectal digital (DRE) y las mediciones ultrasonográficas. [14] [15, 16]

### ***Marcadores biológicos para el diagnostico y pronostico del CaP.***

El término "biomarcador", es un acrónimo de "marcador biológico". Según el Instituto Nacional de Salud (NIH) en los EE.UU, un biomarcador es una característica que se mide objetivamente y es evaluada como un indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacéuticas a una intervención terapéutica [17]. Los biomarcadores para cáncer son producidos por el tumor mismo o por el cuerpo en respuesta al tumor. Desde el punto de vista de su utilidad, se han propuesto seis tipos diferentes de biomarcadores en CaP [18]:

1. DetECCIÓN o "screening": se utiliza para evaluar a los pacientes que presentan cualquiera de los factores de riesgo para CaP o síntomas de CaP.

2. Diagnóstico: puede ayudar, junto con el uso de características histopatológicas clásicas, en la evaluación de la presencia o ausencia de cáncer.
3. Pronóstico: permite predecir el desenlace en los pacientes con base en el riesgo de recurrencia o progresión lo que permite el manejo individualizado del paciente.
4. Predictivo: se utiliza para predecir la efectividad de tratamiento, y/o para monitorear la eficacia del tratamiento. Puede ayudar a definir la modalidad de tratamiento mas adecuada.
5. Blanco terapéutico: este es un subtipo de biomarcador predictivo que puede ayudar a identificar a los pacientes que se beneficiarán de un régimen de tratamiento particular, con base en la presencia de un blanco molecular para una terapia establecida y, por lo tanto, es afectada por el tratamiento en cuestión.
6. Sustituto de punto final: se utiliza como sustituto de un criterio de valoración clínica y permite medir el beneficio clínico, daño o falta de beneficio o daño. Los sustitutos podrían reemplazar a los puntos finales tradicionales, como la mortalidad debido a la enfermedad o recaída de la enfermedad.

***Marcadores y métodos utilizados en el diagnóstico contemporáneo del CaP***  
***Uso del antígeno prostático específico.***

El PSA es una sustancia producida por las células en la glándula de la próstata (tanto las células normales y células cancerosas). PSA se encuentra principalmente en el semen, pero una pequeña cantidad también se encuentra en la sangre. Hombres más saludables tienen niveles menores de 4 ng/ml de sangre. La probabilidad de tener CaP aumenta a medida que el nivel de PSA sube y este llega a valores por encima de 4. Aún así, un nivel por debajo del 4 no garantiza que un hombre no tiene cáncer - alrededor del 15% de los hombres con un PSA por debajo de 4 tendrá cáncer de próstata en una biopsia. Los hombres con un nivel de PSA entre 4 y 10 tienen una probabilidad de 1 en 4 de

tener cáncer de próstata. Si el PSA es más de 10, la probabilidad de tener cáncer de próstata es más del 50%. [19]

El PSA se produce en 2 formas principales en la sangre. Una forma se une a proteínas de la sangre, mientras que la otra es libre. El porcentaje de PSA libre es la relación entre la cantidad de PSA que circula libre, en comparación con el nivel total de PSA. El porcentaje de PSA libre es menor en los hombres que tienen cáncer de próstata que en los hombres que no lo hacen. Esta prueba se utiliza a veces para ayudar a decidir si se debe practicar una biopsia de próstata si los resultados de PSA están en el rango límite (entre 4 y 10). Un nivel de PSA libre inferior significa que su probabilidad de tener CaP es mayor y es probable que tenga una biopsia. Muchos médicos recomiendan biopsias para los hombres cuyo porcentaje de PSA libre es 10% o menos, y aconsejan considerar una biopsia si está entre 10% y 25%. El uso de estos puntos de corte detecta la mayoría de los tipos de cáncer y ayuda a algunos hombres a evitar las biopsias prostáticas innecesarias. Esta prueba se utiliza ampliamente, pero no todos los médicos están de acuerdo que el 25% es el mejor punto de corte para decidir sobre una biopsia, y el punto de corte puede cambiar en función del nivel general de PSA. Una prueba más reciente, conocida como PSA acompañado, mide directamente la cantidad de PSA que se une a otras proteínas (la porción de PSA que no está "libre"). Este examen se hace en lugar de revisar el PSA total y libre, y podría dar la misma cantidad de información que el resto de las pruebas realizadas por separado. Los estudios están en curso para ver si esta prueba ofrece el mismo nivel de precisión [14] [16].

#### Uso de examen rectal digital.

Para un DRE, el médico inserta un dedo enguantado y lubricado en el recto para palpar cualquier abultamiento o áreas duras en la próstata que podría ser cáncer. Este examen puede ser incómodo (especialmente para los hombres que tienen hemorroides), pero por lo general no es doloroso y sólo toma poco

tiempo. Se trata de un examen con alto grado de subjetividad y la tasa de falsos positivos mediante esta prueba está entre un 50% y un 80%. [16]

### Biopsia prostática.

Aunque un valor de PSA superior o DRE anormal pueden plantear la sospecha de cáncer de próstata, la detección requiere confirmación con una biopsia de próstata. Una biopsia de próstata es un procedimiento para extraer muestras de tejido sospechoso de la próstata. Después de una biopsia de la próstata, las muestras de tejido de la biopsia de próstata se examinan bajo un microscopio para detectar cambios en aspectos como el tamaño y la forma de las células, forma y tamaño de los núcleos y la arquitectura celular, los cuales son un signo de CaP. Si el cáncer está presente, se evalúa para determinar la rapidez con la que es probable que crezca y se disemine y determinar las mejores opciones de tratamiento. A pesar de ser el estándar de oro del diagnóstico de CaP, su especificidad es de aproximadamente 50% en cuanto a la detección de tumores clínicamente significativos. Es decir, la mitad de las biopsias practicadas podrían ser evitables [13, 15, 20].

### ***Nuevos marcadores moleculares.***

#### proPSA.

El proPSA, contiene un péptido líder de siete aminoácidos, es una forma molecular de PSA libre, y está asociado con la presencia de CaP. También existen formas truncadas de proPSA en el suero, que contienen cinco, cuatro, o dos más aminoácidos que el PSA. La forma proPSA 2 (p2PSA) ha sido identificado como la forma más prevalente en los extractos tumorales, lo que sugiere un papel para estas formas moleculares de PSA para la detección precoz del CaP, y posiblemente la identificación del CaP agresivos [21]. Recientemente, un modelo matemático de tres biomarcadores (p2PSA/fPSA  $\times$  PSA<sup>1/2</sup>) fue desarrollado. Dicho modelo, denominado "Prostate health index ( $\phi$ )", permite distinguir CaP de condiciones benigna de próstata en hombres

mayores de 50 años con un PSA sérico total entre 4 y 10 ng / ml, y con un DRE no sospechoso [21].

### Oncotype DX

El ensayo mide la expresión de 12 genes relacionados con cáncer y representan cuatro vías biológicas diferentes: 1) vía de andrógenos (AZGP1, KLK2, SRD5A2 y RAM13C); 2) organización celular (FLNC, GSN, TPM2 y GSTM2); 3) vía de proliferación (TPX2); y 4) respuesta del estroma (BGN, COL1A1 y SFRP4)] y cinco genes de referencia (utilizados para normalizar y controlar la variabilidad pre-analítica y analítica), que se combinan para calcular un puntaje denominado “Genomic Prostate Score” [22] y que subdivide el riesgo de CaP con el fin de ayudar a los médicos a seleccionar candidatos apropiados para vigilancia activa.

### PC3

El antígeno de cáncer de próstata 3 (PCA3 o DD3) es un RNA no codificante específico de la próstata. El ensayo PCA3 desarrollado por “Progenesa” es una prueba que mide la concentración PCA3 y moléculas de RNA del PSA y calcula la proporción de PCA3/PSA (puntuación PCA3) en muestras de orina obtenidas posterior al DRE. Su uso previsto es para los hombres que tienen una sospecha de CaP según el nivel de PSA y/o tacto rectal y uno o más resultados biopsia negativos. Se ha reportado que los valores de área bajo la curva (AUC) para el PC3 oscilan entre 0.66 y 0.75. La sensibilidad varía desde 53 hasta 69%, con una especificidad que van desde 71 hasta 83% [23].

### TMPRSS2:ERG

El gen de fusión TMPRSS2-ERG es un re-arreglo común en CaP [24]. El uso de la fusión TMPRSS2-ERG para la detección de CaP presenta una sensibilidad de tan solo 37%, pero tiene una especificidad de 93%,. A pesar de que la especificidad es alta, la mayoría de los tumores CaP tienen múltiples focos, lo que hace la detección del TMPRSS2-ERG muy heterogénea. Se ha reportado que existe una correlación significativa con tumores de estadio alto ( $P < 0,01$ ),

pero hay poca correlación con la suma de Gleason ( $p = 0,58$ ), la mortalidad ( $p = 0,99$ ), y la recurrencia bioquímica ( $p = 0,60$ ). Una aproximación para mejorar el rendimiento clínico, combina las pruebas de orina para PCA3 de Progenesa, TMPRSS2-ERG y los niveles séricos de PSA, para producir una evaluación del riesgo de CaP agresivo [25].

#### Otros marcadores potenciales.

Con el desarrollo de nuevas tecnologías, hemos sido capaces de descifrar la identidad de nuevos factores moleculares que juegan un papel importante en el desarrollo del cáncer y que podrían ser útiles como marcadores biológicos que permitan mejorar la detección de los casos de CaP de alto riesgo y diferenciarlos de condiciones benignas o formas no agresivas del tumor. Entre dichas moléculas destacan las nuevas formas de RNA pequeño, como los microRNAs, que han demostrado ser altamente estables en diversos fluidos biológicos y por tanto son candidatos valiosos para el desarrollo de nuevos biomarcadores, que además, puedan ser evaluados mediante métodos mínimamente invasivos [26].

### **MicroRNAs**

#### ***Biogénesis de microRNAs.***

Los microRNAs (miRNA) son secuencias cortas de RNA no codificantes, de 18 a 22 nucleótidos que se expresan en varios organismos eucariontes. Los primeros estudios revelaron que la expresión de los miRNA let-7 y lin-4 influye en el desarrollo y ciclo celular de *Caenorhabditis elegans* y que la pérdida de su función altera su desarrollo normal [27]. Estudios subsecuentes describen patrones de expresión de miRNA que son específicos de una etapa del desarrollo o de un tipo de tejido en especial en vertebrados. Estos hallazgos sugieren que los miRNA desempeñan un papel en el control de la expresión génica en eucariontes, al menos tan importante como el de los factores de transcripción [28].

El mecanismo de biogénesis de los miRNA (Figura 3) inicia con el procesamiento de un precursor primario (pri-miRNA) que puede estar contenido en diferentes regiones génicas; intrónicas, exónicas, o no traducidas (UTR). La RNA polimerasa II se encarga de la transcripción del pri-miRNA, el cual, al igual que un mRNA, se encuentra poliadenilado y tiene CAP en el extremo 5´[29]. Cada pri- miRNA puede contener uno o más miRNA, 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 pre-miRNA están organizados en agrupamientos 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 promotor [30]. A continuación, las horquillas de pre-miRNA 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 forma dependiente de RAN guanosina trifosfato (Lund et al., 2004). 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 miRNA maduros potenciales. Este dúplex de RNA se asocia a un complejo proteínico denominado complejo de silenciamiento 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 Argonauta 2 (AGO 2) del complejo RISC. 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 coexistir en ciertos tejidos, para actuar sobre diferentes poblaciones de mRNA (Ro et al., 2007).

### ***Mecanismo de acción de los microRNAs.***

De manera general, los miRNA establecen un apareamiento de bases con una secuencia de 6 a 8 nucleótidos que se localiza en la región 3'UTR del mRNA, denominada secuencia semilla [31, 32]. El apareamiento del miRNA con su mRNA blanco conduce a la degradación de este último o a la represión de su traducción. Se ha demostrado que existe una represión del mecanismo de reconocimiento del CAP 5', en el que el miRNA impide la unión del factor de inicio de la traducción eIF4F. La represión de la traducción medida por miRNA, también puede ocurrir al inhibirse el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S al complejo de iniciación de la traducción [33]. Aquellos mRNA que han sido silenciados por los mecanismos mencionados son secuestrados dentro de un tipo de estructuras de procesamiento citoplasmáticas denominadas cuerpos P, en donde son almacenados y, finalmente, degradados por acción de proteínas que también se encuentran dentro de los cuerpos P. De hecho, todo el conjunto del RISC se encuentra también dentro de estos cuerpos P, por lo que éste también puede ensamblar la maquinaria que conlleva al decaimiento de los mRNA [28]. De manera interesante, la versatilidad en el modo de acción de los miRNA no se limita a inhibir la expresión génica de ciertos productos biológicamente funcionales. También se ha demostrado que, de manera opuesta, su presencia y asociación a otros factores, p.ej. la proteína relacionada al síndrome del X frágil, puede inducir e incrementar la traducción del transcrito sobre el que ejercen su efecto, más que impedirlo [34].

