

UACM

Universidad Autónoma
de la Ciudad de México

Nada humano me es ajeno

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO

COLEGIO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA

POSGRADO EN CIENCIAS GENÓMICAS

**Determinación del papel del miR-107 y otros
microRNAs en la angiogénesis del cáncer de
próstata**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE

MAESTRA EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

Ereth Ameyatzin Robles Chávez

DIRECTORA

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

POSGRADO
EN CIENCIAS
GENÓMICAS

Ciudad de México, junio de 2021.

SISTEMA BIBLIOTECARIO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE LA CIUDAD DE MÉXICO COORDINACIÓN ACADÉMICA

RESTRICCIONES DE USO PARA LAS TESIS DIGITALES

DERECHOS RESERVADOS[©]

La presente obra y cada uno de sus elementos está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor; por la Ley de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, así como lo dispuesto por el Estatuto General Orgánico de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México; del mismo modo por lo establecido en el Acuerdo por el cual se aprueba la Norma mediante la que se Modifican, Adicionan y Derogan Diversas Disposiciones del Estatuto Orgánico de la Universidad de la Ciudad de México, aprobado por el Consejo de Gobierno el 29 de enero de 2002, con el objeto de definir las atribuciones de las diferentes unidades que forman la estructura de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México como organismo público autónomo y lo establecido en el Reglamento de Titulación de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México.

Por lo que el uso de su contenido, así como cada una de las partes que lo integran y que están bajo la tutela de la Ley Federal de Derecho de Autor, obliga a quien haga uso de la presente obra a considerar que solo lo realizará si es para fines educativos, académicos, de investigación o informativos y se compromete a citar esta fuente, así como a su autor ó autores. Por lo tanto, queda prohibida su reproducción total o parcial y cualquier uso diferente a los ya mencionados, los cuales serán reclamados por el titular de los derechos y sancionados conforme a la legislación aplicable.

INTEGRACIÓN DEL JURADO:

Presidente: Dr. Mauricio Castañón Arreola

Secretaria: Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Vocal: Dr. Jesús Miguel Torres Flores

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez

Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Comité Tutorial:

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM

Dr. Mario César López Camarillo, UACM

Dr. Mauricio Catañón Arreola, UACM

Dr. Jesús Miguel Torres Flores, UACM

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz, UACM

Lectores de Tesis:

Dr. Mauricio Castañón Arreola, UACM

Dr. Jesús Miguel Torres Flores, UACM

Dra. Ángeles Concepción Tecalco Cruz, UACM

Agradecimientos

Primeramente, quiero agradecer a Dios por que me ha dado la oportunidad de conocer la ciencia, de entenderla y comprender su perfección a través de ella.

Quiero agradecer a mi esposo Christian Sánchez, por ser mi motor para emprender y terminar este proyecto, por animarme en todo momento y acompañarme en el proceso.

A mi hija Eva Samirah, por su amor y paciencia a pesar de su corta edad, porque aún sin saberlo, su sonrisa me animó a continuar y llegar hasta el final.

A mi madre Ereth Chávez, por ser mi mayor fan, por amarme y apoyarme de todas las formas posibles para concluir la maestría.

A mi padre Victor Robles, por guiarme desde el primer día, por permanecer cerca y hacerme mantener el enfoque correcto en este proyecto.

A mis hermanos Edrei, Saula y Abdiel, que con palabras de aliento me ayudaron a mantenerme hasta el final, y con su dedicación y amor por la ciencia me inspiran a continuar.

A mis amigas Karla y Esther, que hicieron más amenos y divertidos los días.

A mis compañeros del Laboratorio 1, Laura, Sharon, Mar y Victor, por apoyarme en todo momento para resolver dudas.

A la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, por su asesoría, todo el tiempo y recursos invertidos en el proyecto.

Al Dr. Mauricio Castañón, Dr. César López, Dr. Jesús Torres y Dra. Ángeles Tecalco por su apoyo y compromiso con el proyecto.

Agradezco a la Universidad Autónoma de la Ciudad de México por darme la oportunidad de continuar con mi preparación académica.

Agradezco, por último, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca número 734919 otorgada durante el desarrollo del trabajo de investigación

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi esposo e hija, mis amores, por ser el mejor equipo, por amarme tanto, porque sus sonrisas llenan mi vida, son mi mayor inspiración y la razón por la que deseo ser mejor.

A mis padres, porque su amor infinito me ha guiado todos estos años, me han enseñado a vivir, a no rendirme, a luchar por lo que quiero y a terminar cada proyecto que inicio; porque invirtieron todo su tiempo y esfuerzo en brindarme la mejor educación.

A mis hermanos, porque siempre están para mí, por mostrarme su amor y a pesar de ser los pequeños, me ponen el ejemplo de superación.

Índice

Agradecimientos.....	4
Dedicatoria	5
Índice	6
Índice de tablas.....	8
Índice de figuras.....	9
Abreviaturas	11
Resumen	12
Abstract	14
1. Introducción.....	15
1.1 Cáncer	15
1.1.1 Definición.....	15
1.1.2 Características.....	16
1.1.3 Epidemiología	18
1.2 Cáncer de próstata	20
1.2.1 Definición	20
1.2.2 Características	21
1.2.3 Síntomas	22
1.2.4 Diagnóstico	22
1.2.5 Tratamiento.....	24
1.2.6 Clasificación	25
1.3 Cáncer de próstata resistente a la castración	29
1.3.1 Definición.....	29
1.3.2 Características	29
1.3.3 Diagnóstico	30
1.3.4 Tratamiento.....	31
1.4 Angiogénesis sostenida en el cáncer de próstata	31
1.5 MicroRNAs	35
1.5.1 Características	35
1.5.2 Biogénesis	35
1.5.3 MiRNAs circulantes	36
1.5.4 Exosomas	37

1.6 RNAs largos no codificantes	38
1.6.1 Regulación de los lncRNAs	40
1.6.2 lncRNAs en angiogénesis	40
2. Antecedentes particulares	42
2.1 MicroRNAs en suero	46
2.2 MicroRNAs en orina	48
2.3 MiR-107 en angiogénesis	50
2.4 Participación de otros microRNAs en angiogénesis	51
2.5 Participación de lncRNAs en angiogénesis	53
3. Justificación	54
4. Hipótesis	55
5. Objetivos	56
5.1 Objetivo general.....	56
5.2 Objetivos específicos.....	56
6. Estrategia experimental	57
7. Materiales y métodos	59
8. Resultados	62
8.1 Identificar <i>in silico</i> a los genes que regulan negativamente la angiogénesis en el cáncer de próstata.....	62
8.2 Analizar <i>in silico</i> la expresión del miR-107 y de otros microRNAs circulantes que estén participando en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.....	68
8.3 Determinar <i>in silico</i> posibles lncRNAs que estén regulando a los microRNAs que participan positivamente en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.....	79
9. Discusión	81
10. Conclusión.....	87
11. Bibliografía	88

Índice de tablas

Tabla 1. Clasificación del cáncer basada en el crecimiento y diseminación del tumor.

Tabla 2. Características del cáncer de próstata resistente a la castración.

Tabla 3. Pruebas de diagnóstico para el CPRC.

Tabla 4. Participación de microRNAs en el cáncer de próstata.

Tabla 5. Criterios de inclusión de voluntarios para estudio.

Tabla 6. RNAm que regulan negativamente la angiogénesis.

Tabla 7. Genes candidato.

Tabla 8. MicroRNAs expresados en tejido tumoral de próstata.

Tabla 9. Expresión de miRNAs circulantes en cáncer de próstata.

Tabla 10. MicroRNAs circulantes seleccionados.

Tabla 11. Interacciones entre miRNAs sobreexpresados en CaP y los RNAm anti-angiogénicos en TargetScan.

Tabla 12. Interacciones entre miRNAs sobreexpresados en CaP y los RNAm anti-angiogénicos en miRTarBase.

Tabla 13. Interacción lncRNAs-miRNAs.

Índice de figuras

Figura 1. Hallmarks del cáncer.

Figura 2. Número de casos nuevos de cáncer en 2020 en población mexicana.

Figura 3. Número de casos nuevos de cáncer en 2020 en población masculina en México.

Figura 4. Esquema de la próstata.

Figura 5. Progresión del cáncer de próstata.

Figura 6. Sistema de clasificación de Gleason

Figura 7. Mecanismo de acción de los andrógenos en células prostáticas tumorales.

Figura 8. Mecanismo que participan en la angiogénesis sostenida.

Figura 9. Proceso de la angiogénesis.

Figura 10. Biosíntesis de miRNAs.

Figura 11. Secreción de miRNAs circulantes.

Figura 12. Exosomas secretados a partir de células tumorales de estómago.

Figura 13. Biogénesis de los lncRNAs.

Figura 14. Expresión del miR-107 en los grupos de estudio.

Figura 15. Expresión del miR-107 en el grupo de estudio por etapa clínica del CaP.

Figura 16. Expresión del miR-107 en grupo de estudio estratificado por resistencia hormonal.

Figura 17. Curva Receptor Operador de la expresión relativa del miR-107.

Figura 18. Perfil de expresión de miRNAs en suero de pacientes con CaP.

Figura 19. Microensayo.

Figura 20. miRNAs predictores en grupo de comparación.

Figura 21. miRNAs para diagnóstico de CaP en orina.

Figura 22. Análisis de distribución de muestras.

Figura 23. Efecto del miR-107 *in vivo* e *in vitro*.

Figura 24. VEGF como uno de los blancos del miR-107.

Figura 25. Participación de miRNAs en la angiogénesis.

Figura 26. Mapas de calor que indican expresión de genes anti-angiogénicos en PRAD.

Figura 27. Análisis de enriquecimiento de interacciones de genes anti-angiogénicos.

Figura 28. Mapa de calor de la expresión de miRNAs en PRAD.

Figura 29. Mapa de calor de miRNAs sobreexpresados en PRAD.

Figura 30. Mapa de calor de la expresión del miR-107 en PRAD.

Figura 31. MiRNAs circulantes sobreexpresados en CaP.

Figura 32. Número de interacciones entre miRNAs sobreexpresados y genes anti-angiogénicos.

Figura 33. Diagrama de interacciones entre miRNAs sobreexpresados y genes disminuidos en CaP.

Figura 34. LncRNAs expresados en cáncer de próstata.

Figura 35. Expresión de MEG3 en PRAD.

Figura 36. Diagrama de regulación endógena en la angiogénesis sostenida del CaP.

Abreviaturas

CaP	Cáncer de próstata
c-miRNAs	microRNAs circulantes
CPCR	Cáncer de próstata resistente a la castración
FDA	Food and Drug Administration
FDR	False Discovery rate
HPB	Hiperplasia prostática benigna
lncRNA	RNAs largos no codificantes
miRNA	MicroRNAs
NIH	National Institutes of Health
OMS	Organización Mundial de la Salud
PSA	Antígeno prostático específico
PRAD	Adenocarcinoma de próstata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TCGA	The Cancer Genome Atlas
VE	Vesículas extracelulares

Resumen

El cáncer es la segunda causa de muerte a nivel mundial, ocasionando cada año un promedio de 10 millones de defunciones. La OMS lo ha definido como la presencia de mecanismos de proliferación y diseminación celular alterados, que pueden presentarse en cualquier lugar del cuerpo.

En México, el cáncer de próstata afecta a un gran porcentaje de la población masculina provocando 400,000 muertes y más de 1 millón de nuevos casos anualmente. La edad se considera uno de los principales factores de riesgo para padecer esta enfermedad.

En los pacientes con este tipo de cáncer, se presenta un rápido crecimiento del tumor y la migración de las células cancerosas hacia otros órganos, debido a la activación de la angiogénesis; mecanismo por el cual las células tumorales inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de una vasculatura preexistente con la finalidad de sobrevivir a la inanición y las condiciones de hipoxia.

Actualmente, se conoce bien el papel de los microRNAs en la regulación de diversos hallmarks del cáncer. Sin embargo, no se ha descrito a profundidad su participación en la angiogénesis en cáncer de próstata. Los miRNAs son una familia de RNAs pequeños no codificantes, conformados por aproximadamente 22 nucleótidos, cuya función es el silenciamiento postranscripcional de la expresión génica. Estos a su vez, pueden ser regulados por la presencia de RNAs largos no codificantes, que pueden actuar como esponjas o secuestradores de los miRNAs. Los lncRNAs son una familia de RNAs largos no codificantes conformados por más de 200 nucleótidos, que ejercen funciones de regulación endógena al unirse a DNA, RNA y proteínas.

En este trabajo se evaluó la regulación de los genes que participan negativamente en la angiogénesis, que ejercen los microRNAs sobreexpresados en el plasma de pacientes con cáncer de próstata. Así como, la función de algunos lncRNAs que se encuentran disminuidos tanto en la angiogénesis como en este tipo de cáncer.

Los resultados indican que los microRNAs circulantes sobreexpresados tanto en tejido como en el plasma de pacientes con cáncer de próstata (hsa-miR-107, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-221-3p y hsa-let7i-5p) inhiben la expresión de los genes anti-angiogénicos, permitiendo que los genes pro-angiogénicos promuevan este proceso. Asimismo, NEAT1 y LINC00963 son dos

lncRNAs que pueden actuar como esponjas de los miRNAs sobreexpresados en próstata. Sin embargo, al encontrarse disminuidos en este tejido, permiten la acción de silenciamiento génico por parte de los miRNAs, generando una regulación positiva sobre la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.

Abstract

Cancer is the second leading cause of death worldwide, causing an average of 10 million deaths each year. The WHO has defined it as the presence of altered cell proliferation and dissemination mechanisms, which can occur anywhere in the body.

In Mexico, prostate cancer affects a large percentage of the male population causing 400,000 deaths and more than one million of new cases annually. Age is considered a main risk factor for this disease.

In patients with this type of cancer, there is a rapid growth of the tumor and the migration of cancer cells to other organs, due to the activation of angiogenesis; mechanism by which tumor cells induce the formation of new blood vessels from a pre-existing vasculature to survive starvation and hypoxic conditions.

Currently, the role of microRNAs in the regulation of various cancer hallmarks is well known. However, its participation in prostate cancer angiogenesis has not been fully described. The miRNAs are a family of small non-coding RNAs, made up of approximately 22 nucleotides, whose function is the post-transcriptional silencing of gene expression. These, in turn, can be regulated by the presence of long non-coding RNAs, which can act as sponges or sequestrants of miRNAs. LncRNAs are a family of long non-coding RNAs made up of more than 200 nucleotides, which exert endogenous regulation by binding to DNA, RNA and proteins.

In this work, the regulation of genes that negatively participate in angiogenesis, exerted by overexpressed microRNAs in the plasma of prostate cancer patients, was evaluated. As well as the function of some lncRNAs that are diminished both in angiogenesis and in this type of cancer.

The results indicate that the overexpressed circulating microRNAs both in tissue and in the plasma of these patients (hsa-miR-107, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-221-3p and hsa-let7i-5p) inhibit the expression of antiangiogenic genes, allowing proangiogenic genes to promote this process. Likewise, NEAT1 and LINC00963 are at least two lncRNAs that can act as sponges for overexpressed miRNAs in the prostate. However, as they are decreased in this tissue, they allow the gene silencing action by miRNAs, generating a positive regulation on the sustained angiogenesis of prostate cancer.

1. Introducción

El cuerpo humano está formado por decenas de billones de células, las cuales crecen y se dividen para dar lugar a nuevas células según sea el requerimiento del organismo. Cuando las células envejecen o se dañan, mueren y las nuevas toman su lugar. Sin embargo, en un organismo tan complejo no todos los procesos ordenados siguen su curso, y cuando se alteran se pueden desarrollar distintas patologías que pueden llegar a afectar el funcionamiento general. Una de las enfermedades más comunes en el mundo es el cáncer, el cual puede iniciarse en cualquier lugar del cuerpo e invadir rápidamente otros sitios, provocando la pérdida de la homeostasis. Esta enfermedad afecta a un porcentaje importante de la población, considerándose la segunda causa de muerte a nivel mundial.

1.1 Cáncer

1.1.1 Definición

El cáncer, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), es un proceso de crecimiento y diseminación celular descontrolado, que puede presentarse en cualquier lugar del cuerpo (WHO, 2020).

El National Cancer Institute (NIH) se refiere al cáncer, como un término que se utiliza para referirse a un grupo de enfermedades en las que células anormales se dividen sin control, y que pueden propagarse a tejidos cercanos, o bien, a otros tejidos distantes a través del sistema sanguíneo y linfático (NIH, 2020).

Al conjunto de células cancerosas se le denomina tumor maligno, y existen diferentes tipos de estos, los cuales reciben nombres específicos dependiendo de su localización en el organismo (Skuse, 2015). El tipo de tumor más común se llama carcinoma, está formado por células epiteliales que cubren las superficies internas y externas del cuerpo. Los carcinomas pueden clasificarse dependiendo de los diferentes tipos de células epiteliales donde se desarrollan. El más común de los carcinomas es el adenocarcinoma, que es un cáncer que se forma en las células epiteliales encargadas de producir líquido o moco, por lo que suele desarrollarse en los tejidos glandulares presentes en mama, colon y próstata (NIH, 2020).

1.1.2 Características

Existen más de cien tipos de cáncer, por lo que, para definir su presencia en el 2000, Hanahan y Weinberg describieron seis marcas características que están presentes en cualquiera de ellos; éstas se conocen como “hallmarks del cáncer” (figura 1) y se mencionan a continuación (Hanahan y Weinberg, 2000):

- a) **Señal proliferativa sostenida.** Se presenta por el incremento de la actividad de receptores de membrana, a los que se unen ligandos que estimulan las vías de señalización de crecimiento y proliferación.
- b) **Evasión de supresor de crecimiento.** Las células cancerosas evaden los mecanismos que regulan negativamente el crecimiento celular, la mayoría son dependientes de genes supresores de tumores que se inactivan para permitir la proliferación descontrolada.
- c) **Permitir inmortalidad replicativa.** La alteración en los telómeros de las células cancerosas les permite evadir los mecanismos de muerte y senescencia, y desarrollar la capacidad de ser células inmortales con función replicativa ilimitada.
- d) **Activación de invasión y metástasis.** En el cáncer se disminuye la expresión de E-cadherina, cuya función es el ensamblaje celular y el mantenimiento de la quiescencia. Al estar disminuida, el desplazamiento celular induce la invasión hacia células de otros tejidos adyacentes o distantes.
- e) **Inducción de angiogénesis.** Los tumores requieren nutrientes, oxígeno y la capacidad de desechar residuos metabólicos y dióxido de carbono; estas necesidades son suplidas gracias a la neovascularización asociada al tumor generada mediante el proceso de angiogénesis.
- f) **Resistencia a la muerte celular.** En las células cancerosas la vía de señalización de las caspasas, la cual se activa al detectar señales de daño, es bloqueada para permitir su proliferación.

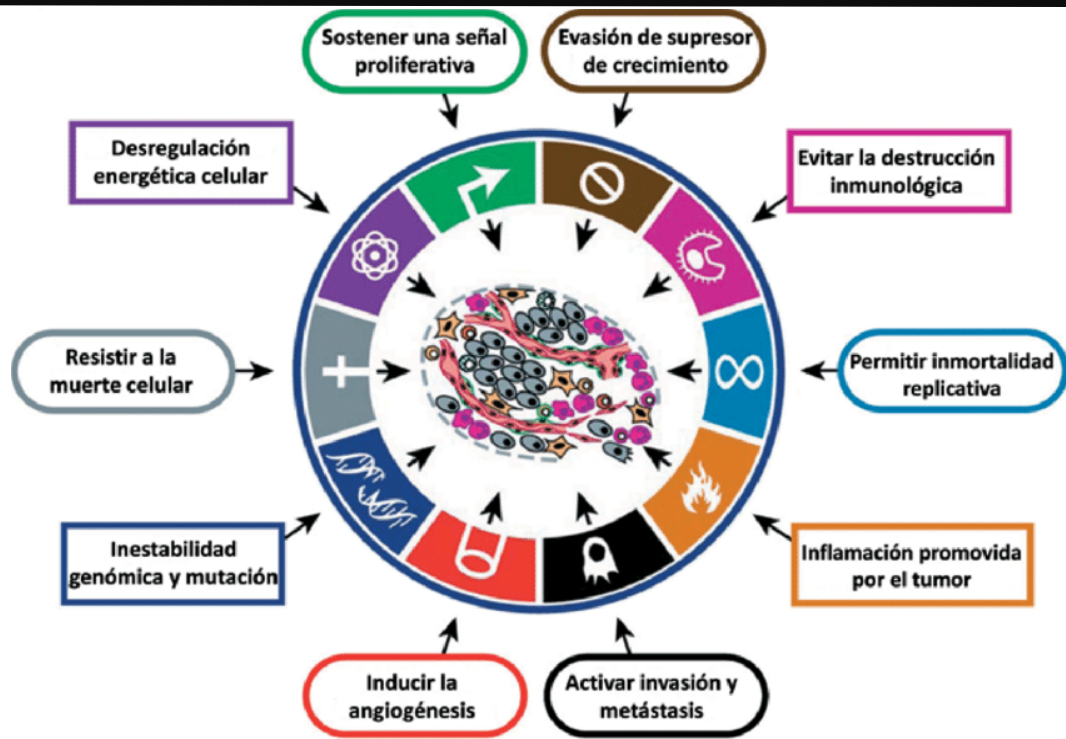


Figura 1. Hallmarks del cáncer (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

En el 2011, se añadieron dos características a las que denominaron marcas emergentes (Hanahan y Weinberg, 2011), las cuales son:

- g) **Desregulación celular energética.** La proliferación descontrolada de las células cancerosas implica el que las células realicen ajustes en el metabolismo energético para impulsar el crecimiento y división celular. Otto Warburg en los años 50's fue el primero en observar un metabolismo energético anormal en las células de cáncer, las cuales reprograman su producción de glucosa en presencia de oxígeno llevándolas a un estado denominado "glucólisis aeróbica" (Warburg, 1956).
- h) **Evasión de la destrucción inmune.** La teoría de la vigilancia inmunológica propone que las células y tejidos son monitoreados constantemente por el sistema inmunológico, responsable de detectar y eliminar las células dañadas, incluyendo las cancerosas. Sin embargo, estas células han desarrollado distintos mecanismos para evadir la destrucción inmunológica y garantizar su supervivencia (Hanahan y Weinberg, 2011).

La capacidad que poseen las células cancerosas para desarrollar estas características funcionales depende de dos características habilitadoras principales, la primera es el desarrollo de la inestabilidad genómica celular, la cual genera mutaciones aleatorias que incluyen

reordenamientos cromosómicos que dan lugar a raros cambios genómicos que alteran los procesos del ciclo celular. La segunda, es la inducción del proceso inflamatorio promovido por el tumor, el cual genera lesiones malignas impulsadas por células del sistema inmune. Ambas características habilitadoras promueven la progresión del tumor (Hanahan y Weinberg, 2011).

1.1.3 Epidemiología

El conocimiento obtenido en los últimos años sobre el desarrollo del cáncer indica que entre el 80 y el 90% de los tumores son ocasionados por la exposición a factores ambientales externos, denominados carcinogénicos. Algunos de estos factores de riesgo son (Lewandowska *et al.*, 2016):

- ✚ El consumo de tabaco.
- ✚ El uso nocivo de alcohol.
- ✚ Baja ingesta de frutas y verduras.
- ✚ Ingesta de componentes mutagénicos y carcinogénicos en alimentos.
- ✚ Falta de actividad física.
- ✚ Exposición a radiación ultravioleta.
- ✚ Presencia de infecciones de transmisión sexual.

De acuerdo con el último informe de la Organización Panamericana de la Salud, publicado en febrero del 2020 por motivo de la conmemoración del Día mundial del cáncer, en América Latina tan solo en el 2018, se registraron 3.8 millones de casos nuevos de la enfermedad y 1.4 millones de personas murieron por esta causa, por lo que se considera la segunda causa de muerte en esta región (PAHO, 2020). Se ha proyectado que para el 2025, habrán 19.3 millones de casos nuevos anualmente (GLOBOCAN, 2020).

Los tipos más recurrentes de cáncer en la población mexicana son: cáncer de mama, de pulmón, colorrectal, de próstata y de estómago (figura 2). En hombres mayores de 50 años, el cáncer de próstata es el de mayor incidencia y prevalencia (figura 3) (GLOBOCAN, 2020).



Figura 2. Número de casos nuevos de cáncer en 2020 en población mexicana.

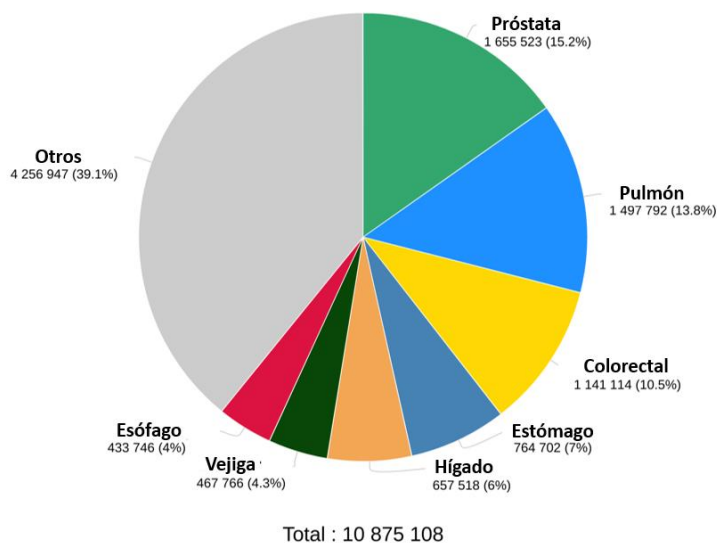


Figura 3. Número de casos nuevos de cáncer en 2020 en población masculina en México.