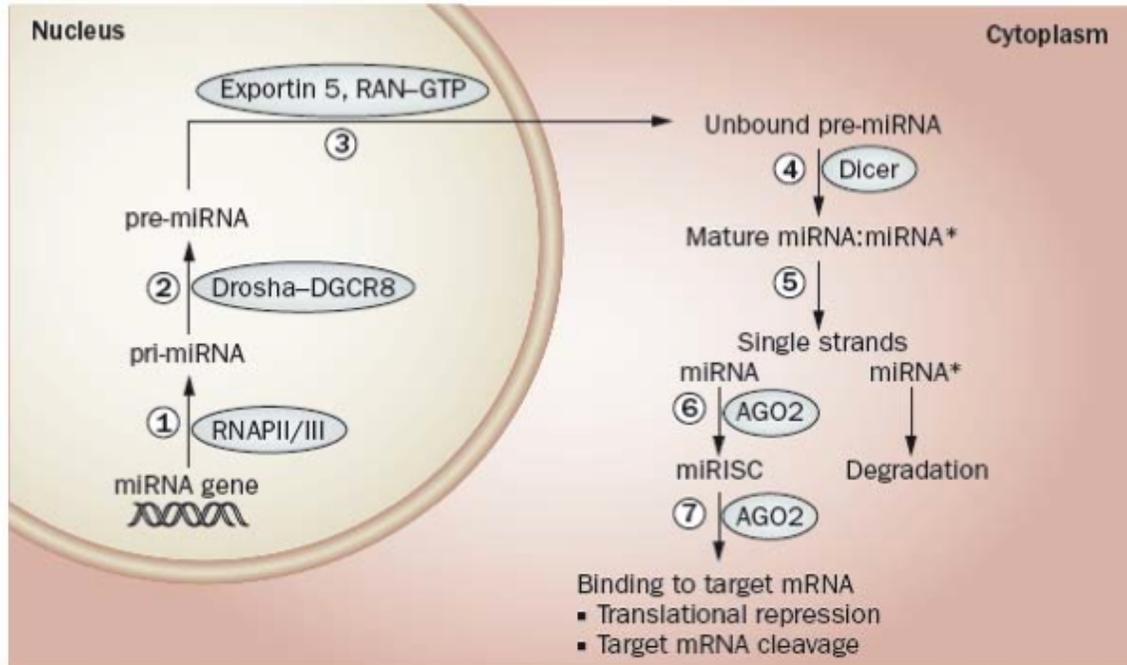


Figura 3. Biogénesis y el mecanismo de acción de los miRNAs. (1) Los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II como miRNAs primarios (pri-miRNAs) con tamaño de > 500 hasta varios miles nt. (2) El pri-miRNA es escindido por el complejo Drosha-DGCR8 dando origen a un segundo intermediario, el precursor del miRNA (pre-miRNA). (3) El pre-miRNA es exportado desde el núcleo al citoplasma por la acción de XPO5 y el sistema RAN-GTP. (4) En el citoplasma, el pre-miRNA sufre un segundo corte por Dicer para formar el miRNA maduro (5) la cadena guía de este dúplex de miRNA maduro se incorpora al complejo miRISC. La hebra pasajera (miRNA\*) por lo general es degradada. (6) El miRISC es un complejo ribonucleótido cuyos componentes principales son las proteínas Argonata (principalmente, AGO2 en mamíferos) y el miRNA guía maduro. (7) El miRNA se une a secuencias en la región 3'UTR de un mRNA, guiando al complejo miRISC a su transcrito blanco. Adaptado de (Schaefer et al., 2010b) [35].

### ***Alteraciones de los microRNAs y sus consecuencias en cáncer.***

El vínculo más directo entre la función de miRNA 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-CLL [36]. Más aun, posteriormente se reportó que ambos miRNA tenían como blanco de acción la región 3'UTR del transcrito del gen BCL2, el cual resulta ser un potente inhibidor de la apoptosis [37]. Lo anterior sugiere contundentemente una actividad supresora de tumores para estos dos miRNA. Posteriormente, se demostró la expresión de una firma molecular específica de 13 miRNA, que incluye a miR-15a y miR-16-1, asociada a la aparición y progreso de la B-CLL [38]. Más de la mitad de los miRNA 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 miRNA en la patogénesis del cáncer [39]. Por otra parte, estudios subsecuentes han mostrado que los perfiles de expresión de los miRNA proporcionan información importante acerca del estado de diferenciación y el linaje celular en diferentes tipos de tumores. Estos perfiles de expresión de miRNA, también permiten la clasificación del tejido de origen de tumores pobremente diferenciados con mayor exactitud que la que permite el análisis de expresión de mRNA de las mismas muestras [40]. Con base en esta información, podría decirse que la historia del desarrollo de un tumor está reflejada en su patrón de expresión de miRNA particular. En el estudio mencionado, también se muestra que más de la mitad de los miRNA examinados se encuentran expresados a un nivel inferior en tumores, en comparación con tejidos sanos de mismo tipo e independientemente del tipo celular, lo que refleja el papel de los miRNA en la diferenciación celular terminal y que la diferenciación incompleta en células cancerosas está fuertemente asociada a la disminución en su expresión.

### ***Micrnas en cáncer de próstata***

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 miRNA relacionados al CaP podría aportar información valiosa

sobre las alteraciones moleculares asociadas a la patogénesis del CaP. Se han reportado diversos estudios de la expresión de miRNA en muestras clínicas de CaP. En un trabajo sobre el perfil de expresión de 228 miRNA en 56 muestras de CaP y 7 de tejido prostático normal, se logró identificar la expresión diferencial significativa de 42 miRNA. De los miRNA identificados, 39 (87%) se encontraban sobre-expresados y 6 (13%) estaban sub-expresados, en las muestras de CaP [41]. Alternativamente, en otro estudio, analizaron el perfil de expresión para 319 miRNA en 9 muestras de CaP y 4 de HPB y lograron detectar 50 miRNA expresados diferencialmente. De estos, 36 (72%) mostraron estar sub- expresados en muestras de CaP, mientras que 14 (28%) se encontraban sobre- expresados en las mismas muestras [42]. Entre estos dos estudios existen discrepancias que pueden ser atribuidas en gran medida a las diferentes metodologías aplicadas, lo que indica que el análisis del perfil de expresión de miRNA en muestras clínicas de CaP no es un asunto trivial. Reportes más recientes han mostrado que la expresión de miRNA se encuentra regulada a la baja de manera significativa en tejidos de CaP con respecto a tejido prostático benigno [43, 44], datos que coinciden con los reportados en el trabajo de Porkka et al. (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 particular de miRNA. 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 miRNA 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.

### ***Evidencias del uso de miRNAs como marcadores moleculares en cáncer de próstata.***

Varios estudios han demostrado que miRNAs son liberados por las células en el espacio extracelular para funcionar como moduladores de los tejidos circundantes y distantes [45, 46]. Dichos miRNAs son liberados dentro de vesículas (como exosomas) o complejos con las proteínas por lo que son estables en la sangre [47]. En los últimos años miRNAs circulantes se han convertido en candidatos atractivos para ser utilizados como biomarcadores de cáncer [48]. Estudios independientes han demostrado que hay dos miRNAs prometedoros como marcadores en circulación sanguínea, miR-141 y miR-375. Los niveles en circulación de miR-141 se encontraron significativamente elevados en los pacientes con CaP metastásico (n = 25) en comparación con controles sanos emparejados por edad (n = 25) y se determinó que podría detectar CaP metastásico con un 60% de sensibilidad y especificidad del 100% [26]. Zhang et al. detectaron niveles séricos elevados de miR-141 en pacientes con CaP con metástasis óseas (n = 30) en comparación a los que no la presentaban (n = 20) e informaron los niveles séricos de miR-141 se correlacionan con el grado Gleason del tumor y el número de lesiones metastásicas óseas [49]. En otro estudio, González y colegas relataron que miR-141 en suero permite predecir la progresión de CaP en un seguimiento periódico [50]. Brase et al. informaron que el aumento de los niveles séricos de miR-375 y miR-141 estaban asociados con un alto riesgo de CaP en pacientes con [51]. En un segundo conjunto de validación los niveles séricos elevados de miR-375 y miR-141 mostraron in asociación con mayor grado de Gleason (GS $\geq$ 8 comparación con GS $\leq$ 7).

El número de estudios sobre análisis de miRNAs en orina es limitado, sin embargo son promisorios. Un análisis de miRNAs seleccionados en muestras de orina encontró que miR-107 y miR-574-3p fueron cuantificados en forma significativa en mayores concentraciones en los sedimentos celulares en la orina de los hombres con CaP en comparación con los de sujetos sanos, con un 67% de sensibilidad y 43% de especificidad [52]. En otro estudio, un panel de

miRNAs fueron analizados en la orina de 33 pacientes con CaP (16 de alto riesgo y 17 de bajo riesgo) y fueron identificados miRNAs que podrían predecir la respuesta clínica después del tratamiento por prostatectomía radical [53]. La combinación de miR-16, miR-21 y miR-222 mostró ser capaz predecir CaP de alto riesgo con una AUC de 0,75.

## **Justificación**

El CaP es el tipo de cáncer mas frecuente en hombres en México y en el mundo occidental. Desde el advenimiento del la medición del PSA en suero, hemos visto una disminución significativa en la mortalidad por CaP. A pesar de la reducción en el numero de muertes, la detección mediante el uso de PSA ha dado como resultado que muchos hombres con hiperplasia benigna o cáncer indolente sean sometidos a biopsias prostáticas innecesarias y al sobretratamiento, con el fin de salvar a un hombre de morir por CaP. En este escenario, los efectos de algunos tratamientos contra el cáncer de próstata pueden tener un impacto negativo en la calidad de vida de los pacientes y en ultima instancia conducen a una elevación en la morbilidad asociada a dichos tratamientos.

## **Planteamiento del problema.**

Clínicamente, los rasgos y síntomas que caracterizan a la HPB son casi indistinguibles de los del CaP, particularmente durante las primeras etapas del desarrollo de las lesiones prostáticas, lo cual dificulta el diagnostico acertado. Este problema es aun mayor si se considera que las estrategias de detección oportuna son invasivas, con una alta morbilidad asociada y no permiten establecer con certeza la diferencia entre CaP y la HPB. El lograr establecer dicha diferencia constituye un valioso aporte científico que permitirá identificar a los sujetos en riesgo de desarrollar CaP de alto riesgo y dar un mejor seguimiento medico a su evolución. Evitando, al mismo tiempo, que los pacientes con HPB sean sometidos a tratamientos dolorosos e innecesarios.

## **Hipótesis**

Los miRNAs detectados y cuantificados en orina, significativamente asociados al CaP, son marcadores biológicos que incrementan la capacidad predecir el riesgo en pacientes con sospecha de padecer CaP clínicamente significativo; y reducen el riesgo de biopsia en pacientes con hiperplasia benigna.

## **Objetivos**

### ***General***

Identificar y cuantificar miRNAs en orina significativamente asociados a CaP y evaluar su poder predictivo como marcadores biológicos para distinguir los casos de CaP clínicamente significativos de los de HPB; y evaluar su papel biológico en las células de CaP.

### ***Particulares***

- Estandarizar la utilización de la orina como fuente para el análisis de expresión de miRNAs en CaP e HPB.
- Identificar miRNAs en orina con cambios de expresión significativamente asociados con la presencia de CaP clínicamente relevante
- Evaluar el uso de los miRNAs en orina como predictores que contribuyen a la detección de CaP clínicamente significativo
- Evaluar la contribución los miRNAs en orina sobre el beneficio clínico de la disminución de biopsias en pacientes con HPB.
- Estudiar el papel biológico y funcional de miRNAs detectados en orina asociados a CaP.

## **Materiales y métodos**

### ***Cohorte de pacientes.***

En total, 143 pacientes varones mexicanos se inscribieron en este estudio en el Hospital General Manuel Gea González en la ciudad de México, entre enero de 2011 y diciembre de 2012, después de firmar el consentimiento informado aprobado por el comité de ética institucional. Todos los pacientes incluidos presentaban nódulos palpables o induración de la próstata (tacto rectal sospechoso, DRE) y PSA en la sangre superior a 2.5 ng/ml. Todos los pacientes mencionados fueron sometidos a una biopsia de próstata guiada por ecografía transrectal de 12 núcleos. Posteriormente, un patólogo experimentado evaluó los núcleos para determinar la presencia de cáncer. Para aquellas muestras patológicamente diagnosticados como CaP, el grado Gleason fue establecido. El grupo de CaP incluyó 73 pacientes con diagnóstico CaP de alto riesgo (puntuación de Gleason  $\geq 7$ ). El grupo de control estaba compuesto por 70 pacientes con HPB, donde se encontraron únicamente glándulas benignas y células prostáticas normales. Sólo se incluyeron pacientes sin diagnóstico previo de CaP y sin antecedentes de CaP familia. Se excluyeron los pacientes con síntomas de infección de las vías urinarias, trastornos de inmunodeficiencia, que presentaran neoplasia intraepitelial de alto grado o proliferación celular atípica, que estuvieran en tratamiento médico para la hiperplasia prostática. Los Datos clínicos y patológicos del paciente se resumen en la Tabla I.

**Tabla I. Características clínicas**

Variable	Total	CaP	HPB
No. pacientes (%)	143 (100.0)	73 (51.1)	70 (48.9)
Edad al diagnostico, años, media (rango)	66 (50 - 87)	68 (51-87)	65(50-82)
PSA total, ng/ml, media (rango)	12.8 (0.9 - 72.4)	15.7(5-72.4)	9.8(0.9-36)
PSA, ng/ml, No. pacientes (%)			
<4	2 (100.0)	0 (0.0)	2 (100.0)
>4 & <10	77 (100.0)	31 (39.7)	46 (60.3)
>10	66 (100.0)	42 (65.6)	22 (34.4)
PSA libre, %, media (rango)	14.4 (5 -38)	12.5 (5-28)	16 (5-38)
Gleason suma, No. pacientes (%)			
7		28 (38.3)	
8		33 (45.2)	
9		2 (2.7)	
10		10 (13.7)	
DRE sospechoso, No. pacientes (%)			
Si	68 (100.0)	47 (69.1)	21 (30.9)
No	75 (100.0)	26 (34.7)	49 (65.3)
Metástasis nodo linfático, No. pacientes (%)			
N0		63 (86.3)	
N1		3 (4.1)	
Desconocido		7 (9.6)	

### ***Procesamiento de muestras de orina y extracción de RNA.***

La primera porción de orina (30 ml) fue colectada de cada paciente, después de practicar masaje prostático. La orina se mezcló con 5 ml de solución RNAlater (Qiagen, Inc) un agente estabilizador de RNA. Todas las muestras se almacenaron a -80 °C antes de su procesamiento. Para el tratamiento posterior, las muestras se descongelaron en hielo y luego se centrifugaron a 5000 rpm. Una vez que se descartó el sobrenadante, el sedimento de orina se lavó dos veces con solución de fosfatos con pH=7.2 y se realizó la extracción de RNA de acuerdo con las instrucciones del fabricante RNeasy Mini Kit (Qiagen, Inc). El RNA se resuspendió en 15 ul de agua libre de RNAsas y se cuantificó espectrofotométricamente usando un sistema NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific)

### ***Preparación de cDNA y Pre-amplificación y PCR en tiempo real.***

#### ***Estudio exploratorio de expresión de miRNAs.***

La Reacción de retrotranscripción (RT) se llevó a cabo para cada muestra (8 de CaP y 8 de HPB), utilizando el kit de transcripción reversa TaqMan® microRNA y los primers Megaplex™ RT, pool human A v2.0, siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para cada reacción, 100 ng de RNA suspendidos en 3 ul fueron mezclados con 0.8 ul del “pool” de primers para RT (10x), 0.2 ul de desoxinucleótidos trifosfato (25 mM), 1.5 l de la transcriptasa reversa MultiScribe™ (50 U/ul), 0,8 ul de buffer para RT (10X), 0.1 ul de inhibidor de RNasa AB (20 U/l) y 0.2 l de agua libre de RNAsas. La reacción RT se llevó a cabo en el termociclador en las siguientes condiciones: (16 °C durante 2 min, 42 °C durante 1 min, y 50 °C durante 1 s) durante 40 ciclos y 85 °C durante 5 min. Posteriormente, una reacción de pre-amplificación para cada cDNA fue preparada mezclando 2.5 ul de producto de RT, 12.5 ul de solución MasterMix de pre-amplificación (2X), 2.5 ul de pool de primers de pre-amplificación Megaplex versión A (250 mM cada uno), y 7.5 ul de agua. La reacción de pre-amplificación se llevó a cabo en el termociclador en las siguientes condiciones: 95 °C durante 10 min, 55 °C durante 2 min, 72 °C durante 2 min, y (95 °C durante 15 s, 60 °C durante 4 min ) durante 14 ciclos. El producto pre-

amplificación se diluyó 4 veces mediante la adición de 75 ul de agua. Para la reacción de PCR en tiempo real, 9 ul del producto diluido de pre-amplificación, 450 ul de solución Master Mix TaqMan sin UNG y 441 ul de agua libre de RNAasa se mezclaron y se cargaron en el arreglo de baja densidad Human microARN TaqMan Low Density Array (TLDA), Este arreglo contiene sondas para 364 miRNAs más 20 sondas para controles endógenos. La reacción se llevo acabo en un equipo 7900HT Fast Real-Time PCR bajo las siguientes condiciones: 50 °C durante 2 min, 95 °C durante 15 seg y (95 °C durante 1 min, 60 °C durante 2 min) durante 40 ciclos.