En el 2020, el Global Cancer Observatory (GLOBOCAN) reportó que en México se diagnosticaron más de 1 millón de nuevos casos de cáncer de próstata, de los cuales el 96% se presentaron en hombres mayores de 45 años; y fallecieron más de 400,000 hombres por esta causa (GLOBOCAN, 2020). La Sociedad Mexicana de Oncología (SMeO) considera que la elevada cifra de muertes se debe en parte a los diagnósticos tardíos, ya que el 60% de los casos son detectados en etapas avanzadas de la enfermedad (SMeO, 2018).

Aún existe una gran área de oportunidad para conocer todos los mecanismos celulares que se ven afectados por la presencia de cáncer, por lo que es importante seguir generando conocimiento que pueda aplicarse al diagnóstico, pronóstico y tratamiento de la enfermedad.

1.2 Cáncer de próstata

1.2.1 Definición

El cáncer de próstata (CaP) es una enfermedad multifactorial que provoca un crecimiento exacerbado de células prostáticas; éstas pueden invadir órganos adyacentes, y diseminarse a órganos distantes, principalmente, cerebro y huesos (NOM-048-SSA2-2017). La edad se considera un factor de riesgo para desencadenar la enfermedad (Wang *et al.*, 2019).

La próstata es un órgano pequeño del tamaño de una nuez, el cual se localiza debajo de la vejiga y rodea la uretra, produce un líquido que se convierte en parte del semen. Anatómicamente, se distinguen tres zonas: la zona central (zc), la zona transicional (zt) y la zona periférica (zp), la cual ocupa un 70% del volumen glandular (figura 4), y en la que se desarrollan entre el 60 y el 75% de los casos de cáncer. La zona periférica es la única región accesible al tacto rectal, ésta puede aumentar de tamaño cuando se presenta prostatitis, hiperplasia prostática benigna (HPB) o cáncer (Wang *et al.*, 2019).

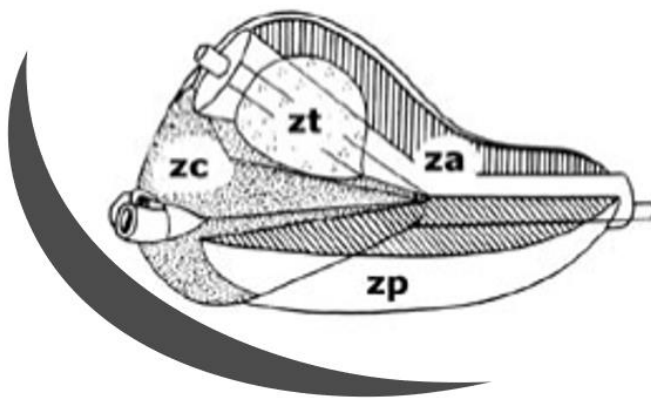


Figura 4. Esquema de la próstata. Se identifican cuatro zonas: zona central (zc), zona transicional (zt), zona accional (za) y zona periférica (zp) (Babinski *et al.*, 2002).

A nivel tisular, la próstata humana tiene un epitelio pseudoestratificado con tres tipos de células epiteliales diferenciadas: luminal, basal y neuroendócrina. Aún no se conoce el origen celular del cáncer de próstata, sin embargo, se ha visto que puede desarrollarse tanto en células madre como en las diferenciadas (LaTayia *et al.*, 2016). Asimismo, un estudio publicado por Wang y colaboradores en 2019 concluyó que el cáncer originado en células lumbinales es más agresivo y tiene un peor pronóstico que el originado en células basales (Wang *et al.*, 2019).

1.2.2 Características

La transformación de la próstata desde su estado normal hasta el desarrollo del cáncer sigue un proceso constituido por varios pasos. Inicia como neoplasia intraepitelial prostática (PIN), la cual está compuesta por conductos prostáticos con estructura benigna, cubiertos por células epiteliales con una citología atípica, ya que se encuentran los núcleos y nucleolos agrandados, pero con la membrana basal intacta (Shen y Abate, 2010). La PIN puede clasificarse en tres niveles, siendo el nivel 1 neoplasia leve y el nivel 3 neoplasia severa. La PIN3 es sucedida en la gran mayoría de casos por un adenocarcinoma localizado, el cual afecta las células basales y a medida que éstas son degradadas, las células cancerosas invaden toda la lámina basal desarrollando un adenocarcinoma localmente avanzado (Magdariaga *et al.*, 2011).

El cáncer de próstata localmente avanzado es capaz de hacer metástasis, primeramente, hacia los ganglios linfáticos adyacentes al tumor y luego hacia otros órganos distantes incluyendo hígado, pulmón y más comúnmente huesos. En hueso, las células cancerosas interaccionan con los osteoblastos, generando una destrucción ósea masiva que permite la supervivencia de estas células dañadas y el crecimiento del tumor (figura 5) (Shen y Abate, 2010).

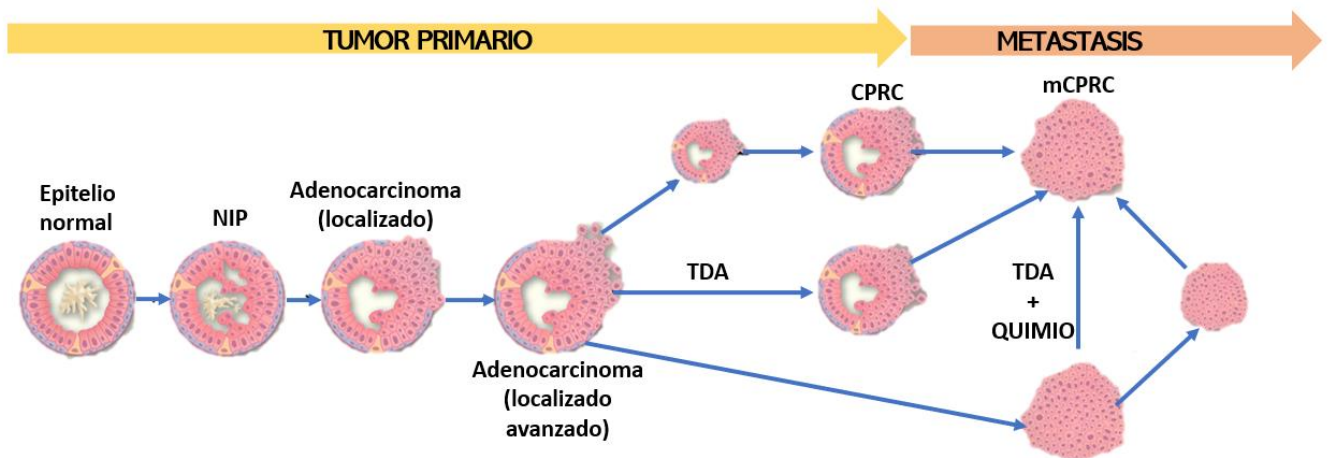


Figura 5. Progresión del cáncer de próstata. NIP: neoplasia intraepitelial prostática; TDA: terapia de deprivación androgénica; CPRC: cáncer de próstata resistente a la castración; mCPRC: cáncer de próstata resistente a la castración metastásico. (Modificado de Shen y Abate, 2010).

1.2.3 Síntomas

Generalmente, el cáncer de próstata al inicio de la enfermedad no provoca síntomas graves, por lo que es fácil confundirlo con alguna otra enfermedad causada por virus o bacterias, o bien, con la hiperplasia prostática benigna, la cual es un crecimiento de la próstata que afecta la vejiga y otros órganos adyacentes (American Cancer Society, 2020).

Los síntomas más comunes del cáncer de próstata son los siguientes (INFOCANCER, 2020):

- ✚ Disuria
- ✚ Poliuria
- ✚ Sangre en la orina o semen
- ✚ Disfunción eréctil
- ✚ Dolor en cadera, columna vertebral, tórax, u otras estructuras óseas.
- ✚ Debilidad en piernas, adormecimiento en pies
- ✚ Pérdida del control de vejiga o intestinos

La mayoría de los síntomas que caracterizan al cáncer de próstata se presentan en etapas intermedias o avanzadas del mismo, por lo que es importante que los hombres mayores de 40 años acudan a realizarse un examen de control anual para el diagnóstico temprano de la enfermedad (NOM-048-SSA2-2017).

1.2.4 Diagnóstico

En la actualidad, existen cinco métodos utilizados para el diagnóstico del CaP: tomografía axial computarizada, tacto rectal, resonancia magnética nuclear, ecografía transrectal guiada por ultrasonido y determinación de biomarcadores séricos (NOM-048-SSA2-2017).

La mayoría de estos métodos son altamente invasivos; la determinación de marcadores séricos es la prueba con menor grado de invasión, sin embargo, el único biomarcador autorizado por la FDA es el antígeno prostático específico (PSA) (NOM-048-SSA2-2017).

Los biomarcadores son moléculas que puede ser analizadas a partir de muestras de cualquier fluido o tejido biológico, cuyo aumento o disminución es consecuencia de la presencia de la enfermedad. Estos tienen la capacidad para predecir el diagnóstico, pronóstico y clasificación de la enfermedad, así como de determinar el tratamiento que se debe emplear para contrarrestarla (NIH, 2020).

La determinación del PSA a pesar de ser el método más recurrente, se considera una prueba de diagnóstico inespecífica (VPP=31.5%) dado que, todos los hombres poseen un nivel basal del mismo, cuyo valor debe ser ≤ 4 ng/mL. Asimismo, su inespecificidad radica en su incapacidad para diferenciar entre el cáncer de próstata resistente a la castración y el no resistente. El nivel de PSA se determina a partir de una muestra sanguínea en la que se mide la expresión del antígeno prostático en hombres generalmente mayores de 40 años (American Cancer Society, 2020). Debido a su bajo grado de invasión es el método de elección para la población masculina; se recomienda un control anual ya que, el PSA puede variar conforme aumenta la edad, al momento de realizar una actividad de alto impacto, por sufrir una caída, o en alteraciones patológicas como la HPB, la prostatitis y el cáncer, considerándose un valor entre 4.1 y 10ng/mL como puntos de riesgo (NOM-048-SSA2-2017). Debido al bajo valor predictivo positivo que posee, la medición de PSA no es una prueba suficiente para diagnosticar el cáncer de próstata, por lo que cuando se identificar un valor de riesgo, debe realizarse al menos un estudio adicional para diagnosticar la enfermedad (Catalona *et al.*, 1994).

El tacto rectal (DRE) es la segunda prueba más utilizada debido al poco material que se utiliza para realizarla. La mayoría de los casos de CaP se desarrolla en la zona periférica, la cual es palpable durante esta prueba y se puede identificar con claridad un agrandamiento en la próstata (Wang *et al.*, 2019). Generalmente, se utiliza como prueba confirmatoria después de haber obtenido valores altos de PSA (American Cancer Society, 2020).

En la tomografía axial computarizada (TAC), se utilizan rayos X para generar las imágenes transversales y detalladas de la próstata. Se utiliza una vez que el cáncer ha sido diagnosticado, con la finalidad de determinar si éste se ha propagado a los ganglios linfáticos adyacentes, o bien, para indicar si el cáncer ha regresado después de recibir tratamiento. A pesar de ser un método altamente utilizado, tiene un menor grado de confiabilidad respecto a la resonancia magnética nuclear debido al tipo de radiación utilizada (American Cancer Society, 2020).

Las imágenes creadas por resonancia magnética nuclear (RMN), son detalladas debido al uso de ondas de radio y de imanes potentes que generan imágenes de los tejidos blandos, por lo que, proporcionan una imagen clara de la próstata y de los tejidos adyacentes. La RMN permite determinar si un hombre con síntomas leves o con un valor de PSA medio debe realizarse una biopsia de próstata, de ser así, la RMN también permite localizar el área de la próstata en la

que existe mayor probabilidad de contener el cáncer. Asimismo, este tipo de estudio es útil para definir la etapa de la enfermedad (American Cancer Society, 2020).

Al realizar la ecografía transrectal guiada por ultrasonido (TRUS), se utiliza una sonda que libera ondas de sonido que penetran en la próstata y crea ecos, los cuales son detectados por la sonda y convertidos en una imagen en blanco y negro de la próstata. Esta prueba se emplea para detectar las áreas en las que se sospecha que está el cáncer, o bien, como una prueba confirmatoria después de haber obtenido un resultado anormal en el tacto transrectal o PSA (American Cancer Society, 2020).

1.2.5 Tratamiento

El tratamiento que se recomienda para el cáncer de próstata depende de la etapa en la que éste sea diagnosticado, del pronóstico de la enfermedad y de las características del tumor. Los tratamientos más utilizados pueden dividirse en cinco grupos, que se mencionan a continuación (Ochoa *et al.*, 2011):

- a) **Vigilancia activa.** Se refiere a la supervisión detallada del desarrollo del cáncer, la cual se logra mediante la determinación de los niveles de PSA cada seis meses y la realización del tacto rectal al menos una vez al año. No se administra ningún medicamento debido a que el cáncer no está causando ningún síntoma, es localizado y se espera un crecimiento muy lento del tumor (American Cancer Society, 2020). Este tratamiento se emplea en la primera etapa de la enfermedad, cuando el valor de Gleason es bajo (menor a 6) (Ochoa *et al.*, 2011).
- b) **Prostatectomía radical.** Se trata de la extirpación completa de la glándula prostática, además de una región del tejido circundante, incluyendo las vesículas seminales (American Cancer Society, 2020). Se emplea este tratamiento cuando se cree que el cáncer es localmente avanzado o metastásico. Generalmente, se realiza el procedimiento quirúrgico a partir de la segunda etapa y cuando el valor de Gleason es mayor a 7 (Ochoa *et al.*, 2011).
- c) **Radioterapia.** En este tipo de tratamiento, se utilizan rayos de alta energía para destruir a las células cancerosas. Puede utilizarse desde la segunda etapa de la enfermedad, incluso en cáncer localizado para evitar el crecimiento y diseminación del tumor (American Cancer Society, 2020). También se emplea después de la prostatectomía

radical para evitar que el cáncer sea recurrente. Es un tratamiento funcional en pacientes con una baja esperanza de vida (Ochoa *et al.*, 2011).

- d) Hormonoterapia.** Dado que en el cáncer de próstata los receptores de andrógenos tienen una participación importante para el crecimiento y proliferación de las células cancerosas, esta terapia es la más utilizada como tratamiento inicial para los pacientes (American Cancer Society, 2020). La intención es suprimir o disminuir la síntesis de los andrógenos principales, los cuales son: testosterona y dihidrotestosterona. Generalmente, se usa previa la radiación para disminuir el tamaño del tumor (Ochoa *et al.*, 2011).
- e) Combinación de tratamientos.** Ninguno de los tratamientos previamente mencionados puede curar al cáncer por sí solos, es indispensable un tratamiento concomitante para garantizar el control o desaparición de la enfermedad (Ochoa *et al.*, 2011). A menudo, se emplean la quimioterapia o inmunoterapia como fase final del tratamiento para el cáncer metastásico. La primera, se refiere a la administración de fármacos vía intravenosa o vía oral, que recorran el torrente sanguíneo para llegar a la mayor cantidad de células cancerosas posibles. La segunda, consta de la aplicación de una vacuna llamada Sipuleucel-T, cuya función es reforzar el sistema inmune para prevenir otras infecciones en el paciente, y también para responder eficientemente a la presencia de células cancerosas (American Cancer Society, 2020).

1.2.6 Clasificación

El cáncer de próstata puede clasificarse con base en: el sistema TNM, que define la propagación del tumor; la escala Gleason, que indica el grado de gravedad del tumor; y el estado clínico, donde se combinan los resultados obtenidos en las dos clasificaciones anteriores para definir la etapa del cáncer con base en el crecimiento y diseminación del tumor.

Para establecer la gravedad del CaP, en el informe patológico de una biopsia de próstata debe establecerse el grado de Gleason, este valor es importante porque determina el pronóstico de evolución de la enfermedad. La escala Gleason es un sistema de clasificación establecida por la Sociedad internacional de Patología Urológica (ISUP) que se basa en la diferenciación celular y la relación estroma-glándula del cáncer. Se le asigna un puntaje de 1 a 5 a la zona "más maligna" del cáncer y otro a la "menos maligna"; ambas se suman para obtener el valor final.

Por lo anterior, la escala de va del 2 al 10, siendo el 2 el cáncer más benigno (Figura 6) (Chen y Zhou, 2016).

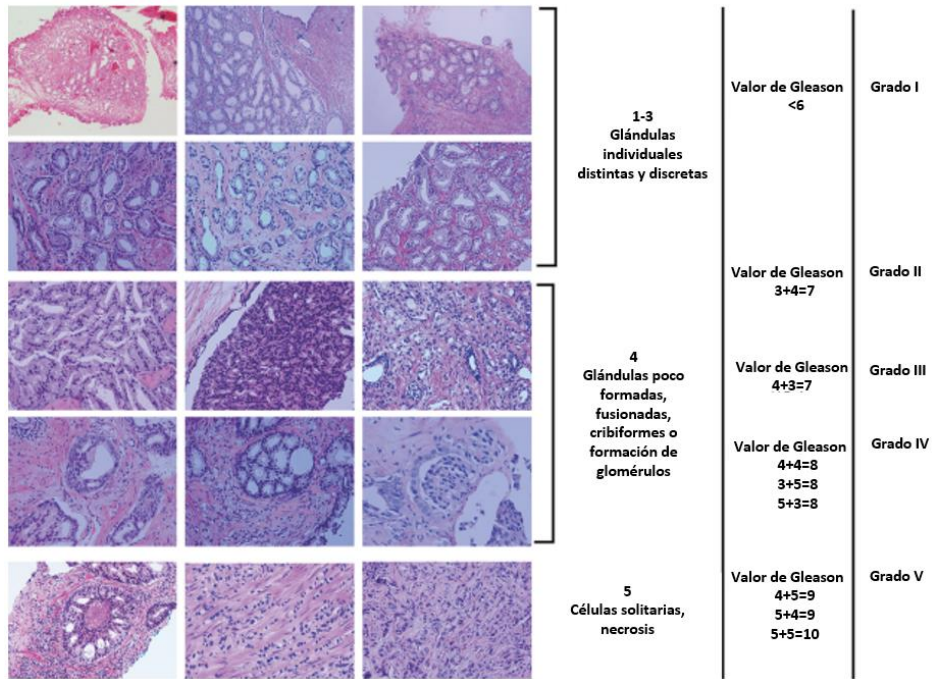


Figura 6. Sistema de clasificación de Gleason (Modificado de Chen y Zhou, 2016).

El sistema TNM diseñado por la *American Joint Committee on Cancer*, es un sistema de estadificación estandarizado para describir cuánto se ha propagado el cáncer, es decir, permite identificar si existe o no el desarrollo de metástasis. Se considera la extensión del tumor primario (T), si el cáncer se ha propagado a ganglios linfáticos adyacentes (N), la ausencia o presencia de metástasis (M), el valor del PSA al momento de realizar el diagnóstico y la puntuación de Gleason establecida en la biopsia (INFOCANCER, 2020).

La clasificación del CaP con base en su estado clínico se muestra en la tabla 1 (INFOCANCER, 2020).

Tabla 1. Clasificación del cáncer basada en el crecimiento y diseminación del tumor.	
Etapa del cáncer	Características
I	El médico no puede palpar ni ver el tumor por estudios de imagen, sin embargo, el cáncer es descubierto incidentalmente. El paciente puede tener un adenoma que se opera y en el informe del patólogo aparece el cáncer

	de próstata. El cáncer es local, la puntuación de Gleason es menor o igual a 6 y el valor de PSA menor a 10 ng/ml.
II A	Se detecta por biopsia con aguja o al tacto, debido al alto valor de PSA registrado (entre 10 ng/ml y 20 ng/ml). La puntuación de Gleason es menor o igual a 7 (Grado II) y se trata de un cáncer local que se encuentra solo en un lado de la próstata.
II B	El tumor puede detectarse mediante tacto rectal o por algún estudio de imagen, puede tener una puntuación de Gleason menor o igual a 8 (Grado IV) y un valor de PSA menor o igual a 20 ng/ml. El cáncer es local, pero se encuentra en ambos lados de la próstata.
III	Próstata que al tacto está dura y fija, porque el cáncer se extiende más allá de la cápsula, es localmente avanzado. El tumor puede tener cualquier puntuación de Gleason y cualquier valor de PSA.
IV	Cáncer de próstata que ya tiene metástasis al hacer el diagnóstico.

De acuerdo con el mecanismo utilizado por las células prostáticas tumorales para su proliferación y supervivencia, el cáncer de próstata puede dividirse en dos grandes grupos: CaP no resistente a la castración y CaP resistente a la castración (CPRC). El término “castración” en este sentido, no se refiere al procedimiento quirúrgico por medio del cual se extraen los testículos, sino a la participación de los receptores de andrógenos en el desarrollo del cáncer (Cookson *et al.*, 2019).

En el cáncer de próstata no resistente a la castración, las células tumorales proliferan por mecanismos dependientes de andrógenos, en los que la testosterona circulante penetra a la célula y es convertido a Dihidrotestosterona (DHT) por acción de la enzima 5- α -reductasa, metabolito que se une al receptor de andrógenos (RA) e induce su disociación de la proteína chaperona HSP90. El RA es traslocado al núcleo donde ejerce su función principal como factor de transcripción uniéndose a las regiones promotoras del genoma. En este sitio reclutará a otros factores de transcripción que actuarán como co-activadores o co-represores para la transcripción de genes que favorecen la supervivencia y proliferación celular y que inhiben la muerte por apoptosis (figura 7) (Martínez *et al.*, 2018). El tratamiento de primera línea utilizado para atender este tipo de cáncer de próstata es la terapia hormonal, con la finalidad de suprimir

los andrógenos y parar el desarrollo de la enfermedad, sin embargo, no siempre será funcional ya que existen pacientes que son resistentes a la castración y que no pueden ser identificados con el diagnóstico inicial (Cookson *et al.*, 2019).

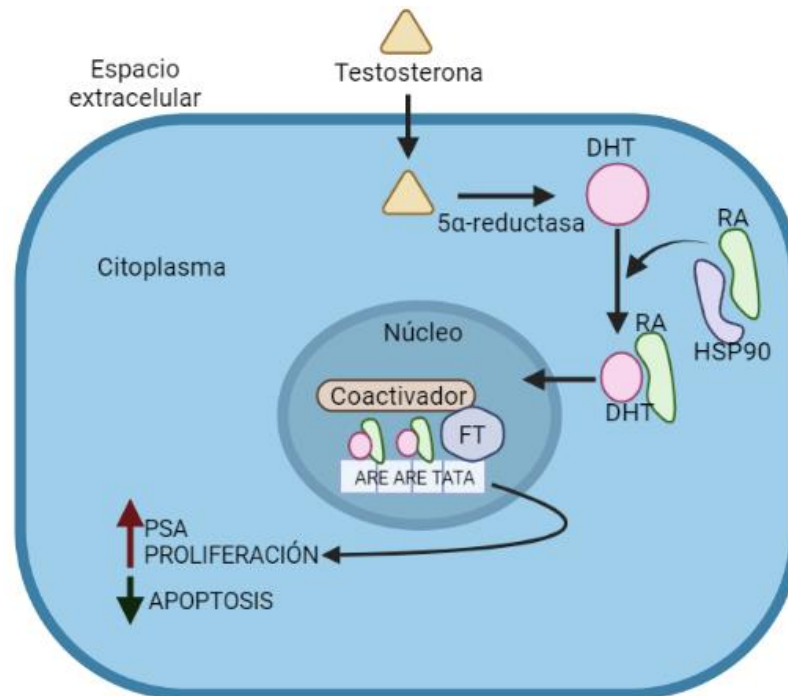


Figura 7. Mecanismo de acción de los andrógenos en células prostáticas tumorales. Creado en Biorender (<https://app.biorender.com>).

En el cáncer de próstata resistente a la castración (CPRC), la vía descrita anteriormente se encuentra alterada, por lo que los RA pueden ser activados aún en presencia de cantidades muy pequeñas de andrógenos circulantes. Los mecanismos moleculares que han sido reportados en este tipo de cáncer son los siguientes (Martínez *et al.*, 2018):

- a. Sobre-expresión del RA.
- b. Mutaciones en el RA.
- c. Producción localmente aumentada de andrógenos por las células tumorales.
- d. Activación del RA por ligandos no esteroideos tales como factores de crecimiento y citocinas.
- e. Expresión aberrante de co-activadores o co-represores.
- f. Procesamiento proteolítico del RA para generar una isoforma que es andrógeno independiente.
- g. Efecto de los microRNAs.

Los pacientes con CPRC se denominan hormono-resistentes, ellos deben recibir otro tipo de tratamiento desde el inicio de la enfermedad para controlar el crecimiento del tumor y evitar la rápida progresión a metástasis (Devlin y Mudryj, 2009; Devlin *et al.*, 2017).

1.3 Cáncer de próstata resistente a la castración

1.3.1 Definición

Este tipo de cáncer de próstata se denomina resistente a la castración debido a que el tumor puede crecer a pesar de existir en su microambiente niveles muy bajos o casi nulos de andrógenos circulantes, estos niveles son equivalentes a los que se logran con la extirpación de los genitales. Actualmente, no existe un registro epidemiológico adecuado del CPRC debido a la dificultad para diagnosticarlo (Kirby *et al.*, 2011).

1.3.2 Características

Los receptores de andrógenos son las estructuras más afectadas en el desarrollo de este tipo de cáncer, ya que como se ha mencionado con anterioridad, se ven alterados por distintos mecanismos moleculares. Este tipo de receptores se encuentran tanto en glándulas suprarrenales como en testículos, y pueden encontrarse en la membrana celular y dentro de la misma célula, donde ejercen su función principal como factores de transcripción (Martínez *et al.*, 2018). Los andrógenos son moléculas sintetizadas a partir del colesterol, por lo que pueden a travesar fácilmente la membrana celular debido a su naturaleza lipofílica.

En un artículo de revisión publicado por Kirby y colaboradores en 2011, se indica que más del 80% de los hombres que padecen este tipo de cáncer desarrollan metástasis y tienen una expectativa de vida menor a dos años después de su diagnóstico, dado que se extiende rápidamente hacia los huesos (tabla 2). Por lo anterior, se considera el tipo de cáncer de próstata de mayor agresividad. Entre el 10 y el 20% de los pacientes con CaP pueden desarrollar la resistencia a la castración después de cinco años de tratamiento con supresión de andrógenos (Kirby *et al.*, 2011).

Tabla 2. Características del cáncer de próstata resistente a la castración.

Prevalencia	10-20% de los pacientes con CaP, desarrollan CPRC después de 5 años de seguimiento.
Metástasis	~84% de los pacientes con CPRC presentan metástasis desde el diagnóstico del subtipo de la enfermedad. De aquellos que no presentan metástasis al ser diagnosticados, el 33% la desarrollará después de 2 años.
Sobrevivencia	El promedio de tiempo de vida de los pacientes diagnosticados con CPRC es de 14 meses.

1.3.3 Diagnóstico

La Asociación Europea de Urología (AEU) en 2011, publicó cinco posibles métodos de diagnóstico para el CPRC (tabla 3), sin embargo, estos no se encuentran estandarizados y no existe homología entre los médicos para su determinación e interpretación (Heidenreich *et al.*, 2008).

Tabla 3. Pruebas de diagnóstico para el CPRC.

1. Determinación de niveles séricos de castración de testosterona.
2. Tres aumentos consecutivos de PSA con 2 semanas de diferencia, resultando en dos incrementos del 50% sobre el nadir.
3. Abstinencia de andrógenos durante al menos 4 semanas.
4. Progresión del PSA a pesar de la disminución de hormonas.
5. Progresión rápida de lesiones óseas o en tejidos blandos.

Cualquiera de los métodos mencionados en la tabla 3 requieren al menos de un mes para ser funcionales, por lo que no se consideran eficientes, ya que el rápido desarrollo de la metástasis en este tipo de cáncer disminuye en gran medida la esperanza de vida de los pacientes.

1.3.4 Tratamiento

Para los pacientes que padecen cáncer de próstata resistente a la castración, es indispensable recibir el tratamiento adecuado desde el diagnóstico inicial de la enfermedad, de esta forma podría mejorar su calidad de vida y retrasar la progresión a metástasis. Actualmente, se emplean tres tratamientos para ello, los cuales se describen a continuación (Vishnu *et al.*, 2010):

- a) **Bloqueo completo de andrógenos.** La abiraterona es el único fármaco anti-androgénico autorizado por la FDA. Actúa sobre los receptores de andrógenos, inhibiendo su traslocación al núcleo. Este fármaco también inhibe la producción intratumoral de andrógenos, bloqueando a las enzimas que los sintetizan.
- b) **Quimioterapia.** La FDA ha aprobado dos medicamentos para este tratamiento, docetaxel y carbazitaxel, ambos son usados cuando el CPRC es metastásico. Se ha observado un incremento de un año en el tiempo de vida de los pacientes debido a la disminución de la progresión de la metástasis.
- c) **Inmunoterapia.** En el 2010, la FDA aprobó el uso de la vacuna sipuleucel-T (Provenge), que es un tipo de inmunoterapia activa basada en las propias células presentadoras de antígenos del paciente expresando la proteína fosfatasa ácida prostática. El tiempo de vida de los pacientes incrementa hasta dos años.

Aún no se ha desarrollado un medicamento específico para el CPRC, hasta el momento se considera incurables, ya que los tratamientos actualmente utilizados únicamente retrasan el crecimiento o diseminación del tumor hacia los huesos y otros órganos distantes. Sin embargo, se ha evaluado la actividad de distintos microRNAs que podrían funcionar como un tratamiento prometedor para revertir el CPRC (Zhang *et al.*, 2019).

1.4 Angiogénesis sostenida en el cáncer de próstata

Una de las características principales del cáncer de próstata, especialmente del CPRC es el incremento de la capacidad proliferativa de las células, lo cual induce el rápido crecimiento del tumor y su migración hacia órganos adyacentes y distantes. Esta capacidad de las células cancerosas se logra por la presencia de un microambiente tumoral adecuado, que permite el aporte suficiente de nutrientes y oxígeno a las células para crecer. Por lo anterior, es necesario que las células neoplásicas tengan la capacidad de modificar el estroma circundante y así crear

un ecosistema favorable. El microambiente tumoral está formado por una combinación de células tumorales y estromales, matriz extracelular y factores secretados, tales como citocinas y factores de crecimiento. Estas células están localizadas heterogéneamente en la matriz extracelular y se ven afectadas por el cambio de parámetros biofísicos, como el pH (Suazo y Casanovas, 2018). Poliak y colaboradores, han considerado que estos elementos del estroma son la clave para el pronóstico del cáncer y el desarrollo de los mecanismos que participan en la angiogénesis (Poliak *et al.*, 2009).

Los mecanismos comúnmente descritos para la neovascularización son la vasculogénesis y la angiogénesis por brote (figura 8). Ambos mecanismos se reactivan durante la progresión del tumor, ya que son indispensables para la formación y remodelación de vasos sanguíneos durante el desarrollo. La vasculogénesis se define como la formación *de novo* de vasos sanguíneos como consecuencia de la diferenciación de las células progenitoras vasculares, mientras que la angiogénesis de brote representa la formación de nuevas estructuras vasculares, a partir de una red de vasculatura preexistente. Recientemente, se ha descrito la participación de otros mecanismos de formación vascular que son menos frecuentes durante el crecimiento del tumor, pero que participan activamente en el desarrollo de la angiogénesis, estos son el mimetismo vasculogénico y la intususcepción (figura 8). El mimetismo vasculogénico se refiere a la capacidad de algunas células para iniciar el proceso de desdiferenciación para adoptar múltiples fenotipos celulares, incluidas propiedades endoteliales, mientras que la intususcepción vascular o crecimiento microvascular intususceptivo se define como un mecanismo de crecimiento intravascular que consiste en la división de vasos preexistentes en dos nuevas estructuras vasculares (Suazo y Casanovas, 2018). Éste fue descrito por primera vez por Caduff y colaboradores en la remodelación posnatal de los capilares pulmonares (Caduff *et al.*, 1986). Ninguno de los mecanismos es mutuamente excluyente, e incluso podrían actuar simultáneamente en la neovascularización patológica.

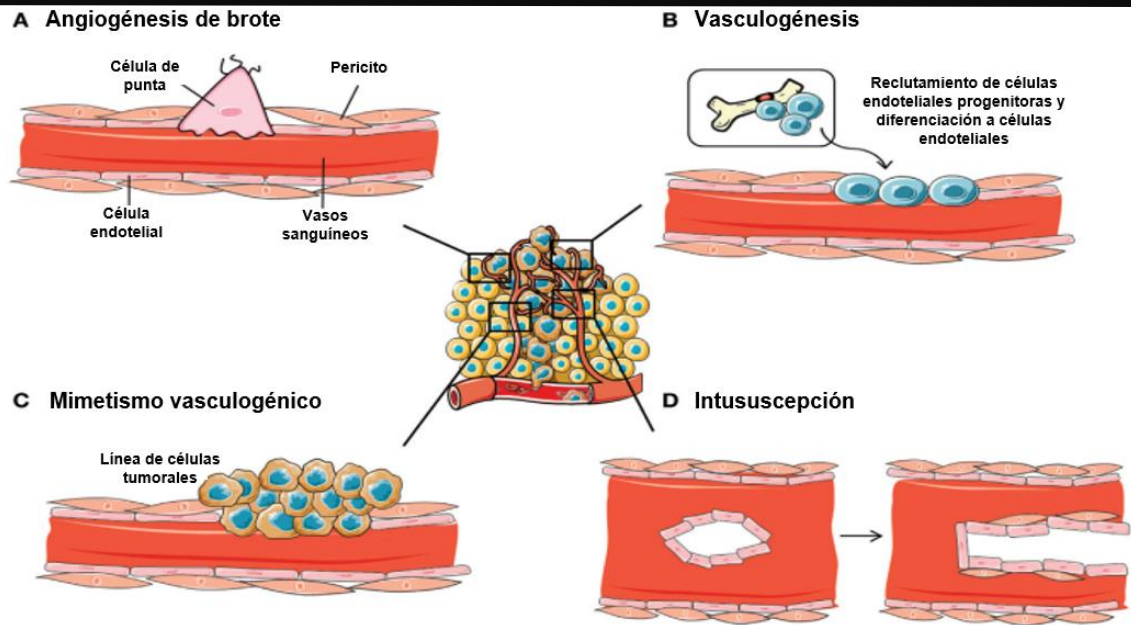


Figura 8. Mecanismos que participan en la angiogénesis sostenida (Modificado de Suazo y Casanovas, 2018).

Mediante la angiogénesis sostenida, las células tumorales evaden la inanición, ya que al formar su propia vasculatura crean un microambiente favorable, con la cantidad de nutrientes y oxígeno necesaria para su proliferación. Este proceso descrito hace más de 20 años, cuyas protagonistas son las células endoteliales, consta de múltiples pasos que se describen a continuación (figura 9) (Martínez y Herrera, 2006; Risau *et al.*, 1997):

- Las células endoteliales (EC) precursoras se unen para dar origen a los nuevos vasos sanguíneos.
- Estas células se ensamblan para formar una estructura tridimensional primitiva de capilares pequeños, este proceso se conoce como vasculogénesis.
- El plexo vascular se expande progresivamente como resultado de la formación de los nuevos vasos.
- El plexo vascular se remodela y forma una red vascular altamente organizada de vasos sanguíneos grandes que se ramifican en los más pequeños.
- Los canales formados son recubiertos por células del músculo liso y por pericitos, con la finalidad de regular la contracción y dilatación de los vasos sanguíneos, proporcionar resistencia y regular la perfusión de los vasos.

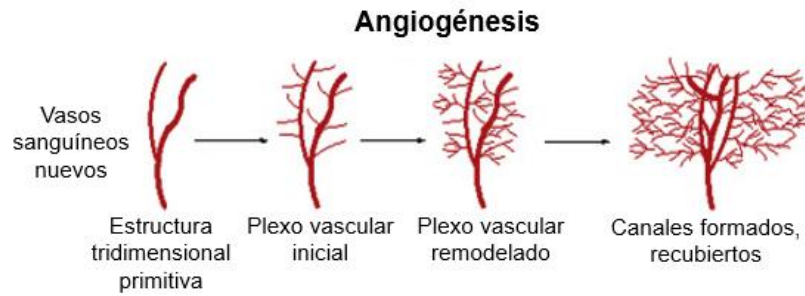


Figura 9. Proceso de la angiogénesis (Tomado de Ferrara, 2002).

En el cuerpo humano existen dos tipos de angiogénesis, la fisiológica y la patológica, ambas se desarrollan en distintas condiciones. La angiogénesis fisiológica, ocurre en todos los mamíferos de una forma similar, se presenta durante la embriogénesis, cuando está creciendo la vasculatura, y continúa en el desarrollo temprano después del nacimiento, para proveer las cantidades de oxígeno y nutrientes necesarias para el crecimiento y maduración de los órganos. Es fundamental también para el crecimiento del esqueleto y para la formación del hueso endocondral (Ferrara, 2002). En mujeres menstruantes este tipo de angiogénesis ocurre en el ovario, ya que tanto el crecimiento folicular como el desarrollo del cuerpo lúteo dependen de la proliferación de nuevos vasos capilares. Asimismo, este proceso está presente en la placenta, durante el embarazo (Martínez y Herrera, 2006).

La angiogénesis patológica, aparece cuando se sobrepasa el equilibrio entre las moléculas pro-angiogénicas, las cuales estimulan el proceso, y las anti-angiogénicas, que lo inhiben (Ferrara, 2002). Por un lado, cuando este proceso es estimulado se conoce como angiogénesis activada, y la sobreactividad inducida en las células endoteliales puede generar distintas enfermedades autoinmunes, asma, diabetes, obesidad y cáncer. Por otro lado, cuando el proceso se encuentra disminuido por una baja actividad de las células endoteliales, se conoce como angiogénesis inhibida, y está asociada a la malformación y regresión de los vasos sanguíneos, generando distintos tipos de isquemias (Martínez y Herrera, 2006).

La formación de la vasculatura nueva, incluye diversas moléculas que participan en la regulación positiva de la angiogénesis, tales como: el factor 1-alfa inducible por hipoxia (HIF1 α), el factor de crecimiento transformante beta (TGF β), las angiopoyetinas (ANGPT1 y ANGPT2), el plasminógeno (PLG), endostatinas, entre otros (Flores *et al.*, 2016). Sin embargo, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), es el principal regulador de las células endoteliales

vasculares y por lo tanto de la formación de los nuevos vasos sanguíneos (Martínez y Herrera, 2006).

1.5 MicroRNA's (miRNAs)

Estudios previos han demostrado que los miRNAs son prometedores biomarcadores séricos, debido a que pueden encontrarse aumentados o disminuidos como resultado de alteraciones patológicas en diversas enfermedades, incluyendo el cáncer. Asimismo, se ha descrito que los microRNAs tienen una participación fundamental en distintos procesos celulares, regulando el desarrollo de los hallmarks del cáncer en células, tejido y circulación (Parvae et al., 2016). Los miRNAs que pueden cuantificarse en distintos fluidos biológicos se conocen como miRNAs circulantes (c-miRNAs) (Mitchell et al., 2008).

1.5.1 Características

Los microRNAs (miRNAs), son una familia de RNA pequeños no codificantes, compuestos por aproximadamente 22 nucleótidos. Su función es la regulación post-transcripcional de la expresión génica; mediante la unión de su región semilla, la cual consta de 6 a 8 nucleótidos, a la región 3'UTR de los RNA mensajeros blanco. Los miRNAs pueden controlar la traducción y la estabilidad de los transcritos (De la Rosa et al., 2018).

Los genes que codifican para miRNAs están localizados a lo largo de todo el genoma. Existen distintos mecanismos por los cuales se lleva a cabo su biogénesis, los cuales se dividen en: canónicos y no canónicos, dependiendo de las proteínas que participan en su procesamiento (De la Rosa et al., 2018).

1.5.2 Biogénesis

La biosíntesis de los miRNAs, generalmente, implica la generación de un transcrito primario de aproximadamente 70 nucleótidos, llamado pri-miRNA, el cual es una estructura en forma de tallo-burbuja que cuenta con una cabeza (CAP) y cola poliadenilada. Éste es generado por la RNA Polimerasa II (Pol II), y procesado por el complejo microprocesador Drosha/DGCR8 para generar al pre-miRNA, el cual pierde la estructura CAP y la cola de poliA. El pre-miRNA posee dos nucleótidos salientes en el extremo 5', que es una marca propia de las RNAsas de tipo III necesaria para su reconocimiento y exportación hacia el citoplasma, lo cual ocurre por medio de la exportina-5, en un transporte dependiente de RanGTP. Una vez en el citoplasma, el asa del pre-miRNA es reconocida por el complejo DICER/TRBP y esto permite su procesamiento

para obtener un miRNA maduro cuya estructura es de doble cadena (Esparza y Velázquez, 2016). El miRNA maduro activa un complejo protéico llamado complejo silenciador inducido por RNA (RISC) para llevar a cabo su función de silenciamiento génico al unirse por complementariedad parcial o total a un transcrito maduro blanco. Se sabe que tanto la cadena líder como la cadena complementaria pueden regular la traducción de los RNAm blanco (figura 10) (De la Rosa *et al.*, 2018).

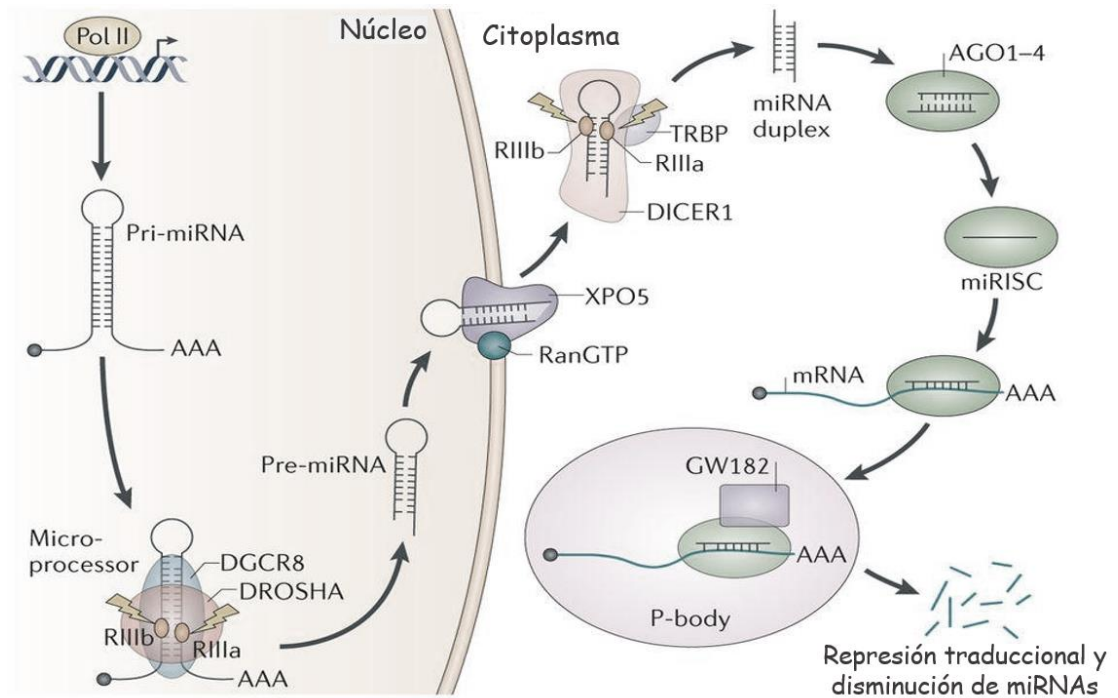


Figura 10. Biosíntesis de miRNAs (Modificado de Lin y Gregor, 2015)

1.5.3 miRNAs circulantes

Los c-miRNAs han sido detectados en forma estable en distintos fluidos corporales, incluyendo el suero, plasma, orina, saliva, semen y leche materna (EVmiRNA, 2020); fueron descritos por primera vez por Mitchell y colaboradores en el 2008 (Mitchell *et al.*, 2008). No se conocen con exactitud todos los posibles mecanismos de secreción, sin embargo, se sabe que son transportados principalmente en exosomas o microvesículas asociadas a proteínas como Ago2 o Npm1, a lipoproteínas, o a cuerpos apoptóticos (figura 11) (Chen *et al.*, 2012). Adicional ello, estos miRNAs pueden ser secretados de forma pasiva por células dañadas o necróticas en respuesta a alguna alteración fisiológica o patológica (Mitchell *et al.*, 2008).

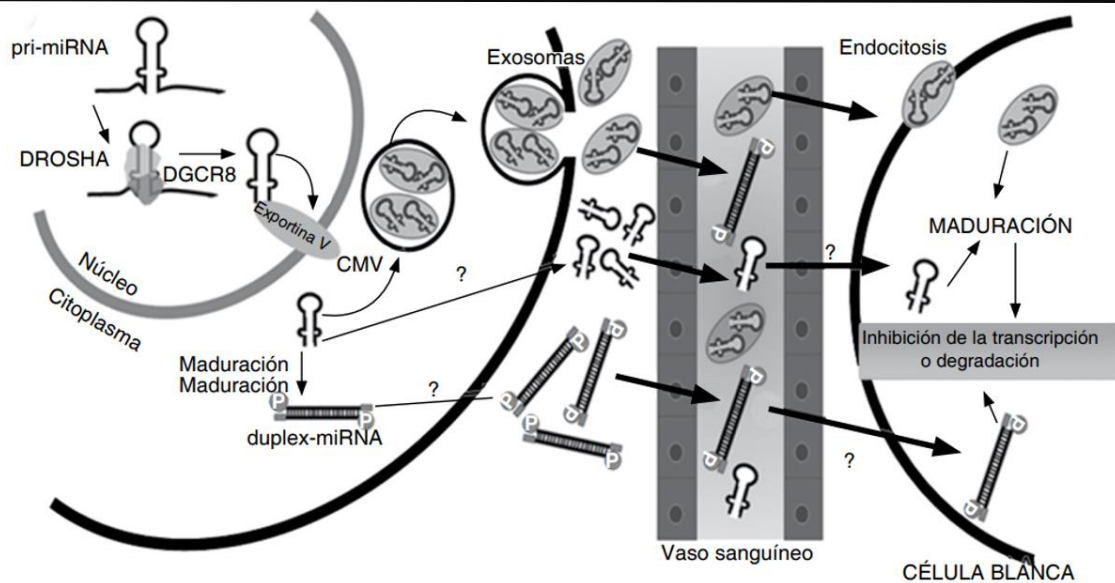


Figura 11. Secreción de miRNAs circulantes (Tomado de Cortés et al., 2009)

Lo anterior, sugiere que los miRNAs circulantes actúan como un sistema de comunicación intercelular autocrina, paracrina y endocrina, regulando la expresión génica y el fenotipo de las células receptoras (Chen *et al.*, 2012). Los c-miRNAs pueden ser secretados en respuesta a una situación de estrés celular, en alteraciones fisiológicas y en el desarrollo de diversos estados patológicos (Mitchell *et al.*, 2008).

1.5.4 Exosomas

La secreción de miRNAs contenidos en vesículas extracelulares (VE) es la vía más común. Estas vesículas incluyen a los exosomas y las microvesículas, ambas actúan como vías de comunicación célula-célula y pueden servir como posibles biomarcadores de diversas enfermedades (Liu *et al.*, 2018).

Los exosomas son vesículas extracelulares de entre 30 nm y 120 nm que son secretadas por todo tipo de células (figura 12), incluidas las células tumorales. Los exosomas pueden contener biomoléculas tales como: proteínas, lípidos, RNAm y microRNA (Ren *et al.*, 2019). Los miRNAs son las biomoléculas mejor estudiadas dentro de los exosomas, y se sabe que sus perfiles de expresión son específicos para el tipo celular del que se trate y la patología que se presente, por lo anterior, se ha demostrado que el perfil de expresión de miRNAs dado por los exosomas y su estudio será útil para seguir explorando sus funciones como posibles biomarcadores, e incluso, para el tratamiento del cáncer y de otras enfermedades (Liu *et al.*, 2018).

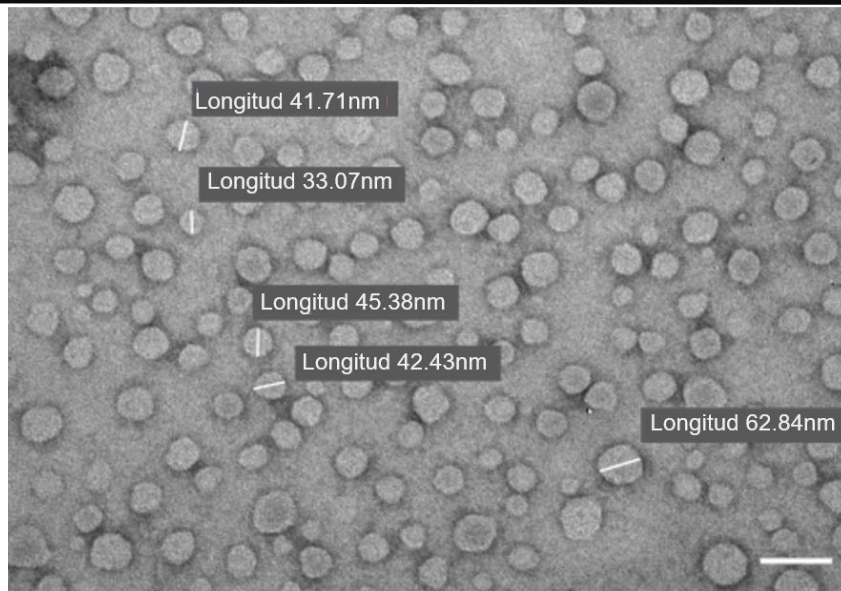


Figura 12. Exosomas secretados a partir de células tumorales de estómago (Modificado de Ren *et al.*, 2019)

Recientemente, han sido publicados una gran cantidad de artículos respecto al uso de los exosomas para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer. En modelos murinos se ha probado el uso de exosomas aislados de células mesénquimales y epiteliales como tratamiento localizado, es decir, que son inyectados en el órgano donde se presente el cáncer para funcionar como vehículos especializados de carga de drogas terapéuticas (Kalluri y LeBleu, 2020).