#### *Análisis expresión individual de mRNAs y miRNAs.*

Después de la purificación de RNA total, se realizo la reacción de RT, empleando el kit utilizando el kit de transcripción reversa TaqMan® microRNA, antes mencionado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El cDNA resultante se utilizó para realizar una reacción qPCR utilizando ensayos individuales de expresión TaqMan para los miRNAs seleccionados y los datos se normalizaron contra el RNA nuclear pequeño RNU48. Para la cuantificación de mRNAs, el RNA total fue empleado para realizar una reacción de RT con uso del Kit Script cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific). El cDNA resultante se utilizó para qPCR utilizando los ensayos de expresión TaqMan (Applied Biosystems), y los datos se normalizaron contra el gen un GAPDH, empleado control endógeno. Las reacciones se llevaron acabo bajo las condiciones antes mencionadas en el mismo equipo 7900HT Fast Real-Time PCR. Todos los reactivos empleados para la preparación de cDNA de miRNAs y de mRNAs, reacción de pre-amplificación, y de qPCR son de la marca (Applied Biosystems), a excepción de donde se indique lo contrario.

#### ***Procesamiento de arreglos TLDA y tratamiento de datos de PCR en tiempo real.***

A fin de evitar un sesgo por grupo, decidimos evaluar la distribución de valores de Ct para las muestras de CaP y HPB, de forma independiente y conservar aquellos miRNAs que fueron detectados (es decir, tenían un Ct > 35) en más de

30% de las muestras en el grupo correspondiente. Los valores crudos de Ct se normalizaron mediante la aplicación de un procedimiento de normalización por rango invariable (rank-invariant set normalization). De forma breve, esta normalización calcula todos los conjuntos de miRNAs con rango invariable en comparaciones pareadas de cada muestra en contra de una pseudo-media. Los miRNAs con rango invariable se utilizan como una referencia para generar una curva de suavizado, que se aplica entonces a toda la muestra. La expresión diferencial de miRNAs se evaluó mediante una prueba de Mann-Whitney con la consideración de dos distribuciones diferentes para los grupos de HPB y CaP. Posteriormente, una prueba de Benjamin y Hochberg (*False discovery rate*, FDR) se aplicó para controlar por la tasa de falsos positivos. Los miRNAs con un cambio de expresión  $>2$  y un valor-p ajustado (FDR)  $<0,05$  fueron considerados como diferencialmente expresados. Para los ensayos individuales, se utilizó el método comparativo Ct para determinar la expresión diferencial de miRNAs [54]. En breve, el valor de Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) para cada miRNAs de interés se calculo restando la media geométrica de los controles RNU48 y MammU6, y el cambio relativo de expresión entre CaP y HPB se calculó como  $2^{- (\Delta CtPCa- \Delta CtHPB)}$ . Un valor de  $p <0,05$  fue considerado estadísticamente significativo, calculado mediante prueba de Mann-Whitney. Para las puntuaciones de miR-100 y miR-200b, se calculó la media geométrica de los valores crudos de Ct de ambos miRNAs y se resto la media geométrica de MammU6 y RNU48.

### ***Cultivo Celular.***

Las Líneas celulares LNCaP y PC3 se obtuvieron de American type culture collection (ATCC). La Línea LNCaP se cultivo en medio RPMI 1640 y la línea PC3 en medio DMEM, ambos suplementados con suero fetal bovino (FBS, por sus siglas en ingles) al 10%.

### ***Transfección de miRNAs sintéticos.***

Para estudiar la función biológica y molecular de miR-100, se realizo un experimento de ganancia de función de dicho miRNA. Brevemente,  $2 \times 10^5$

células en medio RPMI 1640 y se cultivaron por 36 horas, hasta llegar a una confluencia de 70% - 80%. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio reducido en suero Optimem (Gibco) y las células fueron transfectadas con un oligonucleótido sintético de miR-100 (mimic) (Ambion, PM12328 Cat. AM17100) a una concentración final de 30nM, usando el agente de transfección NeoFX (Ambion). Como control negativo, se transfectó un oligonucleótido inespecífico, (*Negative Control 1*, Ambion, AM17110) el cual contiene un secuencia aleatoria validada en cuanto a su ausencia de efecto biológico. Las células fueron incubadas por 24 y 48 horas adicionales. Los ensayos fueron realizados por triplicado.

#### ***Ensayo de viabilidad celular.***

La viabilidad celular fue evaluada mediante el método de MTT, empleando el kit comercial MTT Cell Proliferation Assay (ATCC) siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. De forma breve, las células LNCaP derivadas de las diferentes condiciones de tratamiento se incubaron durante 2 hrs con la solución de MTT a 37°C. Posteriormente, se DMSO para disolver los cristales de formazan resultantes de la reducción del MTT. Finalmente, la absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 570nm. La concentración de formazan es proporcional a la cantidad de células viables. Cada medición se realizó por sextuplicado.

#### ***Ensayo de migración celular***

Para evaluar el efecto de miR-100 sobre el potencial migratorio de LNCaP. Se realizó un ensayo en sistemas de cámaras con membranas semipermeables “transwell” (Corning) como se describe a continuación.  $1 \times 10^5$  células se sembraron en cámaras “transwell” y se incubaron por 24hrs a 37°C. A continuación las células se fijaron con etanol al 100% a -20°C durante 1hr. Posteriormente, las células fueron teñidas con una solución de cristal violeta al 5 % por 15 minutos. Las células remanentes en la capa superior de la membrana fueron removidas cuidadosamente con un hisopo y la membrana se lavo con

ácido acético al 1% y la absorbancia fue medida espectrofotométricamente a 570nm.

### ***Ensayo de gen reportero.***

La secuencia de hibridación de miR-100 dentro de la región 3' UTR de SMARCA5 (WT) fue sintetizada y clonada dentro del plásmido pscheck-2 rio abajo del gen que codifica para la luciferasa de Renilla. En los extremos de dicha secuencia se agregaron sitios de corte para la enzimas de restricción XHOL y NOTL para su clonación dentro del plásmido y un sitio único de corte para SACL en la región central para identificación de clonas con plásmido conteniendo el inserto (Anexo I). Una versión del inserto con mutaciones (Mut) en tres nucleótidos dentro la región semilla fue generada también. La presencia del inserto fue verificada mediante secuenciación sanger de los plásmidos seleccionados.

El plásmido conteniendo el inserto (WT o Mut) fue transfectado transitoriamente en la línea celular LNCaP utilizando lipofectamina 2000 (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las células fueron colectadas 24hrs post-transfección. Para medir la actividad de la luciferasa se empleó el kit Dual luciferase reporter Assay (Promega) leyendo la muestras en un luminómetro GloMax® 20/20 (Promega). La actividad de la luciferasa de Renilla, empleada como gen reportero se normalizo contra la intensidad de señal obtenida de la luciferasa de firefly, empleada como corrección de la eficiencia de transfección del plásmido Todos los experimentos se realizarán por triplicado.

### ***Análisis de expresión global en células transfectadas con miR-100***

Para evaluar el efecto biológico de la sobre-expresión de miR-100 sobre la expresión global de genes en la línea celular LNCaP, se empleo la plataforma de microarreglos de Affymetrix Human Gene 1.0 ST. Dicha plataforma interroga 28,869 genes. Brevemente, las células transfectadas con el mimic de miR-100 y con el control negativo fueron colectadas a las 48 hrs pos-transfección y el RNA total fue purificado de la manera descrita anteriormente. A continuación, la síntesis de DNA, amplificación, hibridación y marcaje se realizaron de acuerdo al

protocolo del fabricante (Affymetrix WT Sense Target labeling assay Manual, GeneChip Mouse Gene 1.0 ST Array). El proceso de lavado y marcaje se realizó en una estación GeneChip Fluidics Station 450. Finalmente, la lectura de microarreglos se realizó en el escáner The GeneChip® Scanner 3000 7G (Affymetrix, Santa Clara CA, USA). Se realizaron 3 replicas biológicas de cada microarreglo y el procesamiento se llevó a cabo en la unidad de microarreglos del INMEGEN.

### ***Análisis bioinformático de datos de microarreglos.***

Los archivos CEL que contienen los valores de intensidad de fluorescencia, fueron cargados en el ambiente de R y fueron procesados con paquetes de análisis de Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>). Los valores de intensidad de señal fueron corregidos por el algoritmo robust multiarray analysis (RMA) y sumariados mediante las funciones implementadas en el paquete *affy*. Se realizó una normalización por cuantiles del conjunto de muestras y los valores de expresión se transformaron logarítmicamente usando las funciones del paquete *limma*. Para la selección de genes diferencialmente expresados, se realizó una comparación mediante una prueba T con varianza moderada y un ajuste estadístico para el control de falsos-positivos por múltiples hipótesis (FDR), mediante el método *Benjamin-Hoechberg*. Los genes con tasa de expresión diferencial mayor a 1.5 ( $\log FC > 0.6$ ) y un  $FDR \geq 0.05$  fueron seleccionados.

### ***Análisis de anotación funcional de genes***

Para identificar procesos y vías biológicas asociadas a la regulación génica ejercida por miR-100, realizamos un análisis de enriquecimiento de genes usando la base y el algoritmo DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), el cual contiene implementadas herramientas para la búsqueda, visualización e integración de anotaciones génicas. Se realizó un análisis centrado en la identificación de términos “Gene ontology” (GO), dentro de la colección anotaciones de procesos biológicos (GO\_BP). Los procesos con un  $FDR < 0.1$  fueron considerados como estadísticamente enriquecidos.

### ***Análisis estadístico.***

Para evaluar la contribución de los factores predictores individuales de CaP sobre el resultados de la biopsia (p. ej. Positiva o negativa), se llevo acabo una regresión logística multivariable. La oportunidad relativa (odds ratio, OR) y los intervalos de confianza al 95% correspondientes (IC al 95%) se calcularon para cada predictor. Para evaluar el rendimiento diagnóstico de los factores: PSA, PSA libre%, los niveles de miRNA en la orina y el modelo combinado; se llevó a cabo un análisis de curva ROC (receiver-operating characteristic) [55]. El área bajo la curva (AUC) con IC al 95% fue calculada utilizando el método “De Long”. Para evaluar las diferencias significativas en el poder de predicción entre las distintas curvas ROC, se aplicó una prueba Chi-cuadrada. Para evaluar el beneficio clínico de los modelos probados, se utilizó un análisis de curva de decisión (DCA) [56, 57]. La DCA calcula el beneficio neto de una intervención clínica para diferentes umbrales de probabilidad, es decir, la mínima probabilidad esperada de un diagnóstico positivo de CaP en la que el médico junto con el paciente opta por una biopsia. En pocas palabras, la DCA asigna importancia al valor relativo de los beneficios (verdaderos positivos) respecto a los riesgos (falsos positivos). El procesamiento de datos y análisis estadísticos se realizaron con paquetes analíticos de la suite publica de Bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>) en R y GraphPad Prism V 5.0.