A diferencia de otras vesículas extracelulares, los exosomas tienen la capacidad de entrar a otras células y liberar la carga funcional sin causar toxicidad, permitiendo una adecuada respuesta inmune (Kalluri y LeBleu, 2020).

Asimismo, se ha visto en modelos murinos con cáncer de mama, glioma y cáncer de páncreas, que los exosomas cargados con microRNAs o siRNAs (RNAs pequeños interferentes) específicos, funcionan como tratamiento anticáncer al permitir la liberación localizada de estas moléculas que inducen el silenciamiento génico de los RNAm que favorecen el crecimiento del tumor (Kalluri y LeBleu, 2020).

1.6 RNAs largos no codificantes (lncRNAs)

La última década se ha descrito el papel de otra familia de RNAs en la regulación endógena de los diversos mecanismos celular, y se ha visto que esta regulación puede ser específica del sitio biológico donde esté ocurriendo. Esta familia de RNAs largos no codificantes está

compuesta por RNAs de más de 200 nucleótidos que pueden regular la expresión génica en múltiples niveles, ya que pueden interactuar con el DNA, RNA y las proteínas (Statello *et al.*, 2020).

La mayoría de las especies de lncRNA son transcritas de forma similar a los RNA mensajeros, por la RNA Polimerasa II. Muchos de ellos tienen la estructura CAP en el extremo 5' y cola poliadenilada en el extremo 3'. Los RNA largos no codificantes que son transcritos por una RNA polimerasa II ineficaz o que sufre alteraciones en su fosforilación, se procesan de forma errónea y se retienen en el núcleo, generando la degradación o unión de la cromatina, teniendo un empalme ineficiente y alterando el reclutamiento de factores de transcripción. Los lncRNAs que contienen uno o pocos exones y que se empalman correctamente, se exportan al citoplasma por el factor de exportación de RNA nuclear 1 (NXF1) (Statello *et al.*, 2020). La mayoría de los lncRNAs carece de potencial para codificar proteínas (Statello *et al.*, 2020). Sin embargo, se ha visto que algunos pueden codificar para micropéptidos (Anderson *et al.*, 2015).

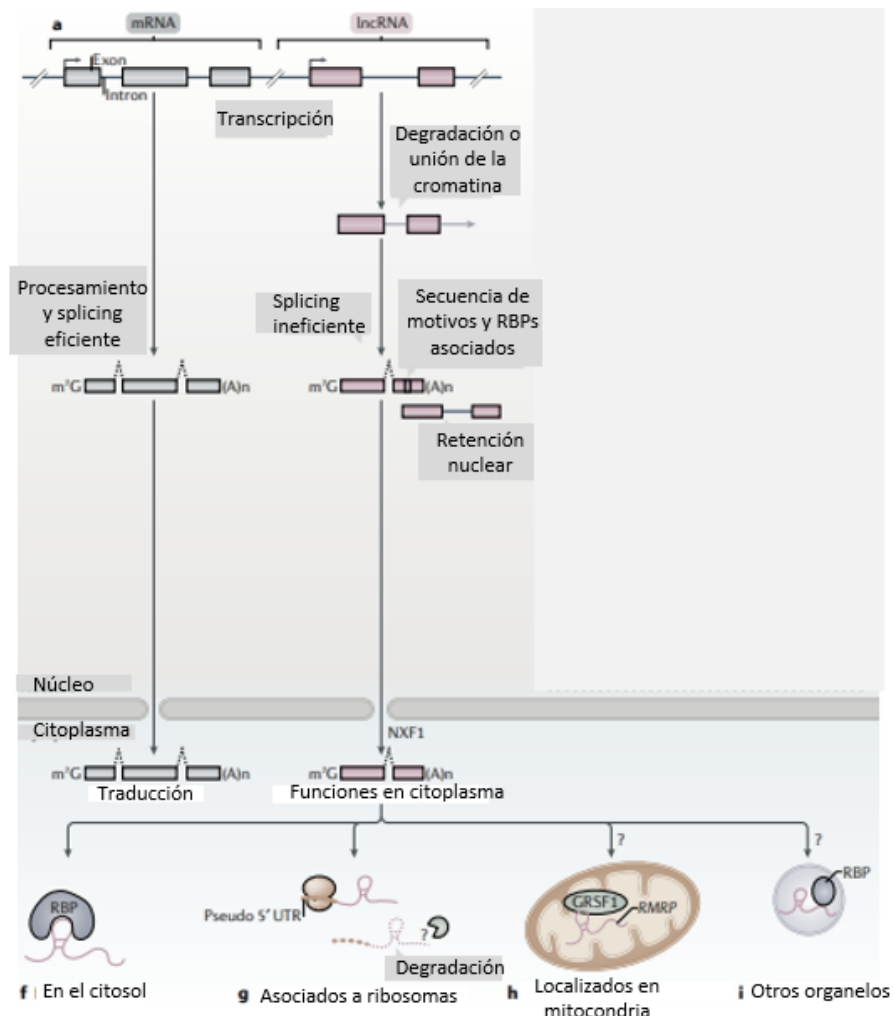


Figura 13. Biogénesis de los lncRNAs (Modificado de Statello *et al.*, 2020)

1.6.1 Regulación de los lncRNAs

Los RNAs largos no codificantes pueden ejercer distintos mecanismos de regulación endógena, al modular la estructura y función de la cromatina y la transcripción de genes cercanos y distantes, afectando de esta forma el empalme, la estabilidad y la traducción del RNA. Adicional a esto, pueden estar involucrados en la formación y regulación de orgánulos y condensados nucleares (Statello *et al*, 2020).

Además de sus funciones en la regulación de la transcripción y organización nuclear, los lncRNA controlan varios aspectos de la expresión génica actuando principalmente a través de su capacidad para establecer interacciones con proteínas y ácidos nucleicos. Están involucrados también en la regulación postranscripcional secuestrando proteínas a través de su unión a motivos o estructuras de secuencia de RNA para formar complejos protéicos específicos de lncRNA (lncRNP), que producen una alteración del empalme y el recambio del RNA mensajero (RNAm) y, en determinados contextos biológicos, la modulación de las vías de señalización. Otros, pueden emparejarse directamente con otros RNA y posteriormente reclutar proteínas implicadas en la degradación del RNAm (Statello *et al.*, 2020).

Finalmente, algunos lncRNAs pueden tener sitios complementarios de microRNAs y así regular la expresión génica como RNA endógenos competitivos o "esponjas" de miRNAs, reduciendo la accesibilidad de estos a los RNAm, y generando como consecuencia la alteración de diversos procesos fisiológicos que conducen al desarrollo de diversas patologías como el cáncer (Statello *et al*, 2020).

1.6.2 lncRNAs en angiogénesis

En la última década, el papel de los RNAs largos no codificantes en el desarrollo de los hallmarks del cáncer ha sido ampliamente estudiado. Se ha visto que la regulación que ejercen sobre estos, incluyendo la angiogénesis, es fundamental para promover o inhibir los distintos procesos celulares. A continuación, se mencionan algunos ejemplos sobre la regulación que ejercen algunos lncRNAs en la angiogénesis en distintos tipos de cáncer:

- La vía de señalización de VEGF juega un papel fundamental en el desarrollo de la angiogénesis, ya que es el principal regulador de las células endoteliales, por lo que los mecanismos y moléculas que la regulan han sido ampliamente estudiadas. Se ha visto que

la sobreexpresión de los lncRNAs SNHG1 y SNHG12 afectan la supervivencia celular y la angiogénesis en las células endoteliales microvasculares del cerebro (BMEC) bajo privación/reoxigenación de oxígeno-glucosa (OGD/R). Asimismo, se ha demostrado que la acción de estos lncRNAs depende de la presencia del miR-199a-5p, que se une al RNAm de VEGFA, regulando positivamente esta vía (Hou *et al.*, 2018).

- Por otro lado, en células madre mesenquimales (MSCs), se ha visto que la presencia del lncRNA H19 favorece la supervivencia celular al actuar como esponja del miR-199a-5p, mejorando también la capacidad angiogénica (Hou *et al.*, 2018).
- La vía de señalización Notch es una vía altamente conservada que afecta la diferenciación, proliferación celular y apoptosis. Yu y colaboradores en 2017, encontraron que la inhibición del lncRNA XIST activa la angiogénesis en glioma. XIST actúa como esponja del miR-137, el cual inhibe la angiogénesis al silenciar al gen que codifica para la proteína FOXC1, la cual regula directamente al promotor de Dll4 y actúa río arriba de la vía de señalización de Notch (Yu *et al.*, 2017).
- Finalmente, el silenciamiento del lncRNA HULC reduce significativamente la viabilidad y migración celular, así como la formación de tubos en las células HUVEC, que son factores que indican que favorecen la angiogénesis. Yin y colaboradores en 2018, encontraron que HULC funcionaba como una esponja molecular para el miR-124, y que el gen que codifica para la proteína MCL-1 era blanco de este miRNA. MCL-1 es un miembro único de la familia Bcl-2 y exhibe funciones oncogénicas en tumores al mejorar la angiogénesis mediante la activación de la vía de señalización PI3K / AKT (Yin *et al.*, 2018).

2. Antecedentes particulares

Distintos estudios han demostrado que en el cáncer de próstata la expresión de distintos microRNAs se encuentra alterada, por lo que, en algunos de ellos se han propuesto como posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico, e incluso como posibles tratamientos para esta enfermedad. Algunos de estos miRNAs han podido identificarse en fluidos biológicos de pacientes con este tipo de cáncer, tales como suero (De la Rosa, 2018; Lodes *et al.*, 2009), orina (Lechknov *et al.*, 2018), y semen (Barceló *et al.*, 2019). Se sabe que en el cáncer de próstata los microRNAs juegan un papel fundamental al activar y regular diversos procesos celulares; esta regulación se ha evidenciado en células (Zhang *et al.*, 2019), tejido tumoral (Kristensen *et al.*, 2016), suero (Mitchell *et al.*, 2008) y exosomas (Mihelich *et al.*, 2015) (Tabla 4). Sin embargo, no se ha descrito la participación de algunos de estos microRNAs circulantes en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata, ni la regulación que ejercen los lncRNAs sobre ellos.

Tabla 4. Participación de microRNAs en el cáncer de próstata.

miRNA	Origen de la muestra	Expresión en CaP	Referencias
let-7a, miR-24, miR-93, miR-106b, miR-130b, miR-146a	Suero	Incrementado	Mihelich <i>et al.</i> , 2015
miR-375, miR-663b, miR-615-3p, miR-425-5p, miR-663a, miR-182-5p, miR-183-5p	Tejido	Incrementado	Kristensen <i>et al.</i> , 2016
miR-205-5p, miR-221-3p, miR-222-3p, miR-376c-3p, miR-136-5p, miR-455-3p, miR-455-5p, miR-154-5p	Tejido	Disminuido	Kristensen <i>et al.</i> , 2016
miR-16, miR-92a, miR-103, miR-107, miR-197, miR-34b, miR-328, miR-485-3p, miR-486-5p, miR-92b, miR-574-3p, miR-636, miR-640, miR-766, miR-885-5p	Suero	Incrementado	Lodes <i>et al.</i> , 2009
miR-23b, miR-26b, miR-30c, miR-155, miR-181d, miR-193a-5p, miR-200b-5p, miR-205, miR-221, miR-221-5p, miR-222, miR-224, miR-335, miR-374a, miR-374b, miR-455-3p, miR-505	Tejido	Disminuido	He <i>et al.</i> , 2013

Se ha visto que la sobreexpresión de los miRNAs let-7a, miR-106b y miR-146a inhibe la metástasis, ya que regulan negativamente la transición epitelio-mesénquima (Sekhon *et al.*, 2016). Por otro lado, la sobreexpresión del miR-107, el cual pertenece a la familia del miR103/107, inhibe la proliferación y supervivencia celular, en las líneas celulares DU145 y PC3, ambas hormono-resistentes (Zhang *et al.*, 2019). Los miR-221 y miR-222, se encuentran también sobreexpresados en tejido tumoral y en células cancerosas, y se ha evaluado su función en la metástasis y proliferación celular, inhibiendo ambos mecanismos (Yang *et al.*, 2014).

En el 2017, se realizó un estudio en el mismo equipo de trabajo en el que se evaluó la abundancia del miR-107 en el suero de pacientes con cáncer de próstata, así como su participación en la migración celular. En un total de 73 biopsias líquidas de voluntarios que participaron en el estudio, 38 eran de pacientes con cáncer de próstata que se clasificaron en distintas etapas de la enfermedad, mientras que los 35 restantes correspondieron a voluntarios sanos. Los criterios de inclusión para cada grupo se presentan en la tabla 5 (De la Rosa, 2018).

Tabla 5. Criterios de inclusión de voluntarios para estudio.

Criterios de inclusión	
Casos	Controles
<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes > 40 años • Con diagnóstico de cáncer confirmado • Valor de PSA > 4 ng/mL • Puntuación de Gleason > 6 	<ul style="list-style-type: none"> • Pacientes > 40 años • Clínicamente sanos • Valor de PSA < 4 ng/mL • Se excluyen pacientes con historial de CaP familiar (Padre y/o tíos paternos, hermanos)

Inicialmente, se evaluó la expresión relativa del miR-107 entre casos y controles mediante la técnica de RT-PCR en tiempo real a partir del suero extraído de las muestras sanguíneas; se determinó que el miR-107 se encuentra expresado aproximadamente 8 veces más en los pacientes con CaP, respecto a los controles (figura 14) y esta diferencia es estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

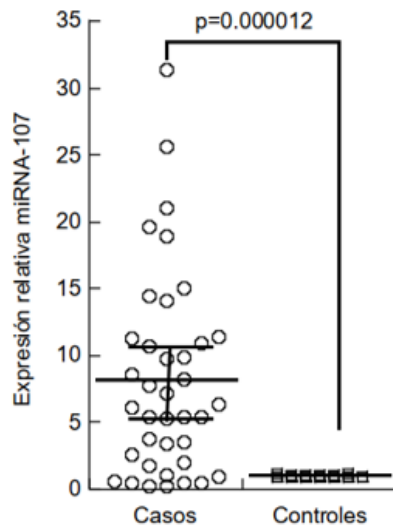


Figura 14. Expresión del miR-107 en los grupos de estudio (De la Rosa, 2018).

Posteriormente, al analizar los resultados de acuerdo con la etapa clínica en la que se encontraban, se determinó que la concentración del miR-107 es significativamente mayor ($p < 0.05$) en los pacientes que se encuentran en la etapa clínica IV, respecto a las otras etapas (figura 15).

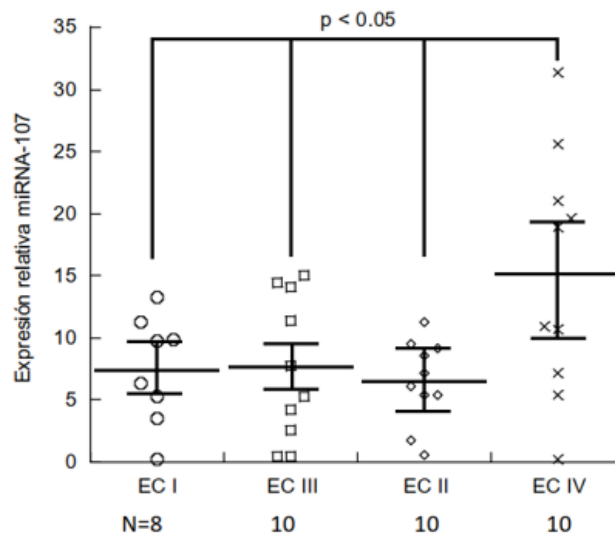


Figura 15. Expresión del miR-107 en el grupo de estudio por etapa clínica del CaP (De la Rosa, 2018).

Asimismo, se analizaron los resultados clasificando a los pacientes con respecto a la resistencia a la castración y se encontró que, en los pacientes hormono-resistentes la abundancia de este miRNA es significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto al grupo de pacientes que no presenta la resistencia a la castración (figura 16).

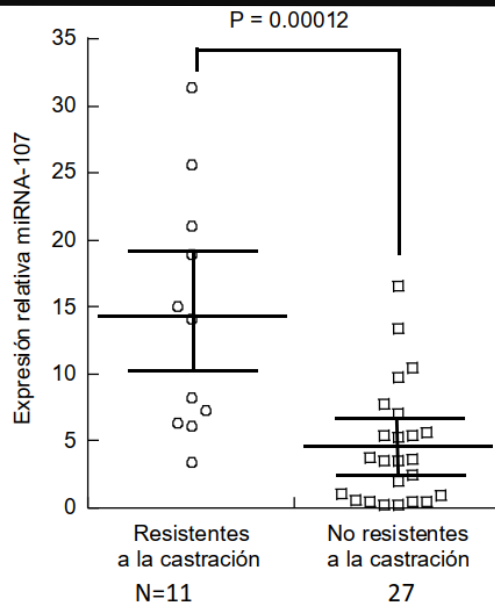


Figura 16. Expresión del miR-107 en grupos de estudio estratificado por resistencia hormonal (De la Rosa, 2018).

Para este estudio, se construyó una curva ROC (curva receptor operador) entre el grupo de estudio y el control, con la finalidad de establecer el valor predictivo positivo (VPP) del miR-107 y definir su funcionalidad como posible biomarcador de la enfermedad (figura 17). Se determinó un valor de área bajo la curva igual a 0.85 usando un valor de corte de 1.2, el cual es mayor al valor predictivo positivo (VPP) reportado para el PSA (0.61), por lo que podría ser propuesto como un posible biomarcador del cáncer de próstata (Mitchell *et al.*, 2008; De la Rosa, 2018).

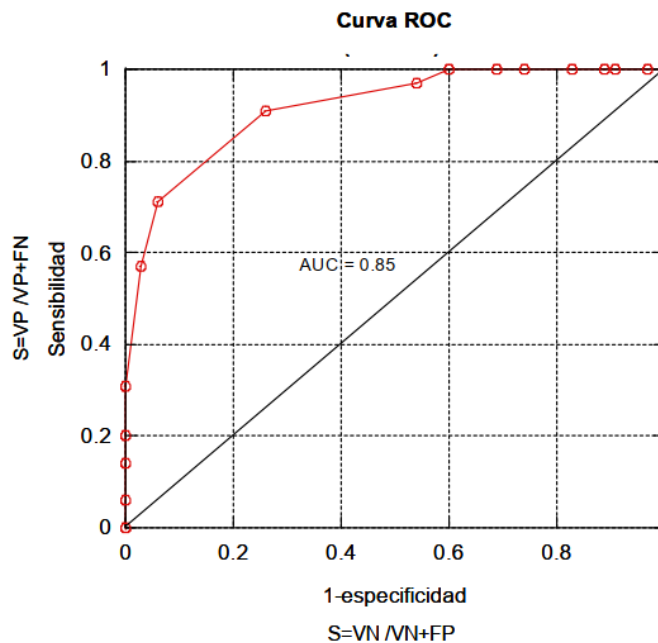


Figura 17. Curva Receptor Operador de la expresión relativa del miR-107 (De la Rosa, 2018).

El miR-107 pertenece a la familia miR-103/107, la cual está involucrada en la regulación de las proteínas que controlan la capacidad proliferativa de las células, arresto del ciclo celular y apoptosis (Yu et al., 2018). Se ha reportado que el miR-107 se encuentra alterado en distintos tipos de cáncer en hombres, incluyendo: cáncer de colon, vejiga, pene, gastrointestinal, y próstata (Yu et al., 2018; Liu et al., 2017; Diniz et al., 2019; Lechknov et al., 2018).

2.1 MicroRNAs en suero

En 2009, Lodes y colaboradores realizaron un estudio en el que evaluaron los patrones de expresión de microRNAs en suero humano para cinco tipos de cáncer, entre los que incluyeron el cáncer de próstata. Realizaron microarreglos de alta densidad que les permitió analizar simultáneamente todos los miRNAs mediante señales de fluorescencia para identificar alteraciones en la presencia y abundancia de miRNAs, por la presencia de la enfermedad (Lodes et al., 2009).

Para el análisis de los patrones de expresión emplearon seis muestras de pacientes con CaP que se encontraban entre la etapa III y IV de la enfermedad, así como ocho muestras de voluntarios sanos. En la primera etapa de la investigación, realizaron un microensayo para identificar aquellos miRNAs que se encontraban sobreexpresados en pacientes con CaP que se encontraban entre la etapa II y IV de la enfermedad, en comparación con los voluntarios sanos. Los 15 miRNAs seleccionados se muestran en la figura 18.

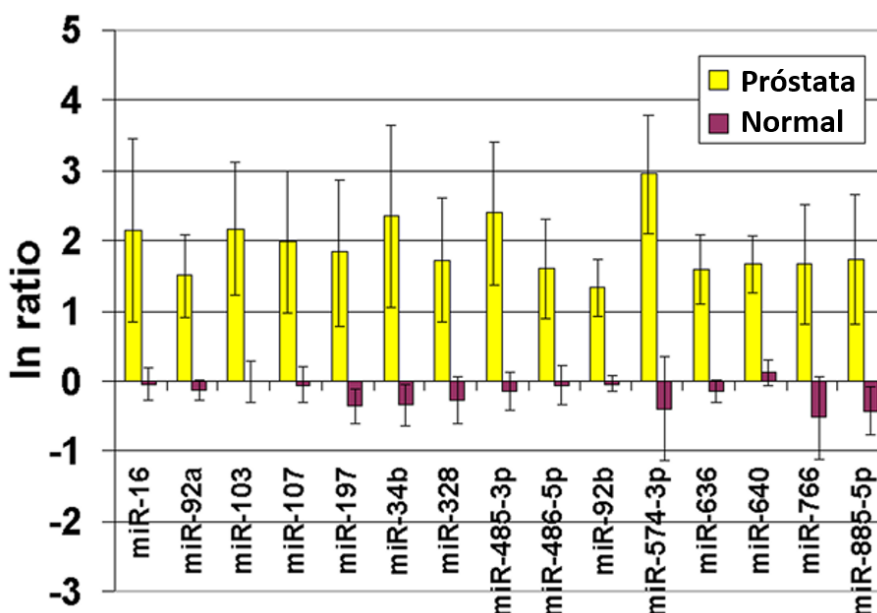


Figura 18. Perfil de expresión de miRNAs en suero de pacientes con CaP (Modificado de Lodes et al, 2009).

En este estudio no describen la relevancia de los miRNAs específicos como posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico o tratamiento. Sin embargo, presentan evidencias de la presencia de miRNAs estables en el suero y de una mayor concentración de estos en pacientes con CaP. Por lo tanto, en futuras investigaciones pueden considerarse estos hallazgos para determinar la importancia de estos miRNAs en el diagnóstico del cáncer de próstata.

2.2 MicroRNAs en orina

En 2018, Lekchnov y colaboradores realizaron la búsqueda de nuevos biomarcadores predictores del cáncer de próstata empleando como matriz biológica la orina. Este equipo de investigación analizó los perfiles de expresión de 84 microRNAs obtenidos a partir de vesículas extracelulares del sobrenadante de muestras de orina de 10 pacientes con CaP, 10 pacientes con HPB y 10 voluntarios sanos, mediante meta-análisis (Lechknov *et al.*, 2018).

Los resultados fueron agrupados en pares de miRNAs, cuya concentración tuvo mayor relevancia estadística. Se obtuvieron los diez pares con mayor diferencia como se muestra en la figura 20. Las diferencias establecidas entre los perfiles de expresión de los microRNAs fueron obtenidas con base en criterios estadísticos que evaluaron: frecuencia, distancia de la mediana, área bajo la curva y el valor de ρ .

El porcentaje de frecuencia se refiere al número de veces que el par de miRNAs se identifica en las muestras de CaP, por lo que un valor cercano al 100% indica que podrían ser específicos de este tejido. La distancia media y el área bajo la curva (AUC) indican una relación de sensibilidad y especificidad y el valor debe ser más cercano a 1 para ser significativo. Para el valor de ρ y ρ_{adj} se considera que debe ser menor o igual a 0.05 para ser estadísticamente significativo, esto indicaría que es 95% probable que estos miRNAs se encuentren en las muestras de los pacientes de interés.

Número	Par de miRNA	Frecuencia, %	Distancia media (95% IC)	AUC	ρ	ρ_{adj}
h-c comparison, 1770 pairs						
1	miR-107-miR-26b.5p	74.8	-0.74 [-1.94;-0.33]	0.93	0.0012	0.0237
2	miR-93.5p-miR-29b.3p	36.3	-0.54 [-1.31;-0.26]	0.92	0.0019	0.0212
3	miR-22.3p-miR-30e.5p	36.0	-0.76 [-1.95;-0.23]	0.86	0.0065	0.0256
4	miR-375-miR-26b.5p	6.2	-1.71 [-3.92;-0.17]	0.83	0.0143	0.0249
5	miR-29b.3p-miR-205.5p	4.6	1.92 [0.25;2.81]	0.88	0.0041	0.0202
6	miR-331.3p-miR-205.5p	0.3	1.72 [0.24;3.06]	0.79	0.0018	0.0373
7	miR-205.5p-miR-26b.5p	15.2	-1.4 [-3.17;-0.55]	0.88	0.0041	0.0237
8	miR-29a.3p-miR-205.5p	10.3	1.69 [0.57;2.74]	0.83	0.0126	0.0252
9	miR-151a.5p-miR-205.5p	6.3	1.18 [0.43;3.29]	0.84	0.0102	0.0252
10	let-7e.5p-miR-23b.3p	15.8	0.88 [0.27;1.35]	0.92	0.0019	0.0237

Figura 20. miRNAs predictores en grupo de comparación (Modificado de Lekchnov et al, 2018).

Por otro lado, se evaluó la capacidad de todos los pares para ser potenciales biomarcadores de la enfermedad considerando el área bajo la curva (AUC), especificidad y sensibilidad, ambos valores se consideran mejores mientras más cercanos se encuentren al 100%, ya que indican que estos pares de microRNAs pueden identificarse con facilidad en tejido tumoral de próstata. De los 10 pares iniciales, fueron los del miR-107-miR-26b.5p y miR-375- miR-26b.5p los que obtuvieron mejores resultados, lo que indica que existe una gran posibilidad para considerarlos como potenciales biomarcadores del CaP (figura 21).

Grupo de comparación	Par de miRNA	AUC	Límite	95% IC	Sensibilidad %	Especificidad %
h-c	miR-205.5p-miR-26b.5p	0.88	<-3.365	0.7212-1.039	30	100
	miR-107-miR-26b.5p	0.93	<-0.4896	0.8074-1.053	80	100
	miR-375-miR-26b.5p	0.83	<-0.6851	0.6293-1.037	70	100
	miR-151a.5p-miR-205.5p	0.84	>3.152	0.6506-1.029	30	100
	miR-29b.3p-miR-205.5p	0.88	>2.034	0.7278-1.032	50	100
	miR-29a.3p-miR-205.5p	0.83	> 3.344	0.6368-1.023	20	100
	miR-331.3p-miR-205.5p	0.79	>5.651	0.5624-1.015	10	100

Figura 21. miRNAs para diagnóstico de CaP en orina (Modificado de Lekchnov et al, 2018).

Finalmente, mediante un análisis de distribución de muestras, determinaron la capacidad de estos dos pares de miRNAs para diferenciar entre muestras de pacientes con CaP y voluntarios sanos (figura 22), obteniendo que el par del miR-375-mir-26b-5p tiene una mejor expresión diferencial que el del miR-107-miR-26b-5p.

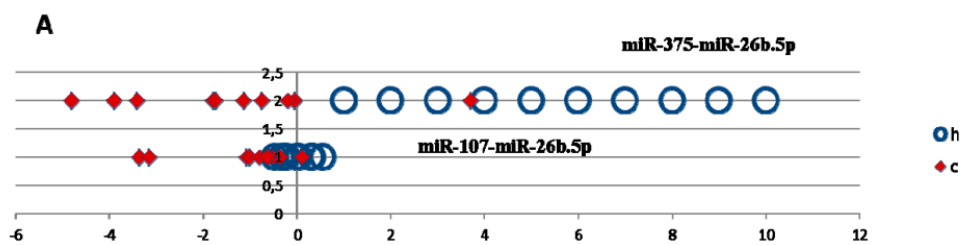


Figura 22. Análisis de distribución de muestras (Lekchnov et al, 2018).

En 2016, Lin y colaboradores describieron la función del miR-375 en cáncer de tiroides. Determinaron que este microRNA actúa como un oncomiR que favorece la tumorigénesis al tener como moléculas blanco distintas proteínas que participan en la vía PI3K/AKT (Lin et al., 2016). La vía de señalización PI3K/AKT es una vía de señalización clásica que regula diversos procesos en las células, tales como: la apoptosis, la transcripción y traducción, el metabolismo, el ciclo celular y la angiogénesis. Estudios recientes han demostrado que la activación de esta vía puede favorecer la angiogénesis al incluir diversos factores pro-angiogénicos, como son los genes que codifican para mTOR, VEGF, HIF-1 α , NO, RAS y angiopoyetina-1. Se ha visto

también que los lncRNA que actúan como esponjas de distintos miRNAs pueden regular la vía PI3K/AKT al activar a promotores que se encuentran río arriba (Zhao *et al.*, 2019).

Después de analizar los resultados, concluyeron que, la diferencia en el contenido de miRNAs en diferentes fracciones de orina puede estar relacionada con una distribución distinta de los mismos, entre proteínas libres, lipoproteínas y vesículas extracelulares. Sin embargo, cualquiera de estas moléculas puede emplearse para el diagnóstico y pronóstico del CaP. A pesar de no existir protocolos de investigación definidos para el análisis de la orina, se considera una fuente prometedora de biomarcadores de CaP, debido a la nula invasión en el proceso de recolección de muestras y a la presencia confirmada de moléculas específicas de CaP (Lekchnov *et al.*, 2018).

2.3 miR-107 en angiogénesis

En 2015, Chen y colaboradores realizaron un estudio en el que determinaron *in vitro* e *in vivo* que la sobreexpresión del miR-107 inhibe la angiogénesis en células de glioma mediante su unión al transcrito de VEGF (Chen *et al.*, 2015).

Ellos sobreexpresaron el miR-107 tanto en un modelo murino, como en dos líneas celulares de glioma (U87 y A172). En el primer modelo observaron que la restauración de este miRNA generó la reducción del tamaño y el peso del tumor (figura 23 A, B y C), mientras que, en las líneas celulares observaron que la cantidad de estructuras capilares formadas es menor cuando se mimetiza el miR-107 (figura 23 D y E).

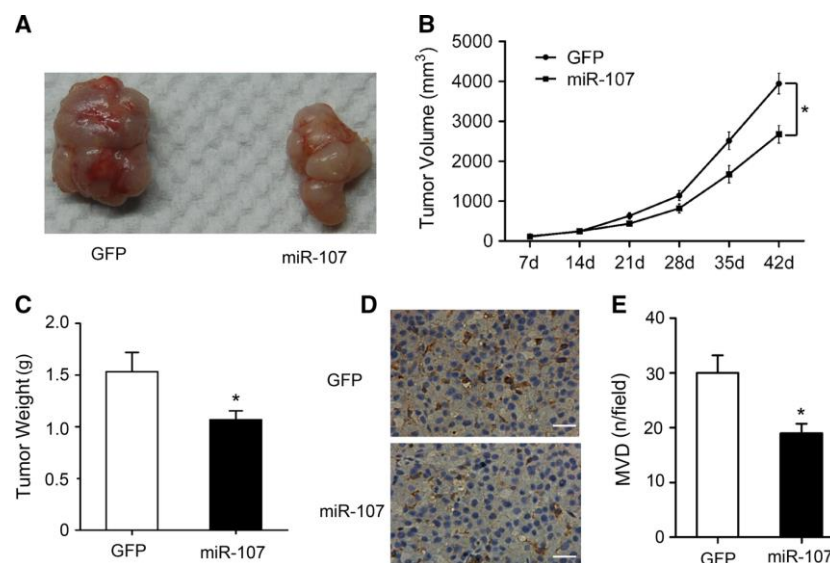


Figura 23. Efecto del miR-107 *in vivo* e *in vitro* (Tomado de Chen *et al.*, 2015).

Posteriormente, realizaron un análisis *in silico* mediante el cual pudieron predecir que VEGF es uno de los blancos del miR-107, lo cual fue validado mediante el ensayo de Western Blot y mediante RT-PCR en tiempo real, ya que en aquellas células en las que se sobreexpresó el miR-107 la expresión de VEGF es menor (figura 24).

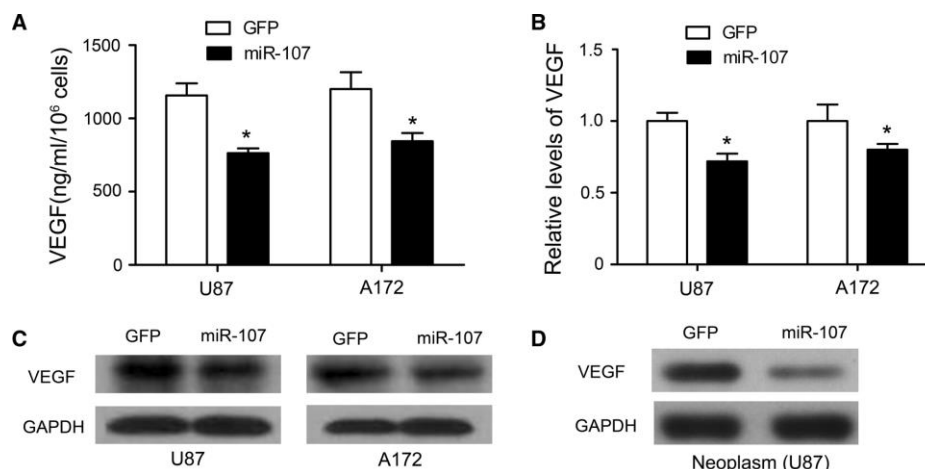


Figura 24. VEGF como uno de los blancos del miR-107 (Tomado Chen *et al*, 2015).

Por lo anterior, concluyeron que, este microRNA participa directamente en el desarrollo de la angiogénesis, inhibiendo este proceso en glioma como consecuencia de su unión al RNAm de VEGF. Sin embargo, no existe información publicada sobre el papel del miR-107 en el desarrollo de la angiogénesis en cáncer de próstata.

El factor de crecimiento endotelial vascular consta de varios miembros que integran una familia, los cuales son: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y VEGF-E. VEGF-A se considera el miembro más importante de la familia, es una glicoproteína que tiene actividad mitogénica altamente específica para las células endoteliales vasculares, tiene la función de incrementar la permeabilidad vascular, estimular la proliferación y migración de las células endoteliales y promover la angiogénesis (Ferroni *et al.*, 2010).

2.4 Participación de otros microRNAs en angiogénesis

Desde el 2015, las publicaciones referentes a la participación de los microRNAs en la angiogénesis han ido en aumento. Los miRNAs que regulan este mecanismo se han denominado angio-miRs; específicamente se les ha llamado pro-angiomiRs a aquellos que promueven la angiogénesis al silenciar la expresión de genes que regulan negativamente esta vía de señalización y permiten la activación de genes que participan en la formación vascular.

Mientras que, a los miRNAs que tienen como blanco genes que la regulan positivamente se les denomina anti-angiomiRs (Wang y Olson, 2009).

En 2018, Tiwari y colaboradores, publicaron una revisión bibliográfica, en las que describieron la función de los microRNAs que se encuentran sobreexpresados en las células endoteliales y su papel en el desarrollo de la angiogénesis (figura 25). Se ha demostrado que, el miR-126 es un miRNA específico de este tipo de células que promueve la formación de nuevos vasos sanguíneos al realizar el silenciamiento génico de SPRED-1 y de la unidad reguladora de la cinasa PI3 (PIK3R2), permitiendo la acción de VEGF (Tiwari *et al.*, 2018).

Tipo de miRNA	miRNA	Blanco	Función
Pro-angiogénicos	miR-126	SPRED-1, PIK3R2, VECAM-1	Activación de AKT dependiente de VEGF y de la vía de señalización ERK
	miR-210	Efrin-A3	Formación de estructuras similares a los capilares y quimiotaxis de EC en respuesta a VEGF
	miR-10b y 9b	Vía HOX	Incrementa proliferación de células endoteliales en respuesta a VEGF
	Let-7b, 7f	Let-7b: TIM1 Let-7f: TSP-1	Regula la formación de brotes
	miR-132	p120RasGAP	Facilita la proliferación de células endoteliales
	miR-378	Sufu, Fus1	Promueve la proliferación de células endoteliales, formación de tubos, y la angiogénesis <i>in vivo</i>
	miR-17-92 cluster	TIM1, TSR, VEGF	Promueve división y migración de células endoteliales
Anti-angiogénicos	miR-24	GATA4, PAK2	Inhibe angiogénesis
	miR-195	VEGF, VAB2, CDC42	Suprime metástasis y angiogénesis en tumor de hígado
	miR-221/miR-222	c-kit, eNOS	Inhibe migración y proliferación de células endoteliales
	miR-328	CD44	Reduce la formación de estructuras capilares
	miR-15b/miR-16	VEGF	Induce apoptosis
	miR-192	EGR1, HOXB9	Regula negativamente las vías angiogénicas

Figura 25. Participación de miRNAs en la angiogénesis (Modificado de Tiwari *et al.*, 2018).

Se ha reportado que, la familia de miRNAs let-7, miR-221 y miR-222 se encuentran sobreexpresados en células endoteliales normales, y se ha visto que disminuye su expresión en cáncer, dado que tienen como blanco múltiples moléculas que participan en la migración y proliferación celular, así como en la intususcepción, por lo tanto, al encontrarse disminuidos, estos genes pueden seguir ejerciendo su función y permitir el desarrollo de la angiogénesis sostenida (Tiwari *et al.*, 2018).

2.5 Participación de lncRNAs en angiogénesis

Hasta la fecha, se sabe que distintos lncRNAs, tales como STEEL, MANTIS, MALAT1, MIAT, SENCN, Tie1-AS, GATA6-AS, se encuentran sobreexpresados durante la angiogénesis, así como, en la proliferación de células endoteliales, al promover la acción de genes involucrados en estos procesos, tales como la *ciclina A2*, *vegf* y la óxido nítrico sintasa endotelial (*enos*). También reclutan factores de transcripción que favorecen la transcripción de genes que responden a las condiciones de hipoxia como *klf2*. Por otro lado, MEG3, es un lncRNA que se encuentra disminuido en la angiogénesis actuando como esponja de miRNAs supresores, o bien, uniéndose a p53 para reprimir la transcripción de *vegf* (Yu y Wang, 2018).

3. Justificación

En México, el cáncer de próstata se considera uno de los problemas de salud más importantes en varones, se estima que el 60% de los hombres diagnosticados con cáncer de próstata va a desarrollar metástasis, y para el 2050 los hombres mayores de 45 años conformarán el 28% de la población masculina, lo cual representa un reto para el Sistema Nacional de Salud.

Se sabe que los microRNAs son importantes reguladores de los hallmarks del cáncer, por lo que resulta interesante determinar la forma en la que los miRNAs circulantes en pacientes con cáncer de próstata están participando en la angiogénesis sostenida. Asimismo, es importante conocer si existen lncRNAs que se encuentren involucrados en la regulación de los miRNAs que participan en la angiogénesis del cáncer de próstata.

4. Hipótesis

Los microRNAs que se encuentran sobreexpresados en cáncer de próstata podrían participar positivamente en el proceso de angiogénesis sostenida, y son regulados al menos por un lncRNA.

5. Objetivos

5.1 Objetivo General

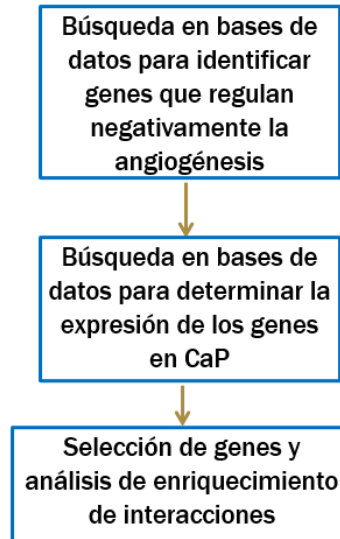
Identificar la participación del miR-107 y de otros microRNAs en la angiogénesis del cáncer de próstata, así como los lncRNAs que puedan estar participando en la regulación de los mismos.

5.2 Objetivos específicos

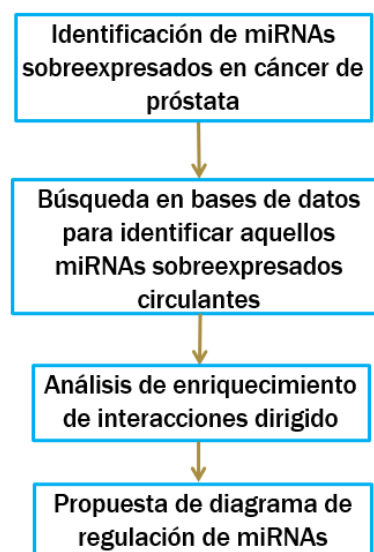
- 5.2.1 Identificar *in silico* a los genes que regulan negativamente la angiogénesis en el cáncer de próstata.
- 5.2.2 Analizar *in silico* la expresión del miR-107 y de otros microRNAs circulantes que estén participando en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.
- 5.2.3 Determinar *in silico* posibles lncRNAs que estén regulando a los microRNAs que participan positivamente en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.

6. Estrategia experimental

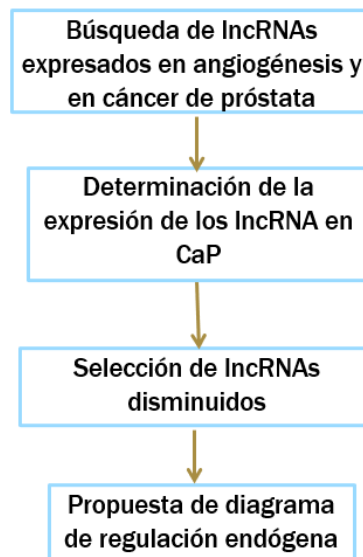
6.1.1 Identificar *in silico* a los genes que regulan negativamente la angiogénesis en el cáncer de próstata.



6.1.2 Analizar *in silico* la expresión del miR-107 y de otros microRNAs circulantes que estén participando en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.



6.1.3 Determinar *in silico* posibles lncRNAs que estén regulando a los microRNAs que participan positivamente en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.



7. Materiales y Métodos

Identificación de genes anti-angiogénicos. Para conocer aquellos genes que inhiben la angiogénesis, se empleó la base de datos del International Cancer Genome Consortium (<https://dcc.icgc.org/>) en la cual se identificó la vía que regula negativamente este mecanismo, a la que le corresponde el código GO:0016525. Éste se buscó en la base de datos AmiGO2 (<http://amigo.geneontology.org/amigo>) que realiza la ontología de genes y se obtuvo el listado de genes anti-angiogénicos que regulan esta vía.

Expresión de genes anti-angiogénicos en cáncer de próstata. Para conocer la expresión de cada uno de los genes anti-angiogénicos en el cáncer de próstata, se empleó la base de datos UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/cgi-bin/TCGAExHeatMap2KK.pl>) en la cual se construyen mapas de calor que indican la expresión de cada uno de ellos. Ésta es útil para conocer la expresión de genes, miRNAs y lncRNAs en distintos tipos de cáncer. En la opción TCGA analysis, se colocó la lista de genes, o en su caso, la lista de lncRNAs seleccionados, y se eligió “cáncer de próstata” en las opciones para visualizar heatmaps. Los mapas de calor están separados en grupos de 25 genes. Esta base de datos no contiene mapas de calor para lncRNAs, sin embargo, mediante gráficas de barras indica la comparación de la expresión de los mismos, entre el tejido tumoral y el tejido normal.

Análisis de enriquecimiento de interacciones. En la base de datos MIENTURNET (<http://userver.bio.uniroma1.it/apps/mienturnet>) se construyó el diagrama que indica las posibles interacciones que podrían existir entre los genes anti-angiogénicos y los microRNAs. En la opción Data Upload se colocaron todos los genes seleccionados y en miRNA-target Enrichment se visualizaron las tablas correspondientes a las predicciones de las interacciones. Asimismo, se realizó un análisis dirigido al ingresar a la base de datos todos los genes anti-angiogénicos que se encuentran disminuidos tanto en cáncer de próstata como en angiogénesis y los microRNAs circulantes cuya abundancia es mayor en los exosomas aislados de pacientes con CaP, obteniendo las predicciones de estas interacciones. MIENTURNET se basa en interacciones miRNA-diana que se predicen computacionalmente o bien, que han sido validadas experimentalmente, para varios organismos, descargadas directamente de TargetScan y miRTarBase. Esta base de datos permite visualizar los resultados como una red de interacciones en conjunto.

Identificación de miRNAs expresados en CaP. Para conocer aquellos microRNAs que se encuentran sobreexpresados en pacientes con cáncer de próstata, se realizó la búsqueda en la base de datos del MD Anderson Cancer Center (<http://tcga.ngchm.net/>), identificando en el mapa de calor de adenocarcinoma de próstata a 131 miRNAs expresados en esta enfermedad y seleccionando a los 50 miRNAs que siguen un patrón de expresión homogéneo en muestras de tejido con valores de Gleason de 6 y 7.

Identificación de miRNAs circulantes. Para saber si los miRNAs sobreexpresados en PRAD son miRNAs circulantes, se utilizó la base de datos EVmiRNA (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/EVmiRNA>), la cual contiene información de la expresión de microRNAs en exosomas y microvesículas aisladas de pacientes con distintos tipos de enfermedades a partir de 17 fluidos biológicos, incluyendo el plasma o suero. Cada uno de los 50 miRNAs seleccionados a partir del mapa de calor se buscaron de manera manual e individual en esta base de datos para determinar si está presente en exosomas proveniente del plasma de pacientes con cáncer de próstata. Aquellos miRNAs no circulantes fueron eliminados para los siguientes análisis.

Análisis *in silico* de la expresión de miRNAs circulantes. Para conocer la expresión de los miRNAs en vesículas extracelulares provenientes de plasma de pacientes con cáncer de próstata, se realizó la búsqueda individual en la base de datos EVmiRNA (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/EVmiRNA>). Las unidades de medición para este valor se indica en lecturas por millón (RPM). Se determinó de esta forma si existe una expresión diferencial de microRNAs entre pacientes y voluntarios sanos, seleccionando aquellos que tuvieran una diferencia de al menos 100 unidades en su expresión.

Identificación lncRNAs expresados en el cáncer de próstata. En la base de datos lncRNADisease2.0 (<http://www.rnanut.net/lncrnadisease/>), se identificaron a los lncRNAs que se encuentran expresados en pacientes con cáncer de próstata. Asimismo, en la base de datos del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) se realizó una búsqueda bibliográfica para identificar a los lncRNAs que se encuentran disminuidos en la angiogénesis.

Interacciones lncRNAs-miRNAs. Para conocer las posibles interacciones que ocurren entre los RNA largos no codificantes y los microRNAs, se utilizó la base de datos lncBase (<https://diana.e-ce.uth.gr/lncbasev3/home>), en la cual puede seleccionarse la especie, enfermedad y tejido en el que puede ocurrir esta interacción.

Análisis de competencia endógena. Para determinar si los genes candidato poseen posibles sitios de unión a los lncRNAs seleccionados, y por lo tanto definir si podría presentarse el mecanismo de regulación de miRNAs por competencia endógena, se utilizaron las bases de datos LncCeRBase (<http://www.insect-genome.com/LncCeRBase/front/>) y LncRNA2Target v2.0 (<http://123.59.132.21/lncrna2target>).