## **Resultados**

### ***Los miRNAs son moléculas estables y se pueden medir con robustez en muestras de orina.***

Como prueba de principio acerca de la solidez de nuestro enfoque para evaluar miRNAs como marcadores en orina, decidimos probar su patrón de degradación (18). Se realizó un curso de tiempo a 37 °C grados. A lo largo del curso de tiempo, se retiraron alícuotas de orina en los puntos de tiempo indicados y subsecuentemente, se llevo a cabo la extracción de RNA y la reacción de RT-qPCR. Se midió la expresión de miR-15a y miR-21, dos miRNAs fácilmente

detectables en nuestro conjunto de muestras de orina. Al mismo tiempo, se midió la expresión de dos mRNA, GAPDH y KLK3. Los niveles de mRNA de GAPDH y KLK3 mostraron una rápida disminución en el transcurso del tiempo. En contraste, los niveles de los dos miRNAs permanecieron relativamente constantes (Gráfica 4A). Para poner a prueba la robustez de nuestro método para medir los niveles de miRNA en muestras de orina, la toma de alícuotas, por triplicado, se realizó simultáneamente a partir de tres muestras de orina diferentes dentro de nuestra cohorte de pacientes, dos del grupo de HPB y uno del de CaP. Los valores de Ct obtenidos fueron altamente reproducibles entre repeticiones del mismo donante de muestra y entre las diferentes muestras, como se puede observar por los coeficientes de CV (CV intra-replica <5% y CV entre-replicas <10,18%) (Figura 4B). Estos resultados indican que los miRNAs son moléculas estables en muestras de orina, que pueden ser detectados y medidos con confianza

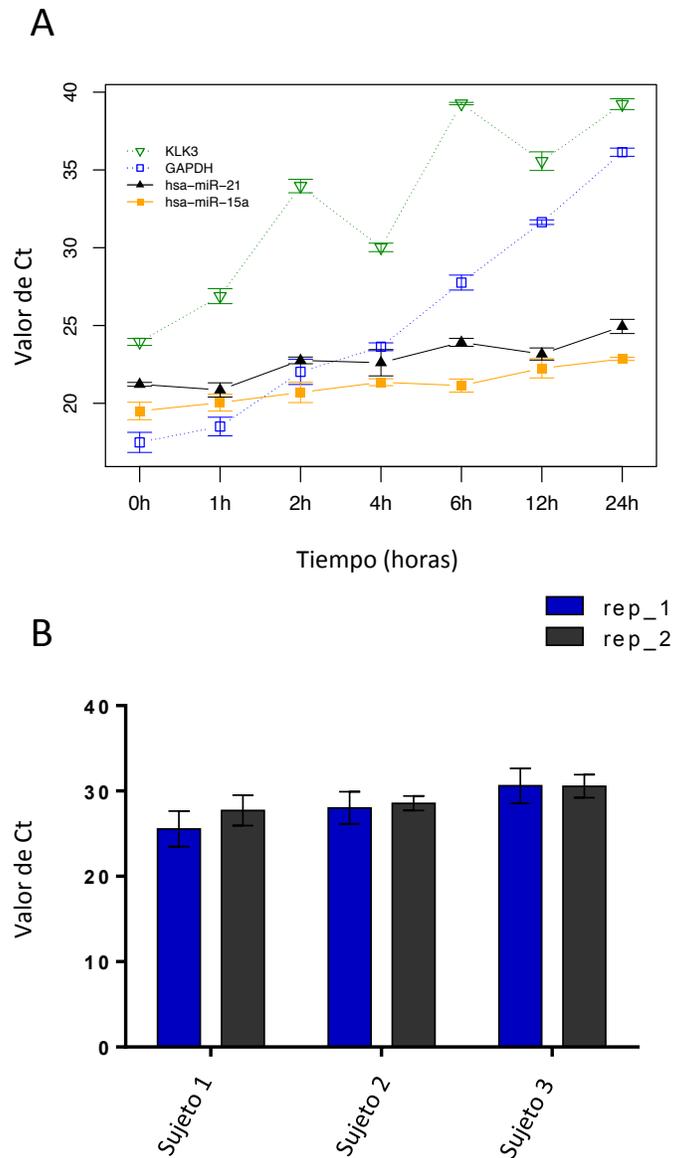


Figura 4. Estabilidad miARN y la medición de sus niveles en muestras de orina. A) Dinámica de tiempo degradación de. Para cada gen o miRNA, las diferencias en los valores de Ct se representan para los puntos de tiempo indicados. Cada medición se realizó por triplicado. B) La reproducibilidad de las mediciones de niveles de miRNAs en muestras de orina de HPB y CaP pacientes. Un ensayo de RT-qPCR se realizó a partir del RNA purificado a partir de muestras de orina. Las graficas de barras muestran el promedio y la desviación estándar de los valores de Ct para dos réplicas diferentes la misma muestra de orina. Cada medición se realizó por triplicado.

### ***Identificación de miRNAs alterados significativamente en cáncer de próstata.***

Después de confirmar la viabilidad de nuestro enfoque para medir con confianza los niveles de miRNAs en muestras de orina, cuantificamos los niveles de expresión de 364 miRNAs en 8 muestras de orina CaP y 8 de HPB. De forma interesante, los niveles globales de miRNAs fueron significativamente mayores en el grupo de CaP (102 miRNAs detectados) en comparación con el grupo de HPB (78 miRNAs detectados) (Figura 2A). De los miRNAs detectados, 73 fueron compartidos entre ambos grupos (Figura 2B). Este conjunto fue retenido para su posterior procesamiento y para el análisis de expresión diferencial. A la fecha no existe un método estándar para la normalización de datos de expresión de miRNAs en muestras de orina, por lo que decidimos probar diferentes estrategias de normalización.

se aplicó una normalización por conjunto de rangos invariables (Rank-invariant set) a los datos crudos de Ct, ya que mediante este método se obtuvo el mejor ajuste de distribución de Ct para hacer comparables los dos grupos de muestras, con la excepción de la normalización por cuantiles, sin embargo, este último método podría forzar excesivamente el ajuste de distribución, lo que conllevaría el riesgo de perder eliminar miRNAs con variabilidad biológica de interés. La comparación de los niveles de expresión normalizados reveló un conjunto de 19 miRNAs que mostraron diferencias significativas entre CaP y HPB (Figura 6 y Tabla II). De este grupo, 11 miRNAs se encontraron sobre-expresados, mientras que 8 mostraron una expresión reducida en CaP. Los principales miRNAs con expresión diferencial incluyen: let-7c, miR-193b, miR-100, miR-200b, miR-200c, miR-20a, miR-204, miR-195, miR-150 y let-7b. Este conjunto incluye a los 10 miRNAs que mostraron los cambios de mayor magnitud y con mayor significancia estadística (Tabla II), por lo tanto fueron seleccionados para su posterior validación en 73 muestras de CaP y 70 muestras de BPH, incluyendo las aquellas utilizadas para la exploración inicial. Logramos confirmar cambios

de expresión significativos para miR-193b, Let-7b, Let-7c, miR-100, miR-200b, miR-200c, miR-195 y miR-150 (Tabla III)

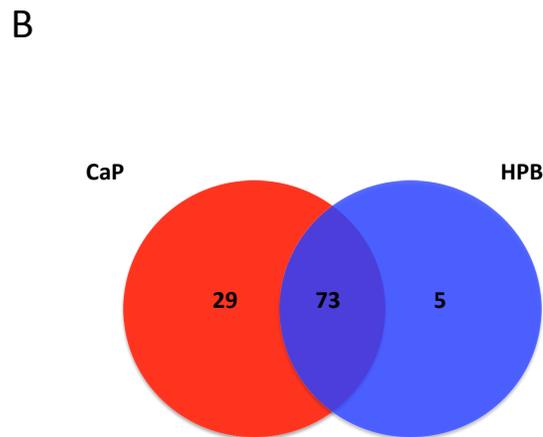
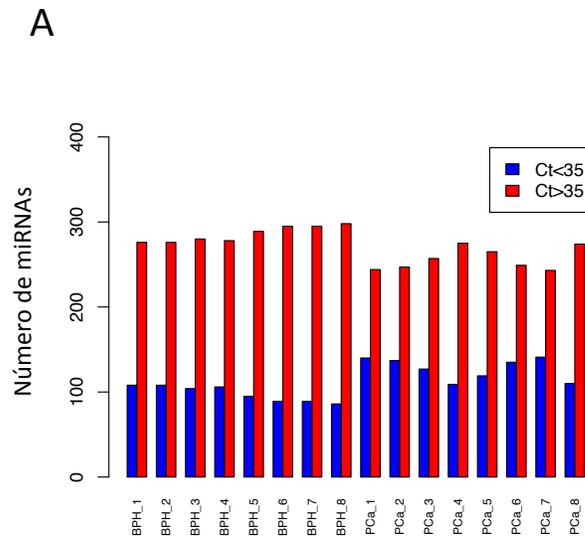


Figura 5. Categorías de miRNAs en cada muestra después de la filtración por Ct. A) Los valores crudos de Ct > 35 se consideraron no detectados. El número de miRNAs detectados (Azules) y no detectados (rojo) por muestra se representan en la grafica de barras. B) diagrama de Venn que muestra el número de miRNAs detectados en al menos 7 de las muestras del grupo de CaP únicamente (conjunto rojo) , al menos 7 del grupo de HPB (conjunto azul) o los detectados en al menos 15 muestras de ambos grupos (intersección sombreada)

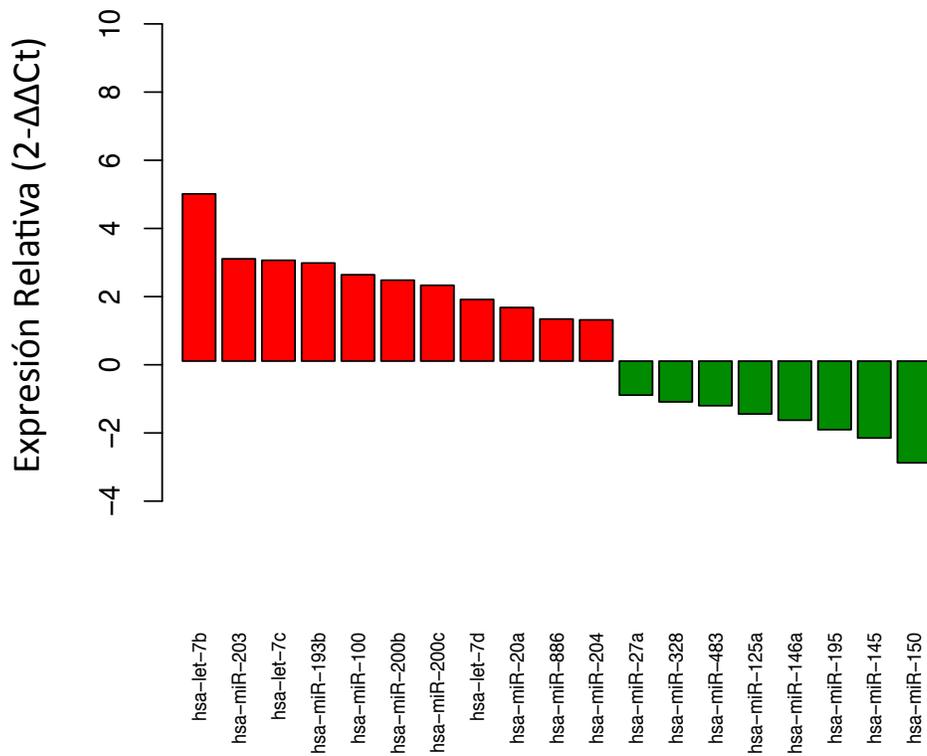


Figura 6. miRNAs diferencialmente expresados en el estudio de exploración. La grafica de barras representa las tasa de cambio de aquellos miRNAs significativamente sobre o sub-expresados en CaP (n=9) en comparación con HPB (n=8). Las diferencias significativas se determinaron mediante una prueba de Mann Whitney con un valor-p ajustado (FDR) <0,05.

**Tabla II. Lista de miRNAs con cambios de expresión diferencial en el estudio exploratorio inicial.**

miRNA	Promedio de la expresión normalizada en las muestras de CaP ( $\Delta$ Ct)	Promedio de la expresión normalizada en las muestras de HPB ( $\Delta$ Ct)	<sup>a</sup> $\Delta\Delta$ Ct	<sup>b</sup> FCh (2- $\Delta\Delta$ Ct)	Valor del estadístico MW.	Valor-p	<sup>c</sup> FDR (Benjamin & Hochberg)
hsa-let-7c	28.2686	31.2263	-2.9576	7.7685	W = 63	0.0014	*0.0158
hsa-miR-193b	25.1538	28.0316	-2.8778	7.3503	W = 64	0.0009	*0.0158
hsa-miR-100	24.0737	26.6076	-2.5338	5.7910	W = 62	0.0019	*0.0158
hsa-miR-200b	28.2449	30.6193	-2.3743	5.1850	W = 64	0.0009	*0.0158
hsa-miR-200c	25.4702	27.6941	-2.2239	4.6716	W = 64	0.0009	*0.0158
hsa-miR-20a	29.5232	31.0953	-1.5722	2.9735	W = 62	0.0019	*0.0158
hsa-miR-204	28.2669	29.4762	-1.2093	2.3122	W = 62	0.0019	*0.0158
hsa-miR-195	32.4039	30.3915	2.0124	0.2479	W = 2	0.0019	*0.0158
hsa-miR-150	30.2120	27.2267	2.9853	0.1263	W = 0	0.0009	*0.0158
hsa-let-7b	24.3938	29.2988	-4.9049	29.9596	W = 61	0.0027	*0.0196
hsa-miR-125a-5p	31.0526	29.5005	1.5521	0.3410	W = 4	0.0039	0.0257
hsa-miR-203	25.7006	28.7009	-3.0004	8.0020	W = 59	0.0054	0.0281
hsa-miR-328	29.2099	28.0126	1.1973	0.4361	W = 5	0.0054	0.0281
hsa-miR-146a	29.4551	27.7203	1.7348	0.3005	W = 5	0.0054	0.0281
hsa-miR-886-3p	28.5041	29.7386	-1.2344	2.3529	W = 58	0.0074	0.0300
hsa-miR-27a	31.0739	30.0757	0.9982	0.5006	W = 6	0.0074	0.0300
hsa-miR-483-5p	30.5965	29.2880	1.3085	0.4037	W = 6	0.0074	0.0300
hsa-miR-145	30.8175	28.5610	2.2565	0.2093	W = 6	0.0074	0.0300
hsa-let-7d	30.0856	31.8934	-1.8079	3.5013	W = 57	0.0101	0.0368

- $\Delta\Delta$ Ct: Cambio de expresión en escala Log2 en CaP en comparación con BPH, calculado por el método comparativo de Ct.
- FCh (2- $\Delta\Delta$ Ct): Proporción del cambio de expresión relativa en escala lineal entre CaP y BPH, calculado por el método comparativo de Ct.
- La lista se ordeno con base en el valor de FDR (FDR) <0.05
- \*Identificación de los 10 miRNAs seleccionados para su validación en un mayor numero de muestras de CaP y HPB.

**Tabla III. Resultados de la validación de miRNAs seleccionados en un mayor número de muestras**

miRNA	Promedio de la expresión normalizada en las muestras de CaP ( $\Delta$ Ct)	Promedio de la expresión normalizada en las muestras de HPB ( $\Delta$ Ct)	<sup>a</sup> $\Delta\Delta$ Ct	<sup>b</sup> FCh ( $2^{-\Delta\Delta$ Ct)	Valor-p
MammU6 <sup>a</sup>	-0.1261	0.0281	-0.1542	1.1128	1.14E-01
RNU48 <sup>a</sup>	0.1426	-0.0090	0.1516	0.9002	1.14E-01
hsa-miR-193b	2.8863	3.9914	-1.1051	2.1511	9.10E-02
<b>hsa-let-7c</b>	<b>3.2002</b>	<b>4.2061</b>	<b>-1.0058</b>	<b>2.0081</b>	<b>3.49E-02</b>
<b>hsa-let-7b</b>	<b>2.6407</b>	<b>3.9059</b>	<b>-1.2652</b>	<b>2.4035</b>	<b>2.26E-02</b>
<b>hsa-miR-100</b>	<b>4.2782</b>	<b>5.9839</b>	<b>-1.7058</b>	<b>3.2620</b>	<b>5.52E-05</b>
<b>hsa-miR-200b</b>	<b>2.2534</b>	<b>4.6239</b>	<b>-2.3705</b>	<b>5.1713</b>	<b>2.94E-04</b>
has-miR-204	5.6469	5.0981	0.5487	0.6836	3.69E-01
<b>hsa-miR-200c</b>	<b>2.7771</b>	<b>4.1767</b>	<b>-1.3995</b>	<b>2.6382</b>	<b>4.60E-04</b>
hsa-miR-20a	5.5777	6.5679	-0.9901	1.9864	7.53E-02
<b>hsa-miR-195</b>	<b>8.9949</b>	<b>7.6015</b>	<b>1.3934</b>	<b>0.3807</b>	<b>1.67E-02</b>
<b>hsa-miR-150</b>	<b>6.6473</b>	<b>4.9470</b>	<b>1.7003</b>	<b>0.3077</b>	<b>1.43E-02</b>

- a. Lista ordenada con base en el valor-p determinado por una prueba de Wilcoxon para dos muestras.
- b. En negritas, se resaltan los miRNAs cuyo cambio de expresión fue validado independientemente.