8. Resultados

8.1 Identificar *in silico* a los genes que regulan negativamente la angiogénesis en el cáncer de próstata.

Para el primer objetivo, se realizó una búsqueda en la base de datos del International Cancer Genome Consortium (ICGC) para identificar la vía de regulación negativa de la angiogénesis sostenida y conocer los genes que están involucrados en ella. Posteriormente, se realizó un análisis de ontología de genes utilizando la base de datos AmiGO2, para identificar aquellos genes que tienen una participación negativa en el desarrollo de la angiogénesis sostenida y el resultado de esta búsqueda arrojó 103 genes que participan en este tipo de regulación, tales como: *sulf1*, *rock1*, *tgfb2*, *baf3*, *angpt4*, por mencionar algunos. Todos los genes que participan en esta vía de regulación se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 6. RNAm que regulan negativamente la angiogénesis

Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
BAI3	Inhibidor específico de la angiogénesis en cerebro 3	COL4A2	Colageno tipo IV alfa 2
PTPRM	Proteína tirosina fosfatasa, receptor tipo M	PTN	Pleiotrofina
SEMA3E	Dominio sema, dominio inmunoglobulina (Ig), dominio básico corto, secretado, (semaforin) 3E	HSPG2	Heparan sulfato proteoglicano 2
NF1	Neurofibromina 1	STAT1	Traductor de señal y activador de la transcripción 1, 91kDa
SULF1	Sulfatasa 1	KIAA1024	KIAA1024
ADAMTS9	ADAM metalopeptidasa con trombospondina tipo 1 motivo, 9	ANGPT4	Angiopoyetina 4
STARD13	Lípido transferase STAR (START) que contiene el dominio 13	BAI2	Inhibidor específico de la angiogénesis en cerebro 2
PDE3B	Fosfodiesterasa 3B, cGMP-inhibida	DCN	Decorina
COL4A3	Colageno tipo IV, alf 3	PML	Leucemia promielocítica
BAI1	Inhibidor específico de la angiogénesis en cerebro 1	ANGPT2	Angiopoyetina 2
ROCK1	Espiral de la proteína cinasa 1 asociada a Rho	APOH	Apolipoproteína H (beta-2-glicoproteína I)
DAB2IP	DAB2 proteína de interacción	ROCK2	Espiral de la proteína cinasa 2 asociada a Rho
MAP2K5	Mitógeno-activado de la proteína cinasa cinasa 5	HSPG2	Heparan sulfato proteoglicano 2

Tabla 6. RNAm que regulan negativamente la angiogénesis (continuación)

Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
TEK	TEK tirosina cinasa, endotelial	SPRED1	EVH1 que contiene el dominio 1
CTNNB1	Catenina (proteína asociada a caderina), beta 1, 88kDa	GTF2I	Factor general de transcripción Iii
ABCC8	Cassette de union a ATP, sub-familia C (CFTR/MRP), miembro 8	ATF2	Factor que activa transcripción 2
SPINK5	Inhibidor de serina peptidasa, Kazal tipo 5	AMOT	Angiomotina
SEMA6A	Dominio sema, transmembranal (TM), y citoplásmico, (semaforina) 6 ^a	FAM129B	Familia con secuencia similar 129, miembro B
NOTCH1	Notch 1	EPN2	Epsina 2
MEOX2	Homeobox mesénquima 2	MECP2	Proteína de unión metil CpG 2
PPARG	Receptor de peroxisoma proliferador-activado gamma	RHOA	Familia homologa de ras miembro A
TGFB2	factor de crecimiento transformante, beta 2	PGK1	Cinasa fosfoglicerato 1
THBS2	Trombospondina 2	AGO1	Compornente catalítico de argonauta RISC 1
THBS4	Trombospondina 4	EPHA2	EPH receptor A2
STAB1	Stabilina 1	TIE1	Tirosina cinasa con dominios similares a inmunoglobulina y EGF 1
ISM1	Istmina 1, inhibidor de angiogénesis	HDAC5	Histona deacetilasa 5

Tabla 6. RNAm que regulan negativamente la angiogénesis (continuación)

Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
EPN1	Epsin 1	PRL	Prolactina
PDCD10	Muerte celular programada 10	TBXA2R	Receptor tromboxano A2
THBS1	Trombospondina 1	SPARC	Proteínas secretadas, ricas en cisteiPnas (osteonectina)
MMRN2	Multimerina 2	EFNA3	Efrina-A3
CREB3L1	Proteína de unión al elemeto de respuesta a cAMP 3-like 1	SYNJ2BP	Proteína de unión sinaptojanina 2
LECT1	Leucociteo derivado de células quimotaxina 1	SERPINE1	Inhibidor serpin peptidasa, clade E (nexina, plasminógeno activador inhibidor tipo 1), miembro 1
KRIT1	KRIT1, contiene repetidos de ankirina	NGFR	Receptor del factor de crecimiento de nervio
SEMA4A	Dominio sema , inmunoglobulina (Ig), transmembranal (TM) y citoplásmico corto, (semaphorin) 4A	KLK3	Peptidasa relacionada con calicreína 3
HGS	Sustrato de tirosin cinasa que regula el crecimiento de hepatocitos	GPR4	Receptor de la proteína G 4
HRG	Glicoproteína rica en histidinas	AGT	Angiotensinógeno (inhibidor de serpin peptidasa, clade A, miembro 8)
CARD10	Familia del dominio que recluta caspasa, miembro 10	CX3CR1	Quimiomokina (C-X3-C motivo) receptor 1
FOXJ2	Caja forkhead J2	FASLG	Ligando Fas (TNF superfamilia, miembro 6)
NPR1	Péptido natriuretico receptor A/guanilato ciclasa A (péptido atrionatriuretico receptor A)	VASH1	Vasohibina 1

Tabla 6. RNAm que regulan negativamente la angiogénesis (continuación)

Símbolo	Nombre	Símbolo	Nombre
HOXA5	Homeobox A5	HLA-G	Complejo mayor de histocompatibilidad, clase I, G
ITGB1BP1	Proteína de unión integrina beta 1	IL17F	Interleucina 17F
SARS	Sintetasa seril-tRNA	FOXC1	Caja forkhead C1
GDF2	Factor de diferenciación de crecimiento 2	KLF4	Factor 4 Kruppel-like (gut)
E2F2	Factor de transcripción 2 E2F	SPRY2	Homólogo de sprouty 2 (Drosophila)
EMILIN1	Interface microfibril elastina 1	RGCC	Regulador del ciclo celular
TNMD	Tenomodulina	NPPB	Péptido natriurético B
SERPINF1	Inhibidor serpin peptidasa, clado F (alfa-2 antiplasmina, Factor derivado de pigmento del epitelio), miembro 1	GHRL	Prepropéptido ghrelina/obestatina
FOXO4	Caja forkhead O4	ECSCR	Regulador de apoptosis y de quimiotaxis expresada en superficie de células endoteliales
PLK2	Cinasa polo-like 2	HHEX	Homeobox expresado hematopoyéticamente
CCR2	Receptor de quimiocina (C-C motivo) 2	KLF2	Factor 2 Kruppel-like
DLL4	Delta-like 4 (Drosophila)	CXCL10	Quimiocina (motivo C-X-C) ligando 10
CD160	Molécula CD160	PF4	Factor de plaquetas 4

Posteriormente, para conocer la expresión de cada uno de estos genes anti-angiogénicos en el cáncer de próstata, se construyeron los mapas de calor correspondientes en la base de datos de UALCAN, la cual contiene la información que alimenta la base de datos del TCGA, por lo que incluye la expresión de estos genes en más de 2,200 muestras de tejido tumoral de próstata. Los mapas de calor obtenidos se muestran en la figura 26.

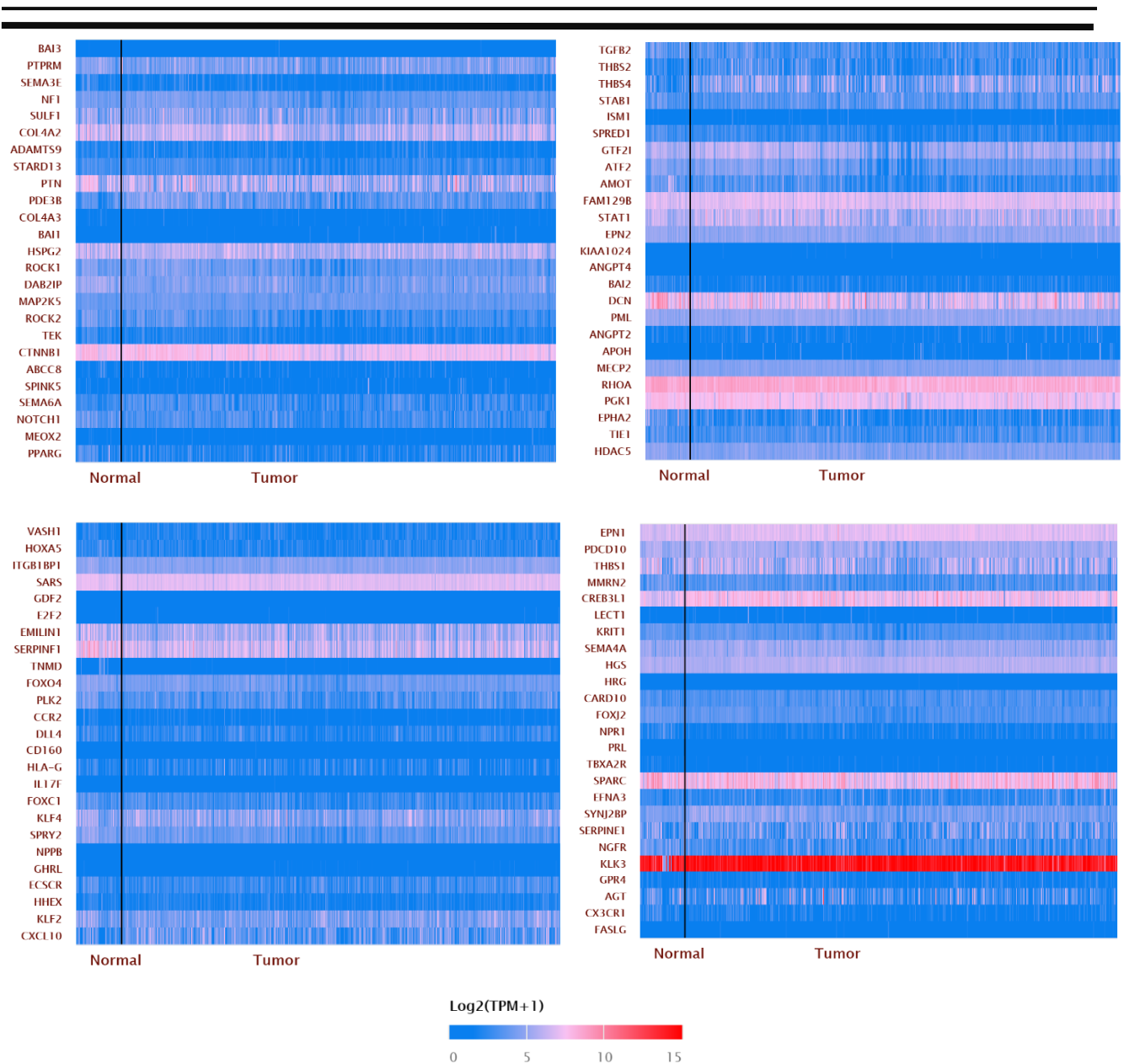


Figura 26. Mapas de calor que indican expresión de genes anti-angiogénicos en PRAD.

En estos mapas de calor se puede observar que la mayoría de los genes que regulan negativamente la angiogénesis sostenida se encuentran disminuidos en el cáncer de próstata. Sin embargo, algunos de ellos, como *klk3*, *sparc* y *rhoa*, muestran una huella evidente de sobreexpresión, por lo que se realizó una selección de estos genes con la finalidad de eliminar aquellos que se encuentran disminuidos en angiogénesis, pero no así en cáncer de próstata. Para ello, se consideraron todos los genes cuya expresión está por debajo de 5, según la escala logarítmica que se encuentra en la parte inferior de cada mapa de calor. De los 103 genes iniciales, 78 cumplieron con este criterio de selección (tabla 7).

Tabla 7. GENES CANDIDATO

bai3	abcc8	lect1	tnmd	angpt4
ptprm	spink5	krit1	foxo4	bai2
sema3e	sema6a	hrg	plk2	pml
nf1	notch1	card10	ccr2	angpt2
sulf1	meox2	foxj2	dll4	apoh
adamts9	pparg	npr1	cd160	mecp2
stard13	tgfb2	prl	hla-g	epha2
pde3b	thbs2	tbxa2r	il17f	tie1
col4a3	thbs2	efna3	foxc1	hdac5
bai1	stab1	synj2bp	klf4	mmrn2
rock1	ism1	serpine1	spry2	faslg
dab2ip	spred1	ngfr	nppb	vash1
map2k5	atf2	gpr4	ghrl	hoxa5
rock2	amot	agt	ecscr	gdf2
tek	kiaa1024	cx3cr1	hhex	e2f2
		pf4	klf2	cxcl10

Los 78 genes seleccionados fueron ingresados a la base de datos de MIENTURNET para realizar un análisis de enriquecimiento de interacciones, con la finalidad de observar su comportamiento al interactuar con distintos microRNAs (figura 27). Este análisis está basado en la información registrada en la base de datos de TargetScan.

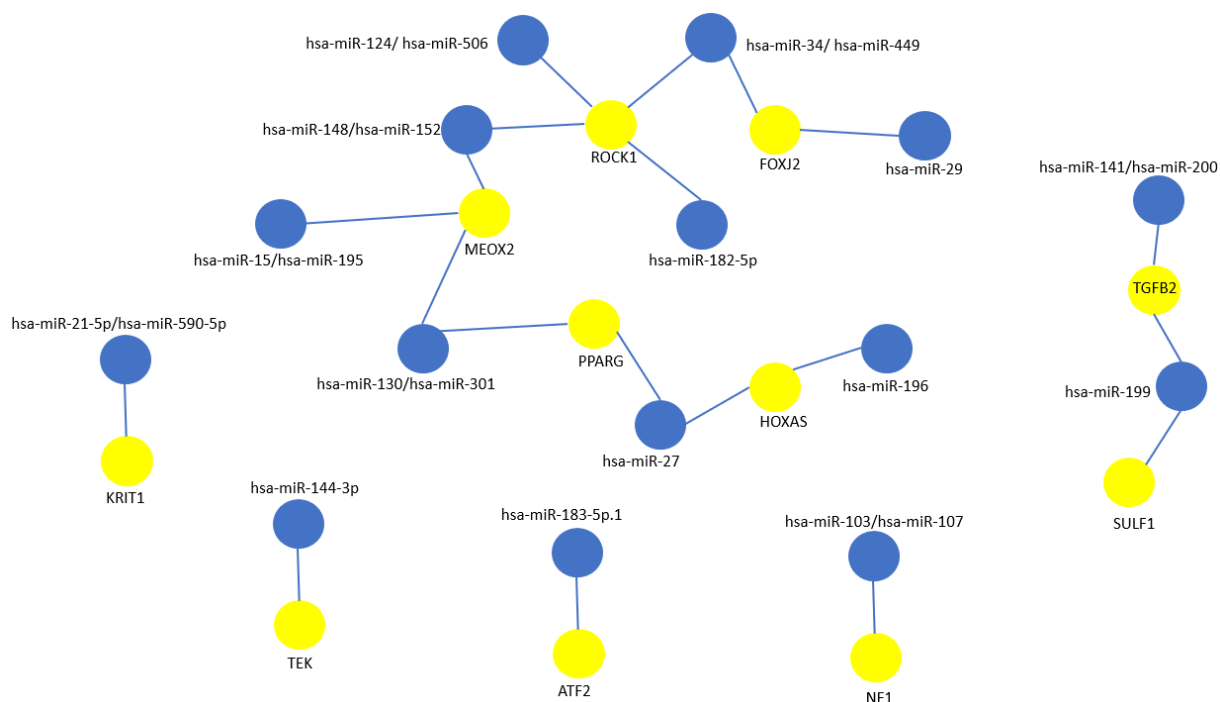


Figura 27. Análisis de enriquecimiento de interacciones de genes anti-angiogénicos. En círculos amarillos se indican los RNAm y en azules los miRNAs, las líneas azules indican las posibles interacciones.

La base de datos UALCAN no contiene información específica sobre microRNAs expresados en distintas enfermedades, ni hace la diferencia entre microRNAs sobreexpresados o disminuidos. Sin embargo, en el análisis de enriquecimiento de interacciones se puede observar que la regulación de los genes anti angiogénicos podría ser específica en cada tejido donde se esté desarrollando la angiogénesis, dado que no existe una red única de interacciones. Asimismo, se observa que ROCK1 y MEOX2 son RNAm que pueden tener una mayor cantidad de sitios de unión a miRNAs, al unirse a 4 y 3 miRNAs, respectivamente, por lo que podrían jugar un papel importante en la regulación de la angiogénesis en CaP.

ROCK1 es un regulador de la actina en la matriz extracelular, así como de la adhesión focal. Mientras que MEOX2 es el principal regulador de la miogénesis durante el desarrollo embrionario.

8.2 Analizar *in silico* la expresión del miR-107 y de otros microRNAs circulantes que estén participando en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.

El segundo objetivo se dividió en dos partes, la primera consistió en hacer la selección de microRNAs que se encuentran sobreexpresados en el plasma de pacientes con CaP, mientras que en la segunda se realizó un análisis de enriquecimiento de interacciones dirigido hacia los miRNAs y genes de interés.

Primeramente, se realizó una búsqueda en la base de datos del MD Anderson Cancer Center, la cual contiene información del TCGA y se obtuvo el mapa de expresión de aquellos miRNAs expresados en adenocarcinoma de próstata (PRAD), el cual se muestra en la siguiente figura.

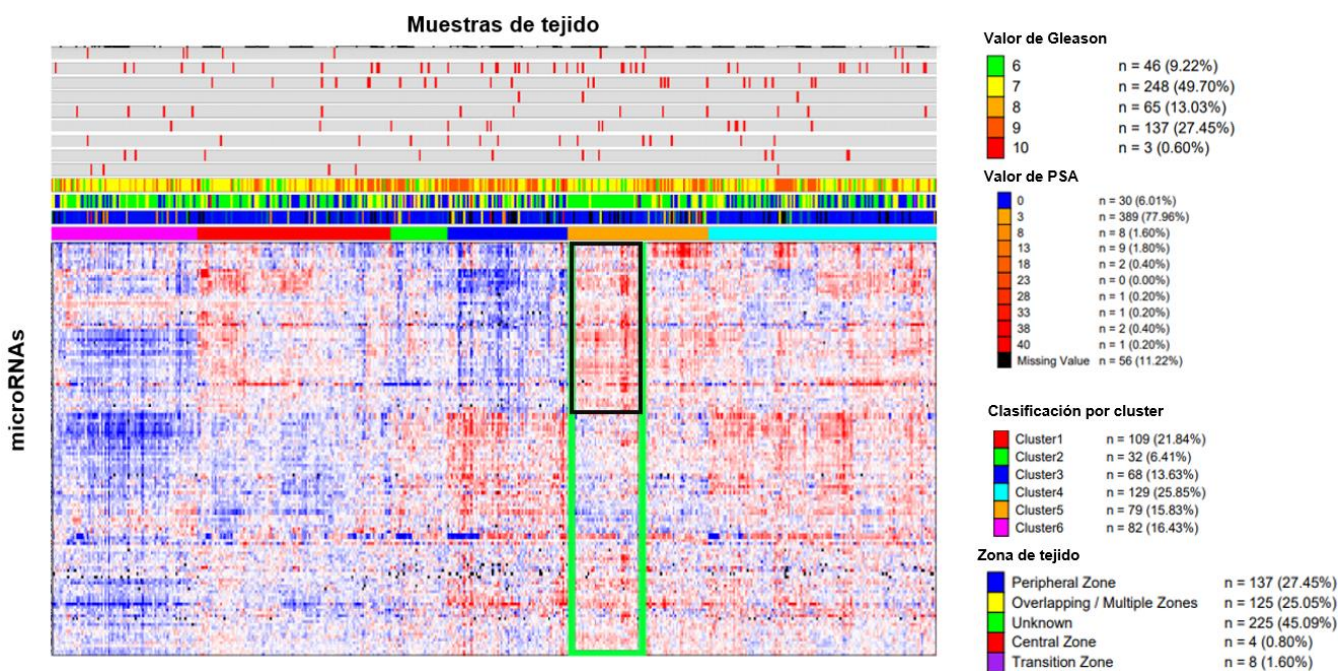


Figura 28. Mapa de calor de la expresión de miRNAs en PRAD. La primera franja de color indica el valor de Gleason, éste va de 6 a 10 y la escala se muestra de lado derecho con código de colores que van del verde al rojo; la segunda franja de color que va del azul oscuro al morado, indica la zona del tumor de la que fue tomado el tejido; la tercera franja indica el valor de PSA, el cual según la escala va de color azul oscuro a negro, teniendo valores de 0 a 42 y algunos de ellos desconocidos; la última franja indica el número de cluster al que pertenecen las muestras.

En este mapa de calor se indica la expresión de 131 miRNAs que se encuentran en tejido tumoral de próstata. La mayoría de las muestras se clasifican dentro de un valor de Gleason 7 y 9, y como se puede observar para la mayoría de ellas se desconoce la zona de la que fueron obtenidas. El valor de PSA no es relevante en este estudio, dado que no es indicativo de daño celular en el tejido, como lo es la escala Gleason. Las muestras fueron agrupadas con base en características clínicas como la etapa de la enfermedad, para realizar el análisis de secuenciación masiva.

Los cluster 1, 3 y 4 incluyen muestras de pacientes con un valor de Gleason mayor o igual a 7, lo cual indica que están en una etapa avanzada del CaP. Mientras que, en el resto de los cluster se incluyen muestras con un valor de Gleason variable.

La zona que se indica en color verde identifica en su mayoría un grupo de muestras con valor de Gleason 6 y 7, por lo que puede deducirse que estos pacientes se encuentran en la etapa temprana de la enfermedad, al no tener un daño celular severo. La zona que se indica con el rectángulo negro identifica a los miRNAs seleccionados para este proyecto, la cual muestra una huella de sobreexpresión homogénea en la etapa temprana del CaP.

En la figura 29 se muestra un acercamiento de la huella de expresión, la cual incluye a 49 microRNAs que serán considerados para el siguiente análisis debido a que se encuentran sobreexpresados en la etapa inicial del CaP. Asimismo, se muestra en la figura 30 el mapa de calor que incluye la expresión del miR-107 (resaltado en color verde), el cual a pesar de mostrar una intensidad en el color de las líneas menor que el resto, sigue un patrón de expresión similar al resto de los miRNAs. Por lo tanto, los 50 miRNAs sobreexpresados en tejido tumoral de pacientes en etapas tempranas de la enfermedad, se muestran en la tabla 8.

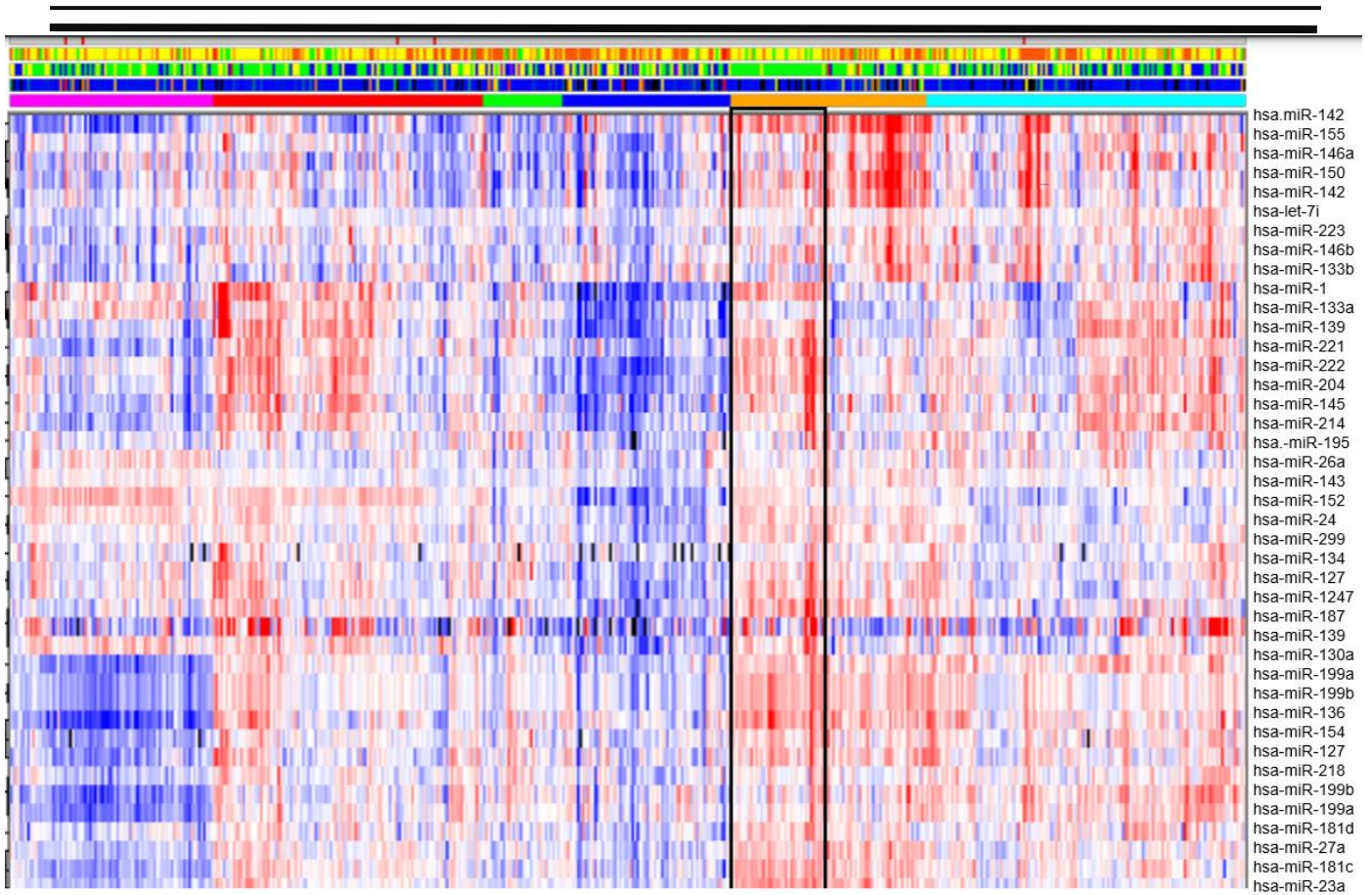


Figura 29. Mapa de calor de miRNAs sobreexpresados en PRAD.

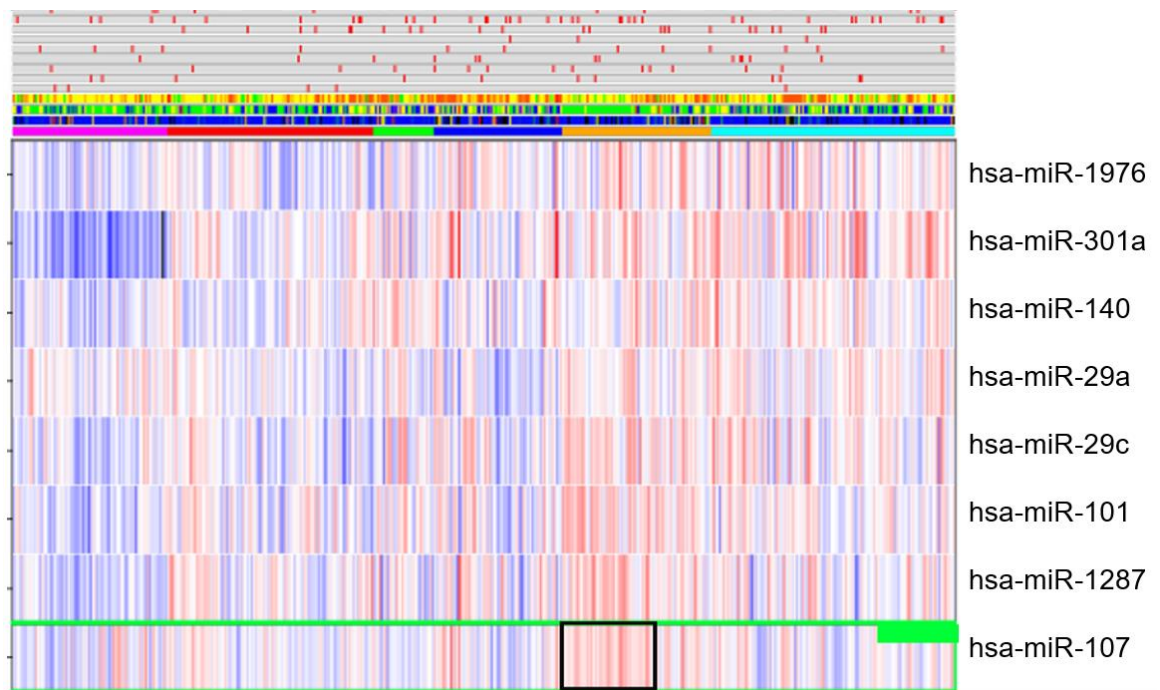


Figura 30. Mapa de calor de la expresión del miR-107 en PRAD.

Tabla 8. microRNAs expresados en tejido tumoral de próstata

miRNA	Plasma	miRNA	Plasma
hsa-miR-142-5p	SI	hsa-miR-127-3p	SI
hsa-miR-155-5p	NO	hsa-miR-1247-5p	NO
hsa-miR-146a-5p	SI	hsa-miR-187-3p	SI
hsa-miR-150-5p	SI	hsa-miR-139-3p	SI
hsa-miR-142-3p	SI	hsa-miR-130a-3p	SI
hsa-let-7i-5p	SI	hsa-miR-199a-3p	SI
hsa-miR-223-3p	SI	hsa-miR-199b-3p	SI
hsa-miR-146b-3p	NO	hsa-miR-136-5p	SI
hsa-miR-146b-5p	NO	hsa-miR-154-5p	SI
hsa-miR-133b	NO	hsa-miR-127-5p	SI
hsa-miR-1-3p	SI	hsa-miR-218-5p	SI
hsa-miR-133a-3p	SI	hsa-miR-199b-5p	SI
hsa-miR-139-5p	SI	hsa-miR-199a-5p	SI
hsa-miR-221-3p	SI	hsa-miR-181d-5p	SI
hsa-miR-222-3p	SI	hsa-miR-27a-3p	SI
hsa-miR-204-5p	SI	hsa-miR-181c-5p	SI
hsa-miR-145-5p	SI	hsa-miR-23a-3p	SI
hsa-miR-214-3p	NO	hsa-miR-100-5p	SI
hsa-miR-195-5p	SI	hsa-miR-23b-3p	SI
hsa-miR-26a-5p	SI	hsa-miR-27b-3p	SI
hsa-miR-143-3p	SI	hsa-miR-125a-5p	SI
hsa-miR-152-3p	SI	hsa-miR-224-5p	NO
hsa-miR-24-3p	SI	hsa-miR-205-5p	NO
hsa-miR-299-5p	NO	hsa-miR-181b-5p	SI
hsa-miR-134-5p	SI	hsa-miR-107	SI

Se realizó la búsqueda de los 50 miRNAs seleccionados en la base de datos EVmiRNA para identificar aquellos que son circulantes y se encuentran en el plasma de pacientes con CaP. Esta base de datos contiene perfiles de expresión de exosomas y microvesículas, tanto de pacientes con CaP, como de voluntarios sanos, los cuales fueron obtenidos a partir de muestras de sangre de 57 pacientes y de 50 voluntarios. De los 50 microRNAs seleccionados inicialmente, 41 fueron identificados como circulantes. Los 9 restantes que fueron eliminados en este criterio de selección (resaltados en amarillo en la tabla 8).

Posteriormente, se determinó si los 41 miRNAs circulantes son más o menos abundantes en el plasma de pacientes con CaP, con respecto a los sujetos sanos, para lo cual se empleó nuevamente la base de datos EVmiRNA, que contiene información específica para distintos tipos de cáncer, tales como: cáncer de colon, de páncreas, de mama, oral, de próstata, entre otros. Los resultados se indican (tabla 9) que 22 de los 41 microRNAs presentes en el plasma de pacientes con CaP son más abundantes, por lo que fueron eliminados los 19 restantes siguiendo este segundo criterio de selección.

miRNA	Plasma	Expresión en CaP	miRNA	Plasma	Expresión en CaP
hsa-miR-142-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-127-3p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-146a-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-187-3p	SI	Disminuido
hsa-miR-150-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-139-3p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-142-3p	SI	Disminuido	hsa-miR-130a-3p	SI	Disminuido
hsa-let-7i-5p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-199a-3p	SI	Disminuido
hsa-miR-223-3p	SI	Disminuido	hsa-miR-199b-3p	SI	Disminuido
hsa-miR-1-3p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-136-5p	SI	Disminuido
hsa-miR-133a-3p	SI	Disminuido	hsa-miR-154-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-139-5p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-127-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-221-3p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-218-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-222-3p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-199b-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-204-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-199a-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-145-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-181d-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-195-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-27a-3p	SI	Disminuido
hsa-miR-26a-5p	SI	Disminuido	hsa-miR-181c-5p	SI	Disminuido
hsa-miR-143-3p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-23a-3p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-152-3p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-100-5p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-24-3p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-23b-3p	SI	Sobreexpresado
hsa-miR-134-5p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-27b-3p	SI	Disminuido
hsa-miR-181b-5p	SI	Sobreexpresado	hsa-miR-125a-5p	SI	Disminuido
			hsa-miR-107	SI	Sobreexpresado

En la base de datos EVmiRNA se realizó la búsqueda de los perfiles de expresión en exosomas aislados de sangre de pacientes con CaP para los 22 miRNAs seleccionados, los resultados se indican en la figura 31. Las unidades de expresión se indican en lecturas por millón la abundancia de los transcritos, eliminando sesgos técnicos en los datos secuenciados, tales como la profundidad de la secuenciación y la longitud del gen.

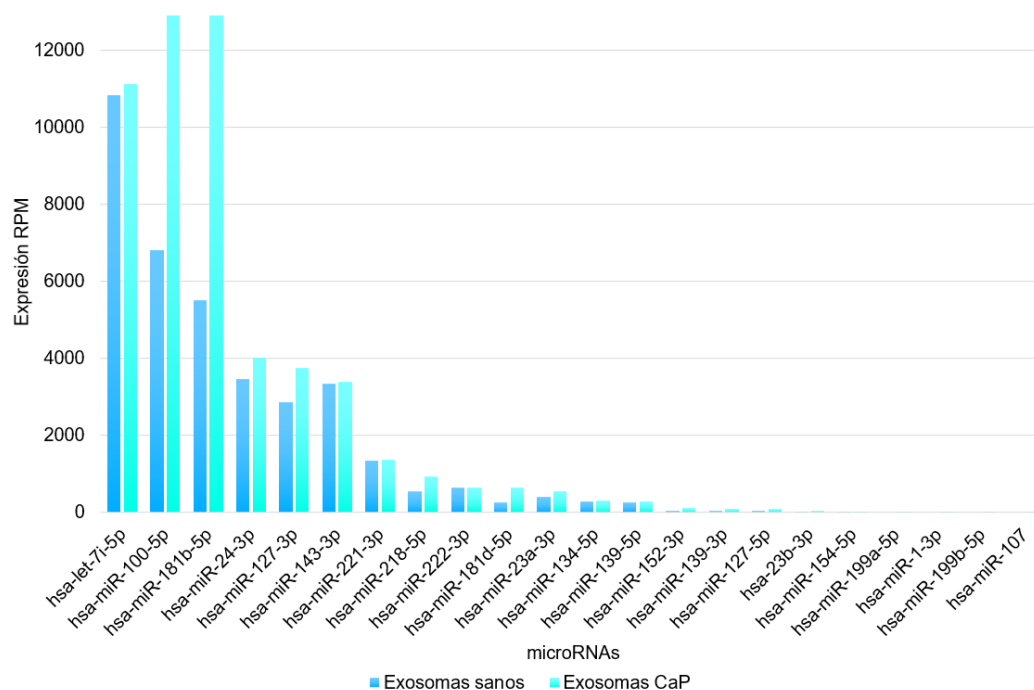


Figura 31. MiRNAs circulantes sobreexpresados en CaP.

Como se puede observar en la gráfica, no todos los miRNAs circulantes indican una expresión diferencial, por lo que el siguiente criterio de selección consistió en elegir aquellos microRNAs en los que existiera una diferencia de al menos 100 unidades RPM, estos se muestran en la tabla 10. El miR-107 fue considerado en esta selección, ya que es muy probable que no alcance la circulación general por medio de exosomas, sin embargo, se ha determinado anteriormente de forma experimental que, en el plasma de pacientes con cáncer de próstata, en especial de los que son hormonalmente resistentes, se encuentra sobreexpresado (De la Rosa, 2018).

Tabla 10. MicroRNAs circulantes seleccionados

miRNA	Expresión en exosomas sanos (RPM)	Expresión en exosomas con CaP (RPM)
hsa-let-7i-5p	10,841	11,120
hsa-miR-24-3p	3477	4019
hsa-miR-127-3p	2868	3749
hsa-miR-181b-5p	5521	12,914
hsa-miR-181d-5p	272	655
hsa-miR-23a-3p	410	550
hsa-miR-100-5p	6807	12,923
hsa-miR-143-3p	3345	3397
hsa-miR-218-5p	542	946
hsa-miR-107	0	2

La segunda parte de este objetivo consistió en identificar aquellos genes anti angiogénicos que son posibles blancos de los miRNAs seleccionados. Para ello, se empleó la base de datos MIENTURNET en la cual se realizó un análisis de enriquecimiento de interacciones dirigido hacia los 78 genes anti angiogénicos y los 10 miRNAs circulantes sobreexpresados en CaP. Esta base de datos además de estar ligada a la información contenida en TargetScan (tabla 11), está ligada a miRTarBase (tabla 12), por lo que se consideraron las dos bases de datos para realizar el análisis.

Tabla 11. Interacciones entre los miRNAs sobreexpresados en CaP y los RNAm anti-angiogénicos en TargetScan

Familia de miRNA	ρ	FDR	Odd ratio	Número de interacciones	Gen 1	Gen 2	Gen 3	Gen 4	Gen 5	Gen 6	Gen 7	Gen 8
hsa-miR-152-3p	0.0003	0.0492	0.2306	8	ROCK1	MEOX2	TGFB2	SULF1	PTPRM	MECP2	ISM1	TEK
hsa-miR-107	0.1224	0.4970	0.4803	4	NF1	PDE3B	FOXJ2	AMOT				
hsa-miR-1-3p	0.1475	0.5013	0.5154	4	ATF2	AMOT	SULF1	MEOX2				
hsa-miR-199a-5p	0.1772	0.5240	0.4863	3	TGFB2	SULF1	ROCK1					
hsa-miR-199b-5p	0.1772	0.5240	0.4863	3	TGFB2	SULF1	ROCK1					
hsa-miR-23a-3p	0.3733	0.6356	0.7720	4	TGFB2	ISM1	DAB2IP	PDE3B				
hsa-miR-181d-5p	0.3891	0.6397	0.7887	4	ATF2	THBS4	THBS2	MECP2				
hsa-miR-218-5p	0.4714	0.6950	0.8452	3	PTPR	M	MECP2	KRIT1				
hsa-let-7i-5p	0.5344	0.7147	0.9258	3	SULF1	AMOT	SYNJ2BP					

Tabla 12. Interacciones entre los miRNAs sobreexpresados en CaP y los RNAm anti-angiogénicos en miRTarBase

microRNA	ρ	FDR	Odd ratio	Número de interacciones	Gen 1	Gen 2
hsa-miR-107	0.1605	0.5077	0.3584	2	AMOT	NF1
hsa-miR-199a-5p	0.0595	0.5077	0.1983	2	MECP2	TGFB2
hsa-miR-221-3p	0.2193	0.5139	0.4397	2	MEOX2	AMOT

En las tablas se muestran distintos parámetros estadísticos para considerar la posibilidad de que ocurra la unión de los miRNAs a los genes anti-angiogénicos, un valor de ρ menor a 0.05 y un valor de FDR similar a ρ (tasa de falsos descubrimientos), se consideran altamente confiables, sin embargo, los valores que aquí se indican son un promedio de todas las interacciones posibles.

En la figura 32, se muestran el número de interacciones por cada microRNA considerando ambas bases de datos y se indican en barras de color azul aquellos miRNAs que tienen el mejor valor de ρ y de FDR.

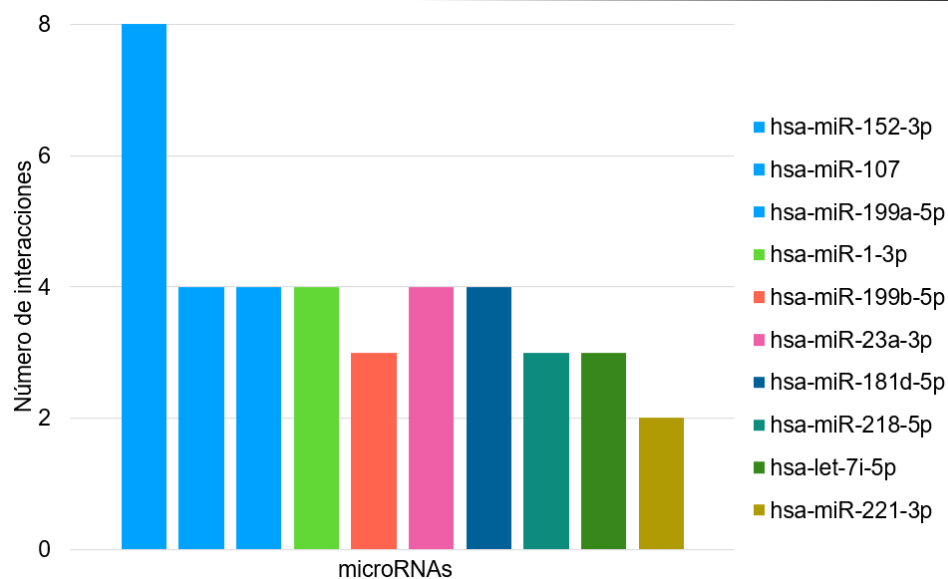


Figura 32. Número de interacciones entre miRNAs sobreexpresados y genes anti-angiogénicos.

Como se puede observar en la gráfica, el hsa-miR-152-3p es el miRNA que tiene un mayor número de interacciones posibles con genes que regulan negativamente la angiogénesis, al unirse a 8 de ellos, además de tener el mejor valor de p (0.0003) y de FDR (0.02897), lo que significa que es muy probable que existan todas estas interacciones. Por otro lado, el hsa-miR-107, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-1-3p, hsa-miR-23a-3p y hsa-miR-181d-5p, tienen 4 posibles interacciones, seguidos por los hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-218-5p y hsa-let-7i-5p que llevan a cabo 3 posibles interacciones, y finalmente el hsa-221-3p posiblemente interacciona con al menos dos genes anti-angiogénicos.

El diagrama de interacciones que se muestra en la figura 33, muestra la regulación que podrían estar ejerciendo los microRNAs sobre los genes anti-angiogénicos. En éste puede notarse que los microRNAs sobreexpresados tanto en tejido tumoral como en plasma de pacientes con CaP ejercen una regulación positiva en la angiogénesis sostenida, al unirse a genes anti-angiogénicos y ejercer su función de silenciamiento génico, ya que al encontrarse disminuida la expresión de estos genes, puede mantenerse incrementada la expresión de genes pro-angiogénicos que activen este mecanismo.

8.3 Determinar *in silico* posibles lncRNAs que estén regulando a los microRNAs que participan positivamente en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata.

Para el tercer objetivo se llevó a cabo una búsqueda en la base de datos LncRNAdisease, para identificar a los lncRNAs que se expresan en cáncer de próstata. En la figura 34 se indican en rojo los lncRNAs que están sobreexpresados y en verde los que se encuentran disminuidos en la enfermedad.

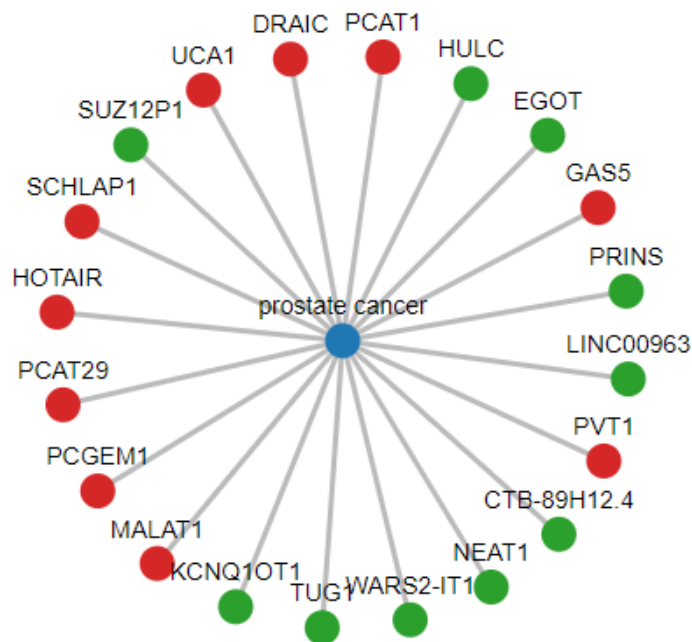


Figura 34. lncRNAs expresados en cáncer de próstata.

Por otro lado, se realizó una búsqueda bibliográfica en el NCBI, donde se encontró una revisión reciente realizada por Yu y Wang en 2018, que describe específicamente la expresión de lncRNAs en angiogénesis y en enfermedades vasculares (Yu y Wang, 2018). Con base en esta información, se adicionaron al análisis a los lncRNAs HULC y TUG1, que se encuentran sobreexpresados en angiogénesis, y a MEG3, el cual se encuentra disminuido.

Para el primer criterio de selección, se consideró que los lncRNAs se encuentren disminuidos tanto en este tipo de cáncer como en la angiogénesis, ya que se consideraron los miRNAs circulantes sobreexpresados que fueron seleccionados en el objetivo anterior. Como se puede observar en la figura 35, TUG1 y HULC se encuentran sobreexpresados en tumores, y promueven la angiogénesis, por lo tanto, fueron eliminados para el siguiente análisis. Asimismo, al reportarse disminuido MEG3 en este mecanismo, se utilizó la base de datos UALCAN para conocer su expresión en tejido tumoral de próstata (figura 35).

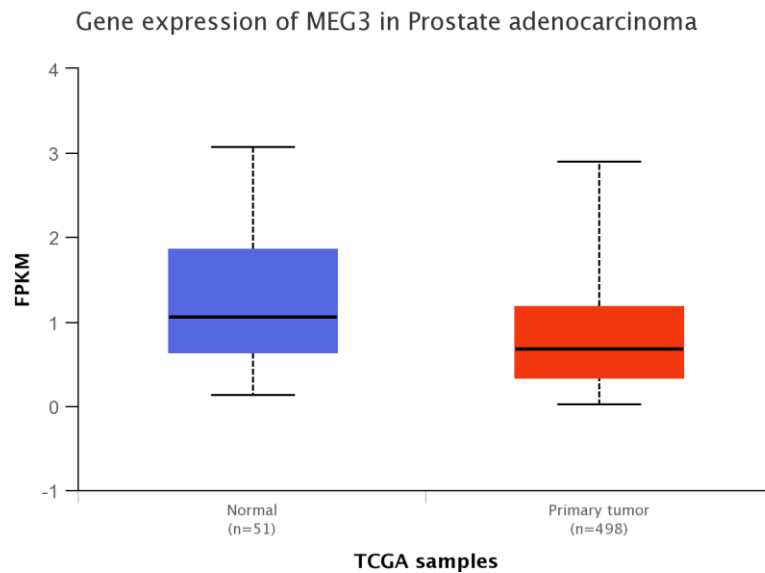


Figura 35. Expresión de MEG3 en PRAD.

En esta imagen se puede observar que la expresión de MEG3 en adenocarcinoma de próstata, es menor que en tejido normal, por lo tanto, con base en este análisis se puede decir que se encuentra disminuido en cáncer de próstata.

El siguiente paso fue conocer si los miRNAs seleccionados son posibles blancos de estos largos no codificantes. Para ello se consultó la base de datos LncBase, en la que se determinó el tejido en el que ocurre esta interacción (tabla 14). EGOT, PRINS y CTB-89H12.4 no interactúan con ninguno de estos diez miRNAs, por lo que fueron eliminados para el siguiente análisis. Asimismo, NEAT1 y LINC00963 son llevados a cabo la interacción con tres de ellos en próstata.

Tabla 13. Interacción lncRNAs-miRNAs

lncRNA	hsa-miR-152-3p	hsa-miR-107	hsa-miR-1-3p	hsa-miR-199a-5p	hsa-miR-199b-5p	hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-218-5p	hsa-miR-221-3p	hsa-let-7i-5p
EGOT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRINS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LINC00963	-	PRÓSTATA	-	RIÑÓN	-	PRÓSTATA, RIÑÓN	RIÑÓN	-	PRÓSTATA	PRÓSTATA CEREBRO
CTB-89H12.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NEAT1	HUESO, RIÑÓN	PRÓSTATA	CEREBRO, RIÑÓN, HUESO	-	RIÑÓN	PRÓSTATA, CEREBRO, RIÑÓN, PÁNCREAS, HUESO, VENA UMBILICAL	RIÑÓN, HUESO	RIÑÓN, CEREBRO, PÁNCREAS	RIÑÓN, CEREBRO, HUESO, PÁNCREAS, VENA UMBILICAL	PRÓSTATA, CEREBRO, PÁNCREAS, RIÑÓN, HUESO, INTESTINO
WARS2-IT1	-	-	-	-	-	CEREBRO	-	-	CEREBRO	-
KCNQ10T1	RIÑÓN	PÁNCREAS, RIÑÓN	CEREBRO, RIÑÓN	-	RIÑÓN	RIÑÓN, CEREBRO	-	-	CEREBRO, RIÑÓN	RIÑÓN, CEREBRO
SUZ12P1	-	-	CEREBRO	-	-	-	-	-	CEREBRO, RIÑÓN	CEREBRO
MEG3	-	CEREBRO, PÁNCREAS	CEREBRO	PÁNCREAS	-	CEREBRO, PÁNCREAS	-	CEREBRO	CEREBRO	PÁNCREAS, CEREBRO

Finalmente, se realizó un análisis de competencia endógena *in silico*, utilizando dos bases de datos para corroborar las interacciones, estas fueron LncRNA2Target v2.0 y LncCerBase. En ambas se obtuvo que es probable que ninguno de estos largos no codificantes compita con los genes anti-angiogénicos seleccionados en el primer objetivo, por los microRNAs circulantes sobreexpresados en plasma de pacientes con cáncer de próstata, ya que no existen predicciones de estas interacciones.

Por lo tanto, el mecanismo de regulación endógena que podría estar ocurriendo en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata se representa en el diagrama de la figura 38. NEAT1 y LINC00963 son lncRNAs que se encuentran en próstata y que podrían ser esponja de estos microRNAs circulantes sobreexpresados en el plasma de estos pacientes, los cuales pueden mantener este incremento en su expresión al encontrarse con largos no codificantes disminuidos, por lo que se estaría llevando a cabo el silenciamiento génico de genes anti angiogénicos y la activación de la angiogénesis. Asimismo, se realizó el análisis para los lncRNAs sobreexpresados en el cáncer de próstata y se encontró que GAS5 interacciona con nueve de los diez microRNAs sobreexpresados, al ser esponja de estos en próstata, impide su acción sobre los genes anti angiogénicos, por lo que al ser activados estarían inhibiendo la angiogénesis.

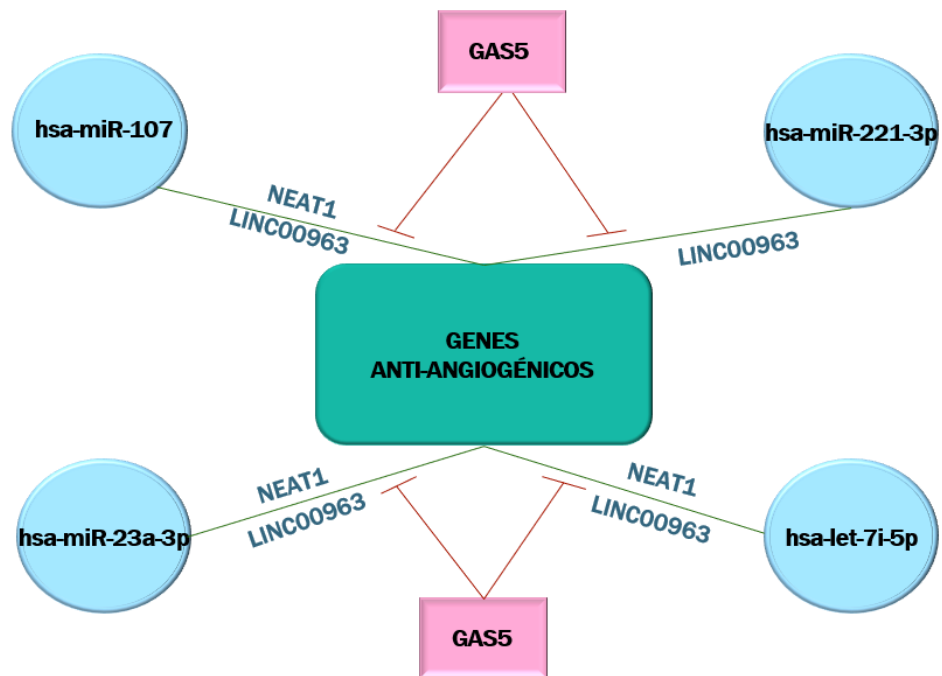


Figura 36. Diagrama de regulación endógena en la angiogénesis sostenida del CaP.