***Asociación de los niveles en orina de miR-100 y miR-200b con el resultado de biopsia de próstata***

Los niveles de expresión de miR-100 y miR-200b en la orina mostraron el aumento más significativo en los pacientes con biopsia (CaP) en comparación con los pacientes con biopsia negativa (HPB). Debido a que nuestra cohorte está compuesta casi en su totalidad por las muestras de CaP con puntuación de

Gleason de 7 o superior, no pudimos evaluar la diferencia entre el CaP indolente y el más agresivo. Encontramos una mínima correlación positiva significativa entre los niveles de orina de miR-100 y miR-200b (Spearman = 0,18; p-valor = 0,0355) y una puntuación única se calculó para ambos miRNAs (puntaje de miR-100/200b) para su posterior análisis. No encontramos ninguna asociación significativa ni correlación entre la expresión de ninguno de los miRNAs con la edad, DRE, los niveles de PSA o % de PSA libre. En toda la cohorte, el puntaje de miR-100/200b mostró un valor significativamente mayor en los pacientes con resultados de biopsia positiva (Figura 7A). A continuación, decidimos comparar el puntaje de miR-100/200b en el subgrupo de pacientes con niveles de PSA entre 4 y 10 ng/ml, el rango de los niveles de PSA conocidas como la zona gris. La comparación mostró que el puntaje de miR-100/200b también fue mayor en los pacientes con resultados positivos en la biopsia, en un nivel significativo (Figura 7B).

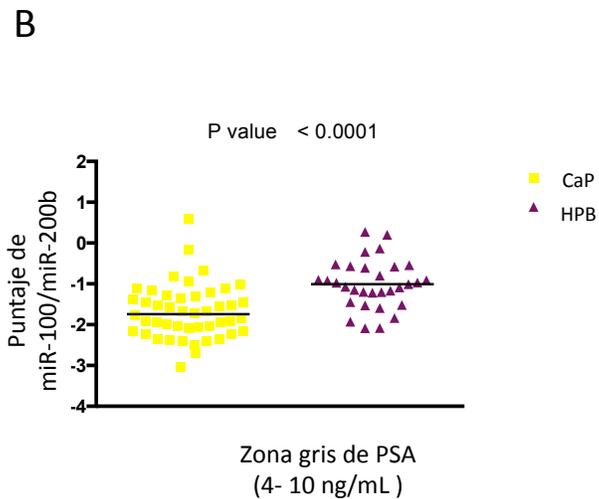
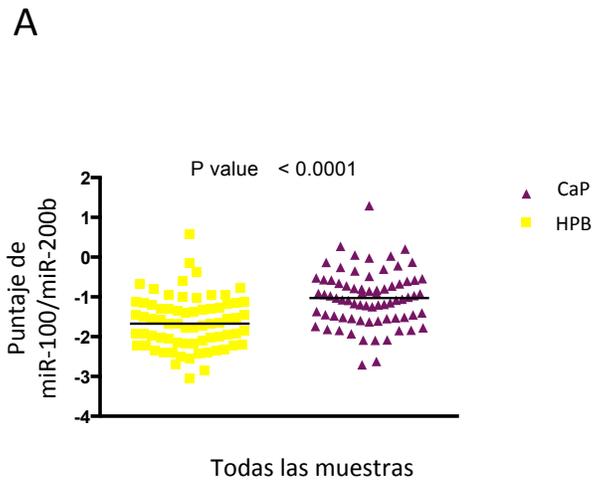


Figura 7. Asociación de los niveles de miR-100 y miR-200b en orina con los resultados de biopsia de próstata. Comparación de el puntaje de miR-100/200b entre los pacientes con CaP y HPB en (A) la cohorte entera y en B) solo el subgrupo con niveles de PSA dentro de la zona gris.

### ***Evaluación del rendimiento diagnóstico del puntaje de miR-100/200b en orina sobre el resultado de biopsia de próstata***

La edad, el PSA, el % de PSA libre, DRE el puntaje de miR-100/200b se evaluaron mediante un análisis de regresión logística univariable y multivariable para probar su valor como predictores de CaP en resultados de la biopsia (Tabla IV). Para toda la cohorte, todas las variables fueron predictores significativos individuales de CaP en un modelo de regresión logística univariable, con DRE teniendo la precisión más alta en la predicción, seguido de el puntaje de miR-100/200b, PSA, la edad y el% PSA libre. A continuación, desarrollamos un modelo de regresión logística multivariable que comprende la Edad, el PSA, el % de PSA libre y DRE (modelo base), para predecir la presencia de CaP. Al incorporar el puntaje de miR-100/200b dentro del modelo base (modelo combinado) se logro una ganancia de 6,3% en la precisión de la predicción. El análisis de curva ROC demostró que el modelo combinado superó significativamente la capacidad del PSA (valor-p <0,001) y el modelo de base (valor-p = 0,010) para discernir entre pacientes con CaP y HPB, con una sensibilidad mayor ( 0,822) y especificidad (0.814) en el valor de corte óptimo de los coeficientes estimados (Tabla IV y Figura 8A). Los resultados del análisis de DCA mostraron que, a través de un rango de umbrales de probabilidades que son de interés (de 10% a 50%) el mayor beneficio neto se consigue utilizando el modelo combinado (Figura 9A). Por ejemplo, para un umbral de probabilidad de 16%, el modelo combinado alcanza un beneficio neto de 0,43, lo que significa que la realización de una biopsia basado en este modelo es equivalente a la estrategia en la que se encontrarían 43 cánceres por cada 100 pacientes sin llevar a cabo ninguna biopsia de manera innecesaria. En este umbral de probabilidad hay una reducción neta de 7 biopsias innecesarias por cada 100 pacientes.

**Tabla IV. Razón de oportunidades (OR) ajustado y resultados del análisis ROC para los modelos de regresión logística univariable y multivariable univariable en la cohorte entera**

Regresión logística univariable								
Variable	OR	(95%CI)	valor-p	Exactitud de predicción, %	AUC (CI)	Sensibilidad	Especificidad	valor-p (vs PSA)
Edad	1.06	1.01-1.11	0.02	59.4	0.613 (0.521-0.705)	0.36	0.84	0.312
PSA	1.08	1.03-1.14	0.003	67.8	0.681 (0.593-0.769)	0.70	0.66	-
% PSA libre	0.884	0.823-0.942	<0.001	68.5	0.710 (0.623-0.796)	0.62	0.76	0.628
DRE	4.22	2.12-8.64	<0.001	67.1	0.672 (0.595-0.749)	0.64	0.70	0.873
miR-100/200b	1.62	1.32-2.05	<0.001	75.5	0.738 (0.652-0.823)	0.70	0.81	0.391
Regresión logística multivariable								
Modelo Base				Modelo Base + miR-100/200b				
Variable	OR	(95%CI)	valor-p		OR	(95%CI)	valor-p	
Edad	1.09	1.03-1.15	0.002		1.1	1.04-1.17	0.002	
PSA	1.06	1.01-1.12	0.033		1.09	1.03-1.17	0.01	
% PSA libre	0.876	0.809-0.94	<0.001		0.886	0.817-0.951	0.002	
DRE	3.58	1.64-8.08	0.002		4.12	1.75-10.3	0.002	
miR-100/200b	-	-	-		1.81	1.4-2.46	<0.001	
Exactitud de predicción, %	75.5				81.8			
AUC (CI)	0.816 (0.744-0.887)				0.876 (0.819-0.933)			
Sensibilidad	0.685				0.822			
Especificidad	0.828				0.814			
valor-p (vs PSA)	0.005				<0.001			

OR= razón de oportunidades; CI= intervalo de confianza; AUC= area bajo la curva;

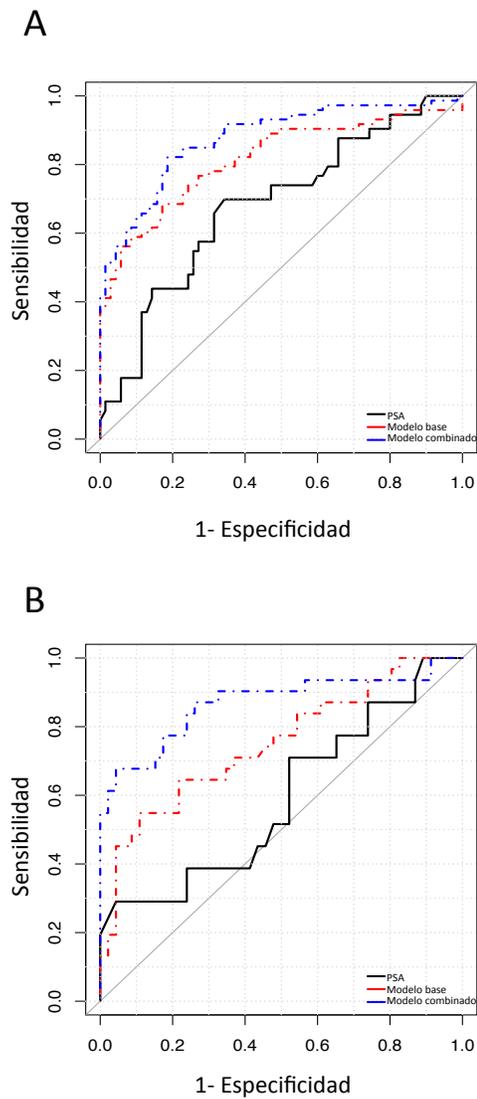


Figura 8. Análisis ROC para los modelos de predicción en (A) la cohorte entera y en (B) el subgrupo de pacientes con niveles de PSA en la zona gris. El PSA se utiliza como referencia para la comparación. El modelo básico incluye las variables: edad, PSA, % de PSA libre y DRE. El modelo combinado es el modelo básico, más el puntaje de miR-100/200b.

***Evaluación del rendimiento diagnóstico del puntaje de miR-100/200b en orina sobre el resultado de biopsia de próstata en la zona gris de PSA***

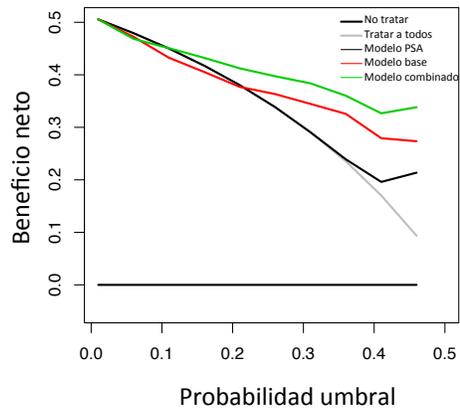
Al evaluar el subgrupo de pacientes en la zona gris, la edad y el puntaje de miR-100/200b fueron factores pronósticos independientes de CaP, según lo determinado por el análisis de regresión logística univariable. El análisis de regresión logística multivariable mostró que el modelo combinado mejora significativamente la predicción de CaP, en comparación con cualquiera de las variables solas, y tiene una ganancia en la precisión de la predicción de 9,1%, en comparación con el modelo de base (Tabla V). El análisis ROC indicó que el rendimiento del modelo combinado en la predicción de los casos CaP fue significativamente superior al PSA (valor-p <0,001). En comparación con el modelo base, su rendimiento es también significativamente mayor (valor-p = 0,009). (Figura 8B). Al realizar el análisis de DCA observamos que el modelo combinado proporciona un mayor beneficio neto para los hombres con riesgo adverso que optarían una por biopsia en un rango de umbral de probabilidad razonable entre el 10% y el 50% en comparación con el uso de PSA solo o con el modelo base. (Figura 9B). En un umbral de probabilidad de 16% hay una reducción de 8 biopsias innecesarias por cada 100 pacientes.

**Tabla V. Razón de oportunidades (OR) ajustado y resultados del análisis ROC para los modelos de regresión logística univariable y multivariable univariable en la zona gris de PSA.**

Regresión logística univariable								
Variable	OR	(95%CI)	valor-p	Exactitud de predicción, %	AUC (CI)	Sensibilidad	Especificidad	valor-p (vs PSA)
Edad	1.07	1.01-1.14	0.038	68.8	0.642 (0.512-0.771)	0.355	0.913	0.616
PSA	1.28	0.956-1.75	0.102	68.8	0.590 (0.456-0.724)	0.29	0.957	1
% PSA libre	0.917	0.832-0.997	0.059	74	0.691 (0.558-0.825)	0.645	0.804	0.286
DRE	1.14	0.43-2.97	0.794	54.5	0.514 (0.405-0.624)	0.355	0.674	0.427
miR-100/200b	2.61	1.72-4.45	<0.001	80.5	0.827 (0.723-0.932)	0.774	0.826	0.00714
Regresión logística multivariable								
	Modelo Base				Modelo Base + miR-100/200b			
Variable	OR	(95%CI)	valor-p		OR	(95%CI)	valor-p	
Edad	1.12	1.04-1.21	0.005		1.09	0.998-1.2	0.0664	
PSA	1.4	1-2.01	0.057		1.37	0.915-2.16	0.141	
% PSA libre	0.891	0.8-0.974	0.019		0.919	0.815-1.02	0.125	
DRE	0.967	0.313-2.9	0.952		0.83	0.221-2.94	0.775	
miR-100/200b	-	-	-		2.46	1.58-4.4	<0.001	
Exactitud de predicción, %	75.3				84.4			
AUC (CI)	0.749 (0.634-0.863)				0.868 (0.776-0.961)			
Sensibilidad	0.548				0.677			
Especificidad	0.891				0.956			
valor-p (vs PSA)	0.037				<0.001			

OR= razón de oportunidades; CI= intervalo de confianza; AUC= area bajo la curva

A



B

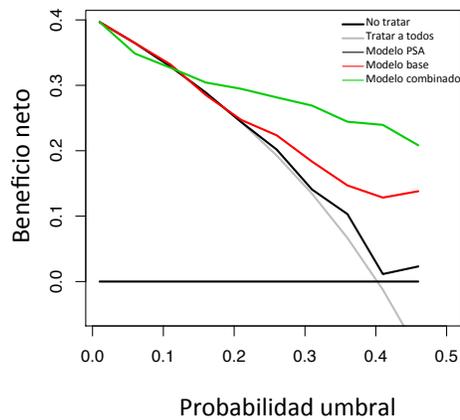


Figura 9. Curva de decisión de análisis del efecto de los modelos de predicción en la detección del CaP. A) El beneficio neto se representa frente a varios umbrales de probabilidad de someterse a una biopsia para los pacientes en toda la cohorte. B) el beneficio neto se representa frente a diversos umbrales de probabilidad de someterse a una biopsia para los pacientes en el subgrupo de pacientes con niveles de PSA en la zona gris.

### ***Caracterización de la expresión de miR-100 y evaluación funcional de su sobre-expresión en células de CaP***

Como primer paso en el estudio funcional de miR-100 en células de CaP, decidimos caracteriza su expresión en la línea celular LNCaP y el cultivo epitelial normal de próstata RWPE-1. LNCaP es una línea celular derivada de un nodo metastásico linfático y presenta sensibilidad a los andrógenos, mientras que RWPE-1 es un tipo de célula responsiva a andrógenos derivada del epitelio normal de próstata. El análisis de expresión relativa demostró que miR-100 esta sub-expresado en LNCaP, mostrando una reducción significativa de sus niveles de al menos 5 veces en comparación con RWPE-1 (Figura 10A). Debido a que LNCaP mostro la menor expresión de miR-100, decidimos realizar ensayos de ganancia de función en dicha línea, mediante la expresión exógena de miR-100. La eficiencia de nuestro método de sobre-expresión fue evaluado por la medición de la expresión de miR-100, 24 y 48 horas después de la transfección. Observamos el incremento de los niveles de miR-100 en comparación con el control negativo en una tasa de cambio de 3.5 veces (Figura 10B) Para confirmar dicho resultado, a las 48 horas evaluamos el efecto de la sobre-expresión de miR-100 sobre los niveles del transcrito de SMARCA5 (un blanco molecular de miR-100 experimentalmente validado). Adicionalmente, mediante un ensayo de gen reportero evaluamos el efecto directo de miR-100 sobre SMARCA5. Como se observa en la Figuras 10C y 10D, hay una reducción significativa la abundancia del transcrito y de la actividad relativa del gen reportero de luciferasa cuando miR-100 se sobre-expresa, en comparación con el control negativo (Figura 10C).

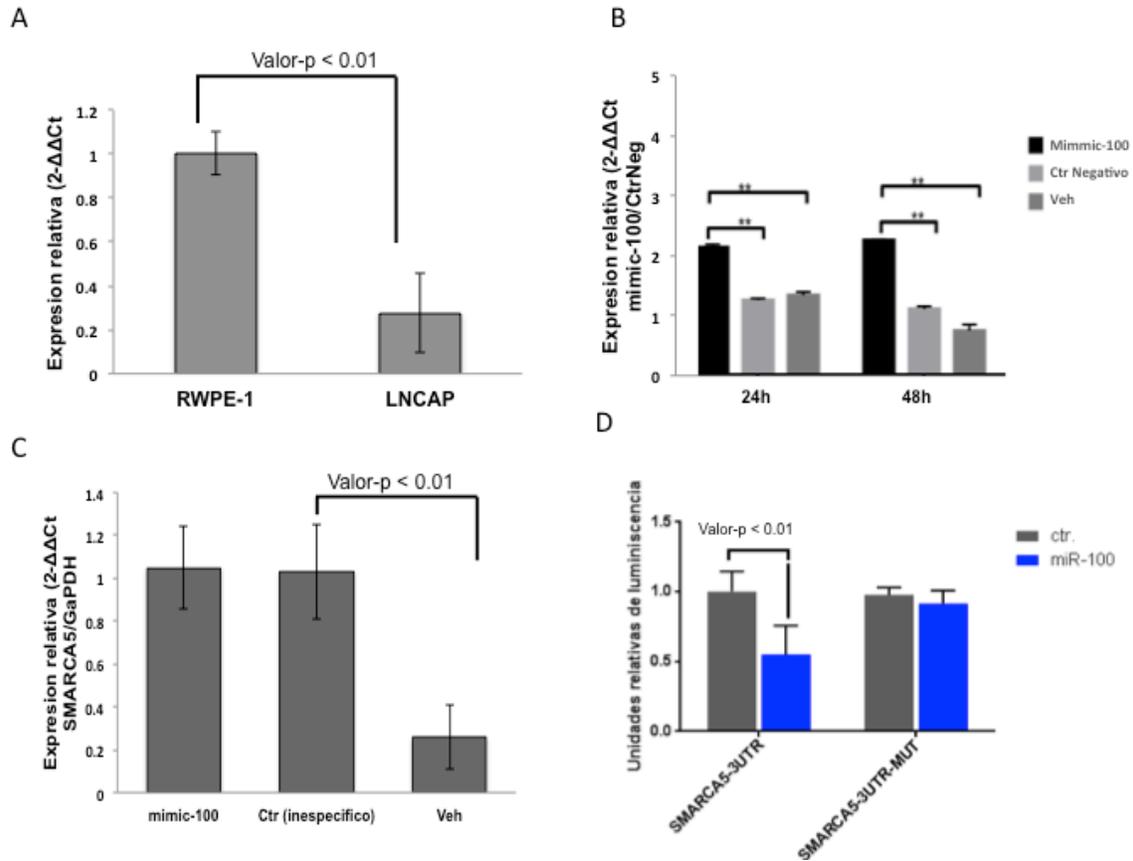


Figura 10. Expresión de miR-100 y evaluación de la transfección de miR-100 en células de CaP. A) Expresión relativa de miR-100 en LNCaP y RWPE-1. la expresión relativa de miR-100 fue calculada por el método comparativo de Ct, empleando como control endógeno al RNA nucleolar RNU48. B) Las células LNCaP fueron transfectadas con el miR-100 sintético, Después de 24 y 48 horas, la expresión relativa de miR-100 fue calculada como en A. C) la expresión relativa de SMARCA5 fue calculada como en A, empleando a GAPDH como control endógeno y D) se midió la actividad del gen reportero de luciferasa. Condiciones: miR-100= mimic-100, WT= condición basal, Neg= control negativo. Las unidades se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n=3).

### ***miR-100 disminuye la viabilidad y suprime la migración de células de CaP***

Con la finalidad de entender el efecto de la acción biológica de miR-100 sobre el fenotipo de las células de CaP, evaluamos como la ganancia de función de miR-100 afecta los procesos de viabilidad celular y de migración. De forma

destacable, observamos que a las 48 horas pos-transfección miR-100 disminuye significativamente la viabilidad celular en un 17% aproximadamente (Figura 11A). También detectamos una supresión significativa del 20% de la migración celular en el mismo lapso de tiempo (figura 11B).

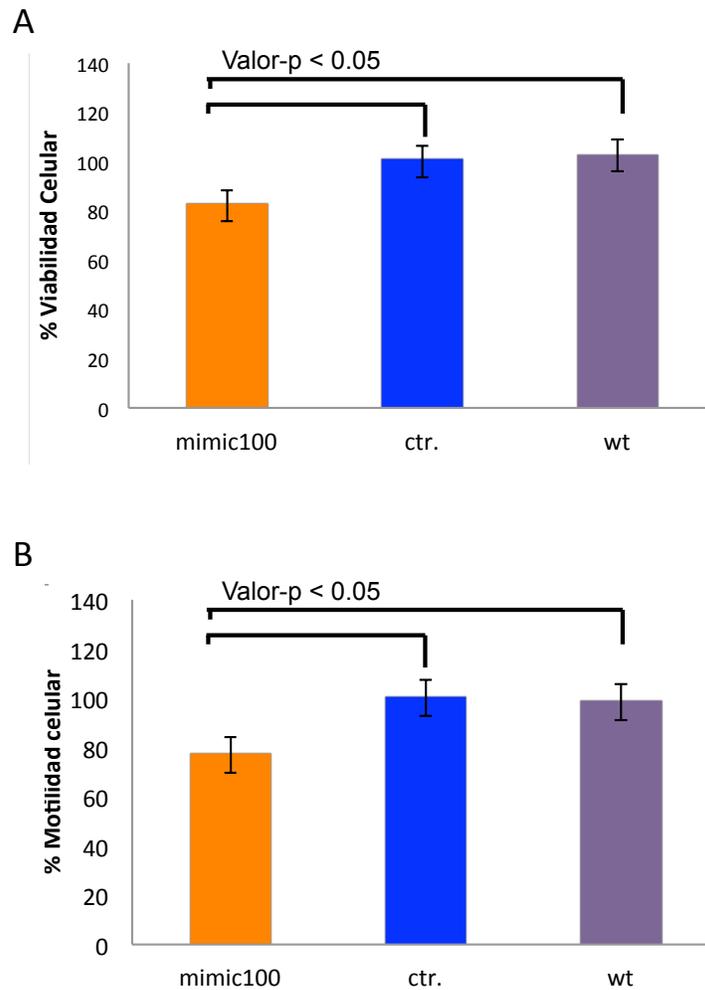


Figura 11. Efecto de miR-100 sobre A) la viabilidad y B) la migración celular. Condiciones: miR-100= mimic-100, WT= condición basal, Neg= control negativo.)En ambos casos se representa el cambio en porcentaje comparado contra la condición control. Las unidades se expresan como media  $\pm$  desviación estándar (n=3)

***miR-100 participa en la regulación de genes relacionados con el metabolismo celular y la migración celular.***

Con el propósito de tener una mayor comprensión de la acción molecular de miR-100 en las células de CaP, utilizamos una plataforma de microarreglos para evaluar el cambio de expresión global de genes ante la expresión exógena de miR-100 en LNCaP. Mediante el análisis de expresión diferencial, detectamos el abatimiento de la expresión 264 genes y el incremento de expresión en 549 genes (Figura 12). Para entender mejor el sentido biológico detrás de la lista de genes diferencialmente expresados, realizamos un análisis de búsqueda de anotaciones funcionales en las que se encuentran sobre-representados los genes de nuestra lista de genes, reduciendo la búsqueda a anotaciones de procesos biológicos enlistados dentro del proyecto de GO. Entre los genes regulados a la alta por miR-100, identificamos una sobre-representación significativa en términos relacionados con la regulación de la adhesión celular, de la respuesta a hormonas esteroideas y de la señalización de hormonas esteroideas (Figura 13A). Por el contrario, entre los genes regulados baja por miR-100, identificamos una sobre-representación significativa de genes en términos asociados con la división mitótica y procesos metabólicos celulares (Figura 13B). Estos resultados, resaltan la importancia de miR-100 como potencial regulador antagónico del desarrollo del CaP.

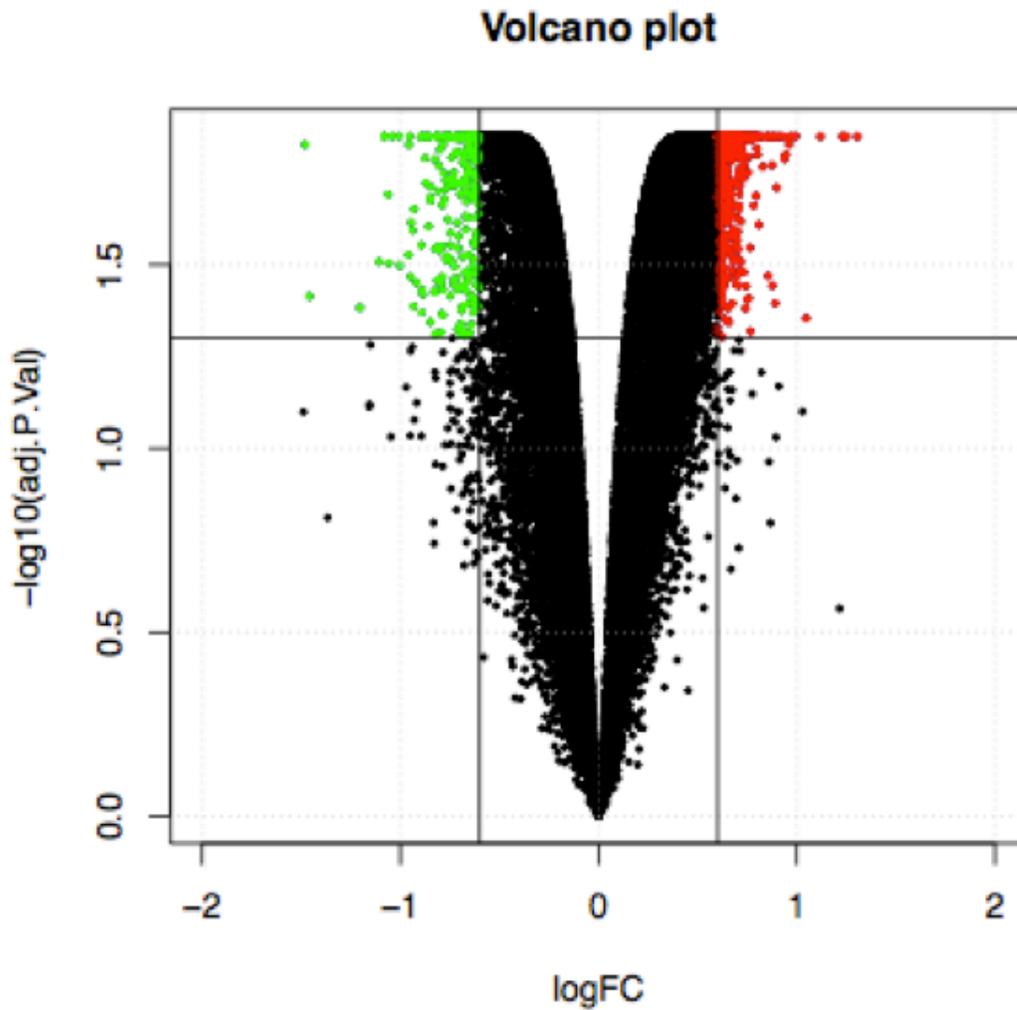


Figura 12. Mapa de volcán. Los genes diferencialmente expresados en LNCaP cuando se sobre-expresa miR-100 en comparación con LNCaP transfectada con el oligonucleótido inespecífico, empleado como control negativo. La imagen representa los cambios en la dimensión biológica (eje x) y en la dimensión estadística (eje y). Los puntos en verde corresponden a genes sub-expresados y los rojos a los sobre-expresados. Un  $FC > 1.5$  ( $\text{LogFC} > 0.6$ ) y un  $\text{FDR} < 0.05$  fueron considerados como significativos.

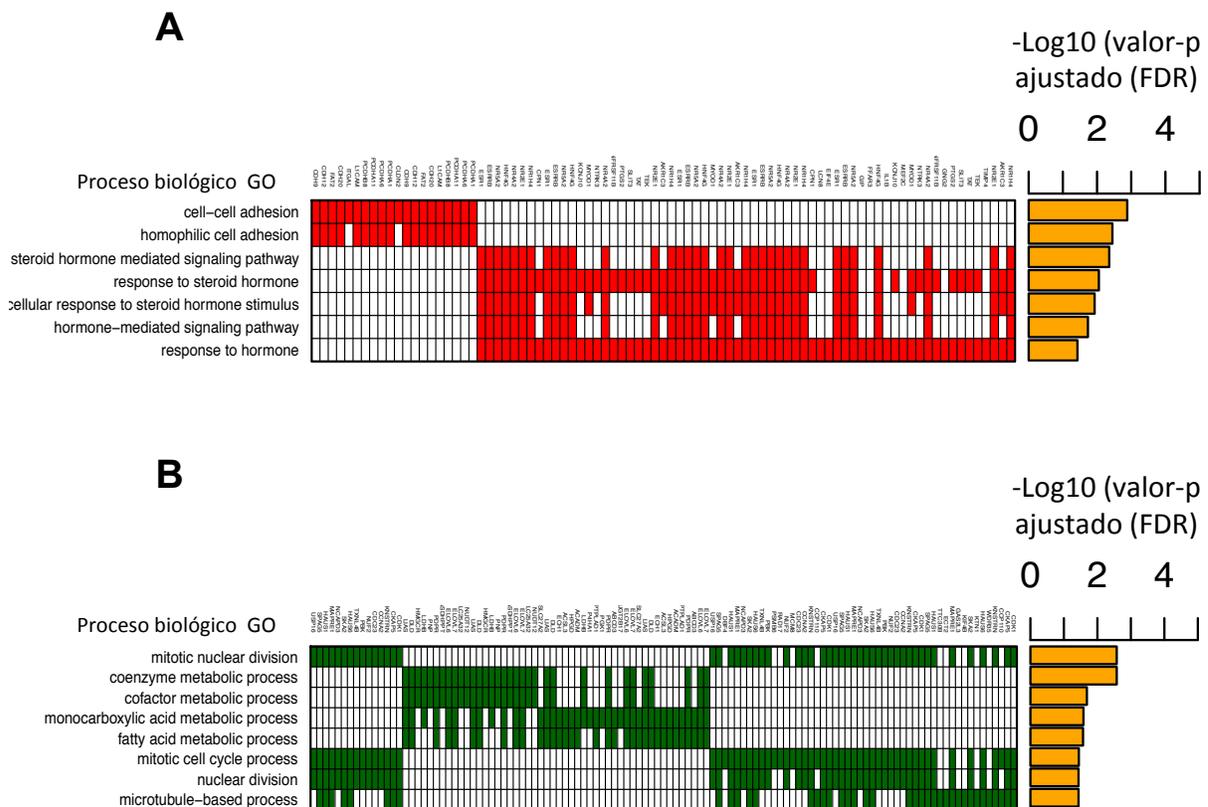


Figura 13. Procesos biológicos con sobre-representación de genes regulados por miR-100. A) Términos GO de procesos biológicos en los que se encuentran sobre-representados los genes sobre-expresados por miR-100. B) Términos GO de procesos biológicos en los que se encuentran sobre-representados los genes sub-expresados por miR-100

### Discusión de resultados

Hasta la fecha, niveles anormales de PSA y un DRE sospechoso son los principales criterios considerados para decidir realizar una biopsia de próstata [4]. Se ha descrito que el PSA, a pesar de ser un marcador muy específico de próstata, no es específicos para CaP, ya que los niveles séricos de PSA anormales pueden ser causados, no sólo por el cáncer, sino también por otras condiciones indolentes tales como la HPB [58]. Con respecto al uso clínico del

DRE, este se considera como un parámetro subjetivo [59]. En consecuencia, casi el 50% de las biopsias prostáticas realizadas para confirmar la presencia de CaP son negativos y por lo tanto, se podrían evitar. Ante este escenario, prevalece una necesidad de encontrar nuevos métodos para mejorar la detección de CaP y minimizar la tasa de falsos positivos, y que sean al mismo tiempo, mínimamente invasivos para evitar comorbilidades asociadas. Aunque, hay un creciente reconocimiento de que el riesgo de la enfermedad no reconocida no se puede descartar por completo [60, 61], un aspecto crítico de nuestro trabajo fue la caracterización de nuestro grupo control, las muestras de HPB. Para este grupo de pacientes, las biopsias fueron evaluadas patológicamente y no se encontró ninguna evidencia de cáncer en ellas. Es importante destacar que ninguna de ellas tenía neoplasia intraepitelial prostática de alto grado ni proliferación celular atípica, condiciones que podrían ser indicación para repetir la biopsia. El principal objetivo de este trabajo fue identificar y cuantificar miRNAs en orina con utilidad como marcadores biológicos o biomarcadores que ayudarían a diferenciar casos de CaP clínicamente relevante, con puntuación de Gleason  $\geq 7$ , de la hiperplasia indolente como la HPB, en sujetos en riesgo de ser sometidos a biopsia prostática.

En particular, los biomarcadores basados en la orina han demostrado ser prometedores como indicadores de CaP, ya que pueden ser obtenidos por métodos no invasivos y permiten tener un seguimiento de los tumores con focos heterogéneos [62]. Durante el desarrollo de este trabajo, algunos pocos estudios han demostrado la viabilidad de la medición de la expresión de miRNAs en la orina de pacientes con CaP y han comparado sus niveles contra los de controles sanos o de pacientes con HPB [53, 63-66]. En este estudio, hemos confirmado que los miRNAs son detectables en la orina de pacientes con CaP y HPB. Uno de nuestros primeros intentos consistió en utilizar la fracción sobrenadante que se obtiene después de una primera etapa de centrifugación. Sin embargo, a diferencia de otros investigadores [64], el rendimiento de RNA obtenido por este

procedimiento estaba por debajo del óptimo para nuestro propósito ( $\sim <10$  ng / uL). Con base en dicho resultado, nos decidimos a utilizar todo el sedimento urinario. Se observó que la recuperación de RNA era superior mediante el uso de esta porción y los resultados de RT-qPCR mejoraron considerablemente. Para tener un mayor control sobre posibles sesgos en la manipulación de las muestras de orina, decidimos llevar a cabo los siguientes pasos de control de calidad para la recolección y el procesamiento: 1) las muestras de orina se colectaron después de que el médico urólogo llevo a cabo el masaje prostático, 2) únicamente se emplearon muestras cuyo volumen mínimo recogido fue de 30 ml de orina, 3) los especímenes con un aspecto oscuro, fangoso y/o con el olor excesivo, fueron excluidos del análisis y 4) decidimos añadir un agente de estabilización de RNA. Después de establecer nuestras pruebas de principio del aislamiento y cuantificación de miRNAs a partir de muestras de orina, se midió la expresión de un conjunto más amplio de miRNAs, con la intención de detectar nuevos miRNAs en dichas muestras, los cuales podrían estar potencialmente más fuertemente asociados a la presencia de CaP. De forma interesante, al realizar el análisis de perfiles de miRNAs, se observó que la abundancia general de miRNAs fue mayor en las muestras de orina CaP que en las muestras de orina de HPB. La investigación realizada Brasee et al. sobre la presencia de miRNAs en circulación asociados con CaP metastásico, demostró una observación similar para las muestras procedentes de pacientes con CaP metastásico [51]. Es posible que a medida que la progresión del CaP tiene lugar, un mayor número de moléculas de miRNAs se secretan al espacio extracelular. De hecho, cada vez hay más pruebas que apuntan a la secreción activa de miRNAs por parte de células de CaP y que el perfil de los miRNAs secretados dinámicamente cambia a medida que progresa la enfermedad [67, 68], esta característica es compatible con la utilidad de miRNAs en la orina como biomarcadores específicos para CaP.

Nuestro estudio de detección de miRNAs nos permitió encontrar un conjunto de 18 miRNAs expresados diferencialmente a un nivel significativo entre CaP y

HPB (FDR <0.05e). Posteriormente, la sobre expresión de miR-100 y de miR-200b en el CaP y fue validada con confianza en mayor número de pacientes y empleando un método independiente de RT-qPCR (valor de  $p < 0,05$ ). Nos dimos cuenta de que los niveles de expresión de miR-100 y miR-200b se correlacionaron positivamente; Por lo tanto, con la finalidad de reducir e integrar la información proporcionada por ambos marcadores decidimos calcular un puntaje común para ambos miRNAs. Con el fin de medir la fuerza de asociación entre diferentes variables y los resultados de biopsia de próstata, se realizó un análisis de regresión logística univariable. Nuestros resultados demuestran que el DRE, el puntaje de miR-100/200b, la edad, el PSA y el % de PSA libre fueron todos predictores independientes de CaP. Posteriormente, establecimos dos modelos multivariantes. El primero de ellas (modelo base) compuesto del DRE, la edad, el PSA y el % de PSA libre; y el segundo (modelo combinado) comprendía todas las variables en el modelo base, el puntaje de miR-100/200b. El modelo combinado fue un mejor predictor de diagnóstico de CaP que el puntaje de miR-100/200b solo o cualquiera de los parámetros clínicos de forma individual. La falta de especificidad del PSA tiene un impacto clínico importante sobre el diagnóstico dentro de la zona gris de valores de PSA (entre 4-10 ng/ml). Muchos hombres con niveles de PSA anormales en la zona gris son sometidos a biopsia de próstata y se estima que el CaP está presente en sólo el 25% de estos pacientes [69], lo que significa que un considerable número de biopsias innecesarias se podría evitar. Curiosamente, nuestros datos indican que, para los pacientes con valores séricos de PSA en la zona gris, la exactitud de predicción y el rendimiento del puntaje de miR-100/200b solo es incluso superior a la de toda la cohorte. Sin embargo, el modelo combinado, una vez más superó significativamente todos los modelos, lo que indica que la adición de la firma de miR-100/200b para el modelo base aumenta la precisión de la detección de CaP en la zona gris, donde el dilema sobre realizar una biopsia sigue siendo un tema crítico.

Además de la evaluación de la exactitud en la predicción de CaP, consideramos que es importante evaluar el beneficio clínico de nuestra firma de miRNAs como parte del modelo combinado y la comparamos contra el PSA y el modelo base. Para este fin, hemos utilizado un análisis de DCA; un método que nos permite clasificar e identificar el mejor modelo de predicción de CaP, con la finalidad de asegurar que la biopsia se llevaría a cabo sólo en los pacientes con una alta probabilidad de riesgo de CaP, evitando su practica en pacientes con baja probabilidad de riesgo [70]. Nuestros datos muestran que el modelo combinado proporciona un beneficio neto más alto en un rango de umbral de probabilidades de entre 10 - 50%, el cual es un rango de probabilidades razonables para decidir llevar a cabo una biopsia asumiendo el costo por el riesgo de sobre-tratamiento del paciente. Es importante destacar que una reducción en biopsias innecesarias se maximiza dentro del mismo umbral de probabilidades. Desde una perspectiva clínica, el rendimiento del modelo combinado para distinción entre CaP y HPB es más crítica en la zona gris de los valores de PSA. Para este subgrupo de pacientes, el beneficio neto también está presente dentro del umbral de probabilidades definidos y se evitan un número sustancial de biopsias innecesarias.

Otros marcadores moleculares han sido evaluados para el diagnóstico de CaP. El RNA no codificante, PCA3 y el gen de fusión TMPRSS2: ERG; son los ejemplos más representativos de biomarcadores en orina para CaP [24, 71]. Aunque se ha demostrado que el PCA3 supera al PSA y el% de PSA libre, el beneficio más digno de mención sólo ha sido demostrado en pacientes que ya han sido sometidos previamente a biopsia y cuyo resultado fue negativo [72]. Por otro lado, el transcrito TMPRSS2: ERG, también puede ser detectado en muestras de orina y tiene la ventaja de poseer un alto valor predictivo positivo para CaP de 94%. Sin embargo, un inconveniente importante en el uso de TMPRSS2: ERG es su frecuencia variable en diferentes poblaciones [58]. A pesar de los esfuerzos para aumentar la tasa de detección de CaP, incluso combinando el uso de ambos transcritos, aun existen las limitaciones en cuanto

a su sensibilidad, y su rendimiento está lejos de ser excepcional, especialmente en cuanto a su capacidad de discriminar el CaP indolente del que es clínicamente significativo. Una característica importante que contribuye a la robustez de la utilización de miRNAs en muestras de orina como biomarcadores es su estabilidad relativamente superior durante periodos de tiempo más largos en comparación con mRNAs, como se ha señalado por otros investigadores [64]. Por desgracia, no se midió la expresión de PCA3 y TMPRSS2: ERG en nuestras muestras, por lo tanto, no fue posible comparar el rendimiento de nuestra firma miRNAs contra el de las firmas de PCA3 y TMPRSS2: ERG, en la misma cohorte de pacientes.

Nuestro trabajo también permite demostrar que la elevación de los niveles de miR-100 y de miR-200b en muestras de orina se asocian significativamente a la presencia de CaP avanzado. Consistente con esta observación, se ha informado que los niveles de expresión de miR-100 se encuentran elevados en tejido de CaP localizado en comparación con la neoplasia intraepitelial alto grado de [73] y que su sobre-expresión esta relacionada de manera independiente con la recurrencia bioquímica del CaP [74]. Por otra parte, el trabajo de Mitchell et al. (2008), ha demostrado que existe un aumento de la expresión de miR-100 en muestras de plasma de pacientes con CaP [26]. Otro estudio mas reciente mostró que los niveles más altos de miR-200b y miR-100 en circulación están asociados a la presencia de CaP metastásico [75]. Además, sus niveles crecientes parecen estar correlacionados con un mal pronóstico. Para reforzar el valor de miR-100 como marcador de CaP, se ha demostrado que los miembros de la familia miR-100 desempeñan un papel en la mejora de la sensibilidad a la radiación en células de CaP [76].

Las discrepancias entre los diferentes trabajos realizados demuestran que la validación del uso de microRNAs como marcadores de una condición patológica es una labor compleja y enfatiza la importancia de obtener tanta información se pueda sobre sus características tanto clínicas como biológicas. En este sentido,

el entendimiento del impacto de las alteraciones de miRNAs en un sistema biológico, arroja información útil para poder enriquecer su valor como potencial marcador biológico. Los resultados obtenidos de los ensayos funcionales de la actividad de miR-100 en células de CaP corroboran su participación como regulador de procesos como la proliferación celular o la migración celular. Dichos resultados están en sintonía con los resultados obtenidos por otros investigadores en cuanto al rol potencial de miR-100 como supresor tumoral en CaP [77]. Ha sido demostrado que un miRNA es capaz de regular de manera directa hasta 200 blancos diferentes y tener un efecto secundario sobre un número significativamente mayor de genes [32]. En este trabajo, hemos observado el efecto de miR-100 sobre el programa transcripcional de LNCaP. De forma importante, identificamos un enriquecimiento de procesos biológicos relacionados con el metabolismo celular y la motilidad celular. No nos fue posible evaluar funcionalmente el efecto de miR-100 sobre la invasividad celular, sin embargo, también observamos una sobre-representación de genes anotados en los procesos de remodelación de matriz extracelular y la adhesión celular. En concordancia con nuestros resultados, trabajos recientes han mostrado que miR-100 juega un papel importante regulando procesos de transición epitelio mesénquima en CaP [77]. Interesantemente, los genes de la familia de miR-200b también han sido ampliamente estudiados como reguladores de la transición epitelio mesénquima en cáncer [78, 79].

## **Conclusión**

En conclusión, hemos identificado y validado una firma de miRNAs en orina para el diagnóstico diferencial del CaP. Hasta donde sabemos, este es el primer estudio que describe el uso de miR100 urinario y los niveles de miR-200b en combinación con los parámetros clínicos para detectar la presencia de CaP. Al igual que otros biomarcadores, esta firma requiere una validación adicional en un conjunto de datos independiente con el fin de evaluar mejor su valor clínico. Adicionalmente, los estudios para evaluar la función biológica de miRNAs pueden arrojar información útil para enriquecer su uso como marcadores

biológicos. En este trabajo, logramos evaluar el efecto de miR-100 sobre los rasgos fenotípicos de células de CaP. En concreto, observamos que miR-100 ejerce un rol inhibiendo la viabilidad celular y disminuyendo la capacidad migratoria de la línea celular LNCaP. Dichos rasgos son importantes componentes de procesos oncogénicos en el desarrollo del CaP.

## Referencias.

1. DeMarzo, A.M., et al., *Pathological and molecular aspects of prostate cancer*. Lancet, 2003. **361**(9361): p. 955-64.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. CA Cancer J Clin, 2013. **63**(1): p. 11-30.
3. Torre, L.A., et al., *Global cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2015. **65**(2): p. 87-108.
4. Ukimura, O., et al., *Contemporary role of systematic prostate biopsies: indications, techniques, and implications for patient care*. Eur Urol, 2013. **63**(2): p. 214-30.
5. Kryvenko, O.N., et al., *African-American Men with Gleason Score 3+3=6 Prostate Cancer Produce Less Prostate Specific Antigen than Caucasian Men: A Potential Impact on Active Surveillance*. J Urol, 2015.
6. Hemminki, K. and K. Czene, *Age specific and attributable risks of familial prostate carcinoma from the family-cancer database*. Cancer, 2002. **95**(6): p. 1346-53.
7. Hemminki, K., X. Li, and K. Czene, *Familial risk of urological cancers: data for clinical counseling*. World J Urol, 2004. **21**(6): p. 377-81.
8. Pienta, K.J. and D. Bradley, *Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(6): p. 1665-71.
9. Czene, K., P. Lichtenstein, and K. Hemminki, *Environmental and heritable causes of cancer among 9.6 million individuals in the Swedish Family-Cancer Database*. Int J Cancer, 2002. **99**(2): p. 260-6.
10. Crawford, E.D., *Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer*. Urology, 2009. **73**(5 Suppl): p. S4-10.
11. Joshua, A.M., et al., *Prostatic preneoplasia and beyond*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1785**(2): p. 156-81.
12. Epstein, J.I., et al., *A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score*. Eur Urol, 2015.
13. Carter, H.B., et al., *Gleason score 6 adenocarcinoma: should it be labeled as cancer?* J Clin Oncol, 2012. **30**(35): p. 4294-6.
14. Garnick, M.B., *Recommendations on use of prostate-specific antigen for prostate cancer screening*. JAMA, 2012. **307**(13): p. 1372; author reply 1372-4.

15. Garnick, M.B., *The great prostate cancer debate*. Sci Am, 2012. **306**(2): p. 38-43.
16. Schroder, F.H., et al., *Screening and prostate-cancer mortality in a randomized European study*. N Engl J Med, 2009. **360**(13): p. 1320-8.
17. Ilyin, S.E., S.M. Belkowski, and C.R. Plata-Salaman, *Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches*. Trends Biotechnol, 2004. **22**(8): p. 411-6.
18. Shariat, S.F., et al., *Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers*. Acta Oncol, 2011. **50 Suppl 1**: p. 61-75.
19. Hussain, M., et al., *Prostate-specific antigen progression predicts overall survival in patients with metastatic prostate cancer: data from Southwest Oncology Group Trials 9346 (Intergroup Study 0162) and 9916*. J Clin Oncol, 2009. **27**(15): p. 2450-6.
20. Roobol, M.J., et al., *A framework for the identification of men at increased risk for prostate cancer*. J Urol, 2009. **182**(5): p. 2112-20.
21. Lazzeri, M., et al., *Relationship of chronic histologic prostatic inflammation in biopsy specimens with serum isoform [-2]proPSA (p2PSA), %p2PSA, and prostate health index in men with a total prostate-specific antigen of 4-10 ng/ml and normal digital rectal examination*. Urology, 2014. **83**(3): p. 606-12.
22. Knezevic, D., et al., *Analytical validation of the Oncotype DX prostate cancer assay - a clinical RT-PCR assay optimized for prostate needle biopsies*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 690.
23. Vlaeminck-Guillem, V., et al., *Urinary prostate cancer 3 test: toward the age of reason?* Urology, 2010. **75**(2): p. 447-53.
24. Tomlins, S.A., *Urine PCA3 and TMPRSS2:ERG using cancer-specific markers to detect cancer*. Eur Urol, 2014. **65**(3): p. 543-5.
25. Leyten, G.H., et al., *Prospective multicentre evaluation of PCA3 and TMPRSS2-ERG gene fusions as diagnostic and prognostic urinary biomarkers for prostate cancer*. Eur Urol, 2014. **65**(3): p. 534-42.
26. Mitchell, P.S., et al., *Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(30): p. 10513-8.
27. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. **75**(5): p. 843-54.
28. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. **116**(2): p. 281-97.
29. Lee, Y., et al., *MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II*. EMBO J, 2004. **23**(20): p. 4051-60.
30. Cai, X., C.H. Hagedorn, and B.R. Cullen, *Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs*. RNA, 2004. **10**(12): p. 1957-66.
31. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell, 2003. **113**(1): p. 25-36.
32. Rajewsky, N. and N.D. Socci, *Computational identification of microRNA targets*. Dev Biol, 2004. **267**(2): p. 529-35.

33. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nat Rev Genet, 2008. **9**(2): p. 102-14.
34. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation.* Science, 2007. **318**(5858): p. 1931-4.
35. Schaefer, A., et al., *MicroRNAs and cancer: current state and future perspectives in urologic oncology.* Urol Oncol, 2010. **28**(1): p. 4-13.
36. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(24): p. 15524-9.
37. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(39): p. 13944-9.
38. Calin, G.A., et al., *A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia.* N Engl J Med, 2005. **353**(17): p. 1793-801.
39. Calin, G.A., et al., *MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(32): p. 11755-60.
40. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers.* Nature, 2005. **435**(7043): p. 834-8.
41. Volinia, S., et al., *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2257-61.
42. Porkka, K.P., et al., *MicroRNA expression profiling in prostate cancer.* Cancer Res, 2007. **67**(13): p. 6130-5.
43. Amb, S., et al., *Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer.* Cancer Res, 2008. **68**(15): p. 6162-70.
44. Tong, A.W., et al., *MicroRNA profile analysis of human prostate cancers.* Cancer Gene Ther, 2009. **16**(3): p. 206-16.
45. Kim, Y.K., *Extracellular microRNAs as Biomarkers in Human Disease.* Chonnam Med J, 2015. **51**(2): p. 51-7.
46. Mittelbrunn, M., et al., *Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells.* Nat Commun, 2011. **2**: p. 282.
47. Lee, Y., S. El Andaloussi, and M.J. Wood, *Exosomes and microvesicles: extracellular vesicles for genetic information transfer and gene therapy.* Hum Mol Genet, 2012. **21**(R1): p. R125-34.
48. Allegra, A., et al., *Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review).* Int J Oncol, 2012. **41**(6): p. 1897-912.
49. Zhang, H.L., et al., *An elevated serum miR-141 level in patients with bone-metastatic prostate cancer is correlated with more bone lesions.* Asian J Androl, 2013. **15**(2): p. 231-5.
50. Gonzales, J.C., et al., *Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for*

- determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. Clin Genitourin Cancer, 2011. 9(1): p. 39-45.*
51. Brase, J.C., et al., *Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. Int J Cancer, 2011. 128(3): p. 608-16.*
  52. Bryant, R.J., et al., *Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. Br J Cancer, 2012. 106(4): p. 768-74.*
  53. Sapre, N., et al., *Curated microRNAs in urine and blood fail to validate as predictive biomarkers for high-risk prostate cancer. PLoS One, 2014. 9(4): p. e91729.*
  54. Schmittgen, T.D. and K.J. Livak, *Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc, 2008. 3(6): p. 1101-8.*
  55. Hanley, J.A. and B.J. McNeil, *A method of comparing the areas under receiver operating characteristic curves derived from the same cases. Radiology, 1983. 148(3): p. 839-43.*
  56. Vickers, A.J. and E.B. Elkin, *Decision curve analysis: a novel method for evaluating prediction models. Med Decis Making, 2006. 26(6): p. 565-74.*
  57. Vickers, A.J., et al., *Extensions to decision curve analysis, a novel method for evaluating diagnostic tests, prediction models and molecular markers. BMC Med Inform Decis Mak, 2008. 8: p. 53.*
  58. Romero Otero, J., et al., *Prostate cancer biomarkers: an update. Urol Oncol, 2014. 32(3): p. 252-60.*
  59. Loeb, S., et al., *Accuracy of prostate weight estimation by digital rectal examination versus transrectal ultrasonography. J Urol, 2005. 173(1): p. 63-5.*
  60. Levy, D.A. and J.S. Jones, *Management of rising prostate-specific antigen after a negative biopsy. Curr Urol Rep, 2011. 12(3): p. 197-202.*
  61. Jones, J.S., *Management of rising prostate-specific antigen following a negative biopsy. Curr Opin Urol, 2010. 20(3): p. 198-203.*
  62. Jamaspishvili, T., et al., *Urine markers in monitoring for prostate cancer. Prostate Cancer Prostatic Dis, 2010. 13(1): p. 12-9.*
  63. Srivastava, A., et al., *MicroRNA profiling in prostate cancer--the diagnostic potential of urinary miR-205 and miR-214. PLoS One, 2013. 8(10): p. e76994.*
  64. Lewis, H., et al., *miR-888 is an expressed prostatic secretions-derived microRNA that promotes prostate cell growth and migration. Cell Cycle, 2014. 13(2): p. 227-39.*
  65. Korzeniewski, N., et al., *Identification of cell-free microRNAs in the urine of patients with prostate cancer. Urol Oncol, 2015. 33(1): p. 16 e17-22.*
  66. Stephan, C., et al., *Urinary miR-183 and miR-205 do not surpass PCA3 in urine as predictive markers for prostate biopsy outcome despite their highly dysregulated expression in prostate cancer tissue. Clin Chem Lab Med, 2015.*
  67. Kim, J., et al., *Enhanced shedding of extracellular vesicles from amoeboid prostate cancer cells: Potential effects on the tumor microenvironment. Cancer Biol Ther, 2014. 15(4).*
  68. Hessvik, N.P., et al., *Profiling of microRNAs in exosomes released from PC-3 prostate cancer cells. Biochim Biophys Acta, 2012. 1819(11-12): p. 1154-63.*

69. Schroder, F.H., et al., *4-year prostate specific antigen progression and diagnosis of prostate cancer in the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, section Rotterdam*. J Urol, 2005. **174**(2): p. 489-94; discussion 493-4.
70. Fitzgerald, M., B.R. Saville, and R.J. Lewis, *Decision curve analysis*. JAMA, 2015. **313**(4): p. 409-10.
71. Cornu, J.N., et al., *Urine TMPRSS2:ERG fusion transcript integrated with PCA3 score, genotyping, and biological features are correlated to the results of prostatic biopsies in men at risk of prostate cancer*. Prostate, 2013. **73**(3): p. 242-9.
72. Roobol, M.J., et al., *Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test*. Eur Urol, 2010. **58**(4): p. 475-81.
73. Leite, K.R., et al., *Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis*. Urol Oncol, 2011. **29**(3): p. 265-9.
74. Leite, K.R., et al., *MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer*. J Urol, 2011. **185**(3): p. 1118-22.
75. Cheng, H.H., et al., *Circulating microRNA profiling identifies a subset of metastatic prostate cancer patients with evidence of cancer-associated hypoxia*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69239.
76. Mueller, A.C., D. Sun, and A. Dutta, *The miR-99 family regulates the DNA damage response through its target SNF2H*. Oncogene, 2013. **32**(9): p. 1164-72.
77. Wang, M., et al., *Loss of miR-100 enhances migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition and stemness properties in prostate cancer cells through targeting Argonaute 2*. Int J Oncol, 2014. **45**(1): p. 362-72.
78. Kong, D., et al., *miR-200 regulates PDGF-D-mediated epithelial-mesenchymal transition, adhesion, and invasion of prostate cancer cells*. Stem Cells, 2009. **27**(8): p. 1712-21.
79. Williams, L.V., et al., *miR-200b inhibits prostate cancer EMT, growth and metastasis*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e83991.