9. Discusión

Se conocen hasta la fecha distintos factores físicos, químicos y biológicos que influyen de manera importante en la presencia y desarrollo del cáncer de próstata, el cual es detectado en la mayoría de los casos en etapas ya avanzadas de la enfermedad, debido a la inexistencia de métodos no invasivos para su diagnóstico. Asimismo, la resistencia al tratamiento hormonal generalmente se detecta una vez que se ha presentado metástasis como consecuencia de la activación de la angiogénesis sostenida.

Según la información reportada en el NCBI, los últimos años ha existido un incremento en el número de publicaciones referentes a las interacciones genes-miRNAs-lncRNAs. Se ha visto que el papel de estos tres grandes grupos de biomoléculas debe ser considerado en la aparición y progresión de distintas enfermedades, incluyendo el cáncer de próstata.

Los genes anti-angiogénicos, regulan negativamente la angiogénesis sostenida dado que pueden participar en distintas vías de señalización que inhiben la neovascularización. Al encontrarse disminuidos en el CaP, permiten que los genes pro-angiogénicos se mantengan activos y que desencadenen este mecanismo. Estos genes pueden favorecer la angiogénesis sostenida directa o indirectamente, ya que pueden tener un papel principal en la vasculogénesis, mimetismo vasculogénico, angiogénesis por brote o intususcepción y promover la formación de nuevos vasos sanguíneos al conformar un microambiente ideal para ello.

Se han reportado 103 genes principales que participan en la regulación negativa de la angiogénesis, cuya expresión es variable dependiendo del tipo de cáncer del que se trate. En tejido de pacientes con cáncer de próstata 79 de estos genes podrían estar disminuidos, por lo que nos resultó interesante conocer su posible interacción con distintos microRNAs que se encuentren sobreexpresados en este tipo de cáncer.

Hasta la fecha, no existen bases de datos que reporten la expresión de miRNAs circulantes en la sangre de pacientes con cáncer de próstata, por lo que los microRNAs cuya abundancia es mayor en esta enfermedad fueron identificados en la base de datos desarrollada por el MD Anderson Cancer Center, la cual contiene información sobre miRNAs expresados en el tejido tumoral de pacientes con distintos tipos de cáncer y los compara con su expresión en voluntarios sanos. Dado que, está ligada a la información registrada en el TCGA, cuenta con

más de 2,200 datos para pacientes con adenocarcinoma de próstata y más de 8,000 para voluntarios sanos.

Se seleccionaron aquellos miRNAs que fueron identificados con un patrón de sobreexpresión en PRAD y los que se encuentran con mayor abundancia en exosomas aislados de sangre de pacientes con CaP, con la finalidad de establecer una correlación y determinar si estos microRNAs tienen un comportamiento similar tanto en tejido como en fluido biológico. Sin embargo, la base de datos EVmiRNA, que fue utilizada para realizar este análisis, solo identifica a aquellos miRNAs que alcanzan la circulación general mediante el transporte por exosomas. Por lo que, los nueve miRNAs que fueron eliminados a partir de este criterio de selección, tendrían que ser corroborados de manera experimental en el suero o plasma de estos pacientes.

Los genes anti-angiogénicos disminuidos en pacientes con CaP y los microRNAs sobreexpresados en pacientes con la misma enfermedad, forman una red de interacción que permite visualizar la posible vía de regulación que podría ocurriendo en circulación (figura 33), según el análisis *in silico* realizado en la base de datos MIENTURNET. A pesar de encontrar que la mayoría de las predicciones de interacciones tienen valores de p, FDR y odd ratio superiores a lo aceptado estadísticamente ($p < 0.05$, $FDR < 0.5$, odd ratio cercano a 1), debe considerarse que las predicciones arrojadas por MIENTURNET son aquellas que cuentan con una evidencia computacional o experimental fuerte, incluso aquellas predicciones que se indican con base en la información contenida en miRTarBase se encuentran ya validadas, por lo que la probabilidad de que ocurran las interacciones predichas para los miRNAs: hsa-miR-107, hsa-miR-199a-5p y hsa-miR-221-3p, es alta.

El valor de OR que muestra MIENTURNET indica la probabilidad de que se estén llevando a cabo de manera simultánea las interacciones predichas, considerando que un microRNA puede unirse a varios genes y que un gen puede tener posibles sitios de unión para múltiples microRNAs (Licursi *et al.*, 2019). Asimismo, el valor de FDR es calculado en MIENTURNET por el procedimiento de Benjamin-Hochberg, el cual es útil para disminuir la tasa de falsos descubrimientos, o falsos positivos. Un valor de 0.05 significa que solo hay un 5% de probabilidad de que obtenga el resultado observado si la hipótesis nula fuera cierta; es decir, es muy poco probable que la interacción predicha deba descartarse. Sin embargo, los resultados que se indican en las tablas 11 y 12 son solo una probabilidad, algunas veces, las

hipótesis nulas verdaderas se descartan solo por la aleatoriedad de los resultados, principalmente cuando se consideran una gran cantidad de genes para realizar las predicciones de sus interacciones con los miRNAs.

El hsa-miR-152-3p, para el cual se predijeron ocho posibles interacciones con los genes seleccionados, se ha reportado como un supresor de tumores en distintos tipos de cáncer, incluyendo el de próstata. Se ha visto que su sobreexpresión disminuye la proliferación celular y favorece la apoptosis (Feng *et al.*, 2019). En cáncer de mama se evaluó su papel en la angiogénesis determinando que, al inducir su sobreexpresión, se inhibe este mecanismo (Liu *et al.*, 2016). Por lo que, se esperaría que en cáncer de próstata tuviera un comportamiento similar, silenciando a aquellos RNAm que dan lugar a las proteínas que regulan negativamente la angiogénesis.

El gen que codifica para la proteína SULF1, es el que según el análisis *in silico* realizado, interactúa con una mayor cantidad de miRNAs, al unirse a cinco de los diez que fueron seleccionados, seguido por AMOT y TGFB2 que interactúan con cuatro de ellos. SULF1, es una proteína que disminuye la sulfatación de proteoglicanos de heparán sulfato (HSPG), inhibe la señalización por factores de crecimiento dependientes de heparina, disminuye la proliferación y facilita la apoptosis en respuesta a la estimulación exógena (UniProt, 2021). TGFB2 regula la proliferación y diferenciación de distintos tipos celulares, y participa en la inhibición de procesos celulares como la angiogénesis y la metástasis (UniProt, 2021). AMOT participa en la inhibición de la migración celular y la formación de tubos, al ser uno de los reguladores principales de las tight junctions o uniones estrechas (UniProt, 2021), las cuales son uniones intercelulares que se unen al citoesqueleto, y éste es remodelado durante la diferenciación celular; también ayudan a conservar la polaridad de las células endoteliales y epiteliales (Jiménez *et al.*, 2012).

Por lo anterior, se esperaría que SULF1, AMOT y TGFB2 tengan una participación importante en la regulación negativa de la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata, al inhibir la progresión de éste cuando los genes que codifican para estos productos protéicos se encuentren expresados.

En cuanto a la búsqueda de un posible mecanismo de regulación endógena que pudiera estar ocurriendo en el desarrollo de la angiogénesis en CaP, se analizó la presencia de lncRNAs expresados en esta enfermedad. Para ello, era necesario conocer la relación que existe con los lncRNAs expresados en la angiogénesis, e incluso en enfermedades vasculares, ya que

muchos de ellos se encuentran sobreexpresados en tejido tumoral que implica las células endoteliales, aunque en células prostáticas tumorales no se encuentre este comportamiento. Al realizar este análisis se pudieron identificar nueve lncRNAs disminuidos tanto en cáncer de próstata como en angiogénesis. A pesar de que, como se indica en la tabla 14, seis de ellos no son específicos del tejido prostático, pueden interactuar con los miRNAs sobreexpresados en otros tejidos; la mayoría de estas interacciones podrían ocurrir en hueso, riñón y cerebro, lo que indica que se estarían llevando a cabo en varios tipos de cáncer. Para determinar si existe un mecanismo de regulación propio del CaP, se eliminaron los lncRNAs no específicos de tejido de próstata, dado que en este análisis quería observarse el posible mecanismo de regulación que ocurre en la angiogénesis del CaP en etapas tempranas de la enfermedad, cuando se está desarrollando un adenocarcinoma localmente avanzado.

NEAT1, es el lncRNA que interacciona con una mayor cantidad de los miRNAs seleccionados, al tener posibles sitios de unión para nueve de ellos. El gen *neat1* produce este RNA largo no codificante transcrito del locus de neoplasias endócrinas múltiples. Se retiene en el núcleo donde forma el componente estructura central de los suborganelos paraspeckle. Asimismo, puede actuar como regulador transcripcional *cis* de numerosos genes, incluidos aquellos implicados en la progresión de distintos tipos de cáncer (GENECARDS, 2021).

Por otro lado, LINC00963 fue el segundo lncRNA que fue identificado en tejido tumoral de próstata a partir del análisis *in silico*; éste podría unirse a tres de los microRNAs seleccionados. Wang y colaboradores, determinaron que la disminución de este lncRNA en células hormono-resistentes, disminuye la proliferación, migración e invasión celular, promueve la muerte por apoptosis, y disminuye la expresión del receptor del factor de crecimiento endotelial (EGFR) y los niveles de fosforilación de AKT (Wang *et al.*, 2014). En este mismo estudio se observó que la disminución de este lncRNA promueve la transición del cáncer no resistente a la castración, al cáncer resistente a la castración, por lo que, en un futuro, el inducir la disminución de LINC00963 podría considerarse como un posible tratamiento para contrarrestar el CPCR.

Los lncRNAs regulan la expresión de genes al poseer sitios de unión para distintos microRNAs. Esta interacción provoca la degradación de los miRNAs, por lo que, se impide su actividad de silenciamiento génico. Por ello, se dice que los lncRNAs actúan como esponja o secuestradores de ciertos microRNAs. En la angiogénesis del CaP al encontrarse disminuidos NEAT1 y LINC00963 que actúan como esponja de los cuatro microRNAs circulantes sobreexpresados,

permiten que se mantenga esta sobreexpresión y que lleven a cabo su actividad de silenciamiento génico dirigida hacia los genes anti-angiogénicos, por lo que regulan positivamente la angiogénesis, ya que no habrá ninguna proteína que inhiba las vías de señalización involucrada.

Los cuatro microRNAs que interactúan con NEAT1 y LINC00963 son: hsa-miR-107, hsa-miR-23a-3, hsa-miR-221-3p y hsa-let-7i-5p. Los primeros tres han sido identificados experimentalmente en cáncer de próstata y se ha visto que en líneas celulares su sobreexpresión inhibe la proliferación, supervivencia celular y metástasis, ya que actúan como supresores de tumores, por lo que en células LNCAP (no resistentes), DU145 y PC3 (ambas hormono-resistentes), se encuentran disminuidos (Zhang et al., 2019; Cai *et al.*, 2015; Abak *et al.*, 2018). Asimismo, estos microRNAs podrían estar siendo transportados fuera de las células tumorales en exosomas, a excepción de hsa-miR-107 el cual no se encontró expresado en estas vesículas extracelulares en la base de datos EVmiRNA.

Para el hsa-let-7i-5p no se han reportado hasta la fecha ensayos funcionales que describan su participación en el cáncer de próstata. Sin embargo, se ha visto que la familia de miRNAs let-7 poseen diversos blancos validados experimentalmente que participan en las vías de señalización que inducen la angiogénesis sostenida del CaP, como la vía PI3K/AKT, PTEN y NOTCH (Wagner *et al.*, 2014).

Otro mecanismo por el cual los lncRNAs regulan la actividad de los microRNAs es mediante la competencia endógena, se denomina lncRNAs a los largos no codificantes que llevan a cabo esta acción. La competencia ocurre cuando los miRNAs poseen los mismos sitios de unión para los genes blanco y para los lncRNAs, por lo que se unirá el largo no codificante a la región semilla del microRNA, impidiendo su interacción con el gen, impidiendo así el silenciamiento génico y provocando la degradación del miRNA. Este mecanismo de regulación es altamente específico y aún no se conoce con exactitud (Statello *et al.*, 2020).

En el diagrama de regulación endógena que se muestra en la figura 38, se observa la participación de otro lncRNA denominado GAS5, el cual con base en el análisis *in silico* realizado, se encontró que se une a nueve de los diez microRNAs circulantes seleccionados. En la base de datos LncRNADisease se encontró que este lncRNA está sobreexpresado en cáncer de próstata y en la búsqueda bibliográfica en el NCBI se determinó que se encuentra también sobreexpresado en la angiogénesis, por lo que, al estar presente en este ambiente

microtumoral podría secuestrar a los cuatro microRNAs que se muestran en la imagen, provocando su degradación e impidiendo el silenciamiento de los genes anti-angiogénicos, los cuales al expresarse podrían regular negativamente la angiogénesis.

En organismos tan complejos como los seres humanos, podrían ocurrir todos los mecanismos antes descritos por lo que se requieren diversos estudios experimentales y diseños longitudinales para evaluar la expresión de todas estas moléculas a lo largo de la enfermedad. Sin embargo, mediante los análisis bioinformáticos es posible predecir estas interacciones y delimitar un estudio experimental al diseñar ensayos y esperar resultados cercanos a dichas predicciones.

La presencia de microRNAs sobreexpresados en la circulación de pacientes con cáncer de próstata podría estudiarse a profundidad y desarrollar un nuevo método para la predicción del pronóstico de la enfermedad. Asimismo, la sobreexpresión de lncRNAs dirigidos a células prostáticas tumorales podría ser considerada como una oportunidad de tratamiento para los pacientes con CaP, en especial para aquellos que presentan resistencia a la castración y que no pueden recibir el tratamiento hormonal.

10. Conclusión

Los genes anti-angiogénicos no son altamente estudiados ni considerados en el diseño de ensayos experimentales para evaluar la capacidad angiogénica de los miRNAs. Por lo tanto, no se conoce hasta ahora la intervención que puedan tener en el desarrollo de la angiogénesis al encontrarse con la expresión de genes pro-angiogénicos, ni el mecanismo de regulación endógena que podría existir.

El análisis *in silico* realizado y descrito en el presente proyecto, nos ha permitido visualizar los posibles mecanismos de regulación que existen en la angiogénesis sostenida del cáncer de próstata, concluyendo que los microRNAs hsa-miR-107, hsa-miR-23a-3p, hsa-221-3p y hsa-let7i-5p, son miRNAs circulantes cuya concentración es mayor en el plasma de pacientes con cáncer de próstata, y pueden regular positivamente la angiogénesis sostenida al silenciar la expresión de genes anti-angiogénicos, Los miRNAs: hsa-miR-107, hsa-miR-23a-3p y hsa-let7i-5p son regulados negativamente por NEAT1. Los miRNAs: hsa-miR-107, hsa-miR-23a-3p, hsa-let7i-5p y hsa-miR-221-3p son regulados por LINC00963, y positivamente por GAS5.

Con respecto a los miRNAs circulantes, se puede concluir que no todos alcanzan la circulación general por medio de exosomas o microvesículas. Hasta la fecha, se desconocen con exactitud los posibles mecanismos por los cuales pueden salir de las células hacia la circulación, sin embargo, en el desarrollo del cáncer podría considerarse también una secreción pasiva en respuesta al estrés celular y las alteraciones fisiológicas que se presentan.

11. Bibliografía

1. ¿Qué es el cáncer? Consultado el 20 de agosto del 2020 en: <https://www.who.int>
2. Definición del cáncer. Consultado el 20 de agosto del 2020 en: <https://www.cancer.gov>
3. Estadísticas del cáncer. Consultado el 15 de noviembre del 2020: <https://www.paho.org/>
4. Características del cáncer. Consultado el 20 de agosto del 2020 en: <https://www.cancer.org>,
5. Síntomas del cáncer y métodos de diagnóstico. Consultado el 20 de agosto del 2020 en: <http://infocancer.org.mx>
6. Hsa-miR-107. Consultado el 30 de enero del 2021 en: <http://www.mirbase.org>
7. Proteínas. Consultado el 20 de agosto del 2020 en <https://www.uniprot.org/uniprot>
8. Genes. Consultado el 15 de marzo del 2020 en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/>
9. Abak A., Amini S., Sakhinia E., Abhari A. (2018). MicroRNA-221: biogenesis, function and signatures in human cancers. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 22: 3094-3117.
10. Bluemn G., Coleman I., Lucas J., et al. (2017). Androgen receptor pathway-independent prostate cancer is sustained through FGF signaling. *Cancer Cell*; 32(4):474-489.
11. Cai S., Chen R., Li X., Cai Y., Ye Z., Li S., Li J., Huang H., Peng S., Wang J., Tao Y., Huang H., Wen X., Mo J., Deng Z., Wang J., Zhang Y., Gao X., Wen X. (2015). Downregulation of microRNA-23a suppresses prostate cancer metastasis by targeting the PAK6-LIMK1 signaling pathway. *Oncotarget*. 6.
12. Chen N., & Zhou Q. 2016. The evolving Gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(1), 58-64.
13. Chen L., Li Z., Xu S., Zhang X., Zhang Y., Luo K., Li W. (2015). Upregulation of miR-107 inhibits glioma angiogenesis and VEGF expression. *Cell Mol Neurobiol*.
14. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. (2012). Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*;22(3):125-32.
15. Catalona *et al.* (1994) Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *The Journal of Urology*.
16. De la Rosa D., Garrido G., Aragón F., Campos S., López C., Camacho M., Álvarez M. (2018). MicroRNAs, Gene's Regulator in Prostate Cancer. Springer International Publishing AG.

-
-
17. De la Rosa D. (2018) Expresión y validación del miRNA-107 en biopsias líquidas de pacientes mexicanos con cáncer de próstata. UACM.
 18. Devlin H., Mudryj M. (2009). Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Letters*; 274(2):177-186.
 19. Diniz P., et al. (2019). MIR-107, MIR-223-3P and MIR-21-5P reveals potential biomarkers in penile cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*, 21 (2), 391-397.
 20. Esparza R., Velázquez M. (2016). Nuevos e inesperados mecanismos de biogénesis y acción de los microRNAs. *Revista de Educación Bioquímica (REB)* 35(3): 55-70.
 21. Ferrara N. (2002). Role of vascular endothelial growth factor in physiologic and pathologic angiogenesis: therapeutic implications. *Semin Oncol*, 29: 10-14.
 22. Ferroni P., Formica V., Roselli M., Guadagni F. (2010). Thromboembolic Events in Patients Treated with Anti-Angiogenic Drugs. *Current Vascular Pharmacology*, 8, 102-113.
 23. Feng F., Liu H., Chen A., Xia Q., Zhao Y., Jin X., Huang J. (2019). miR-148-3p and miR-152-3p synergistically regulate prostate cancer progression via repressing KLF4. *Journal of cellular biochemistry*. Volume 120; Issue 10, 17228-17239.
 24. Flores A., et al. (2016). Dual targeting of ANGPT1 and TGFBR2 genes by miR-204 controls angiogenesis in breast cancer. *Nature, Scientific Reports* 6: 34504.
 25. Hanahan D. & Weinberg R. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*. Vol. 100, 57–70.
 26. Hanahan D. & Weinberg R. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*.;144(5):646-74.
 27. Heidenreich A., Aus G., Bolla M., Joniau S., et al. (2008). European Association of Urology Guidelines on Prostate Cancer. *Eur Urol*; 53: 68-80.
 28. Hoja informativa GLOBOCAN 2020. International Agency for Research of Cancer. OMS.
 29. Hou J., Wang L., Wu Q., Zheng G., Long H., Wu H., et al. (2018). Long noncoding RNA H19 upregulates vascular endothelial growth factor A to enhance mesenchymal stem cells survival and angiogenic capacity by inhibiting miR-199a-5p. *Stem Cell Res Ther*. 9, 109.
 30. Kalluri R., LeBleu V. (2020). The biology, function, and biomedical applications of exosomes. *Science*; 367 (6478).
 31. Kirby M., Hirst C., Crawford E. (2011). Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systemic review. *The International Journal of Clinical Practice*.

-
-
32. Jiménez J., González L., Königsberg M., Gómez L., Zentella A., Damián P. (2012). Estructura y función de las uniones estrechas en la transición epitelio-mesénquima (tem) y la tumorigénesis del cáncer de mama humano. *REB* 31(2): 49-59.
 33. LaTayia A., Franco O., Hayward S. (2016). Review of Prostate Anatomy and Embryology and the Etiology of BPH. *Urol Clin North Am.* 43(3): 279–288.
 34. Lewandowska A.M., Rudzki M., Rudzki S., Lewandowski T., Laskowska B. 2016. Environmental risk factors for cancer. *Ann Agric Environ Med*; 26 (1): 1-7.
 35. Lekchnov et al. (2018). Searching for the Novel Specific Predictors of Prostate Cancer in Urine: The Analysis of 84 miRNA Expression. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 4088.
 36. Licursi V., Conte F., Fiscon G., Paci P. (2019) MIENTURNET: an interactive web tool for microRNA-target enrichment and network-based análisis. *BMC Bioinformatics*, 20:545.
 37. Liu F., Liu S., Ai F., Zhang D., Xiao Z., Nie X., Fu Y. (2017). miR-107 Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis of Colon Cancer Cells by Targeting Prostate Apoptosis Response-4 (Par4). *Oncology Research*.
 38. Liu X., Li. J., Qin F., Dai. S. (2015). miR-152 as a tumor suppressor microRNA: Target recognition and regulation in cancer (Review). *ONCOLOGY LETTERS* 11: 3911-3916.
 39. Liu T., Zhang Q., Zhang J., Li C., Miao Y., Lei Q., Li Q., Guo A. (2018). EVmiRNA: a database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Res.*
 40. Lodes M., Caraballo M., Suciú D., Munro S., Kumar A., Anderson B. (2009) Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray.
 41. Magdariaga D., Sagaró N., Magdariaga E. (2011). Características histopatológicas de la neoplasia intraepitelial prostática. *MEDISAN.* 15. 482-488.
 42. Martínez D., Herrera L. (2006). ANGIOGÉNESIS: VEGF/VEGFRs como Blancos Terapéuticos en el Tratamiento Contra el Cáncer. *Cancerología* 1: 83-96.
 43. Martínez S., et al. (2018). Mecanismos de resistencia a la castración. *Arch. Esp. Urol*; 71 (8): 628-638.
 44. Michael C., Bruce R., Philipp D., Christine E., Stephen F., Maha H., Daniel L., William L., Mohammad M., William O., David P., Adam K. (2019). Cáncer De Próstata Resistente A La Castración: Guía De La Asociación Urológica Americana (American Urological Association, AUA).

-
-
45. Mitchell P., Parkin R., Kroh E., Fritz B., Wyman S., Pogosova E., *et al.* (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*;105(30):10513-8.
 46. NOM-048-SSA2-2017. Para la detección, diagnóstico, tratamiento y vigilancia epidemiológica del crecimiento prostático benigno y del cáncer de próstata.
 47. Noiri E., Hu Y., Bahou W., Keese C., Giaever I., Goligorsky M. (1997). Permissive role of nitric oxide in endothelin-induced migration of endothelial cells. *J Biol Chem*; 272: 1747-52.
 48. Ochoa-Carrillo y colaboradores. Reunión panel de expertos en cáncer de próstata. (2011). *GAMO Vol. 10 Sup. 3*.
 49. Parvae P., Sarmadian H., Khansarinejad B., Amini M., Mondanizadeh M. (2016). Plasma Level of MicroRNAs, MiR-107, MiR-194 and MiR-210 as Potential Biomarkers for Diagnosis Intestinal-Type Gastric Cancer in Human.
 50. Ren W., *et al.* (2019). Exosomal miRNA-107 induces myeloid-derived suppressor cell expansion in gastric cancer. *Cancer Management and Research* 2019:11 4023–4040.
 51. Risau W. (1997). Mechanism of angiogenesis. *Nature*, 386: 671-674.
 52. Sekhon K., Bucay N., Majid S., Dahiya R., Saini S. (2016). MicroRNAs and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Oncotarget*. Vol. 7, No. 41.
 53. Shen M.M., Abate-Shen C. 2010. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev* 24: 1967-2000.
 54. Simion V., Haemming S., Feinberg M. (2019). LncRNAs in vascular biology and disease. *Vascul Pharmacol*; 114: 145–156
 55. Skuse A. (2015). *Constructions of Cancer in Early Modern England: Ravenous Natures* [Internet]. London (UK): Palgrave Macmillan. *Cancerous Growth and Malignancy*. Chapter 4.
 56. SMeO. *Prevención y diagnóstico oportuno en cáncer*. 2018.
 57. Yu B., Wang S. (2018). *Angio-LncRs: LncRNAs that regulate angiogenesis and vascular disease*. *Theranostics*. Vol. 8, Issue 13.
 58. Statello L., Guo C., Chen L., Huarte M. (2021). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature*. Volume 22.
 59. Vestweber D. (2008). VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*; 28: 223-32.

-
-
60. Vishnu P, Tan W. (2010). Update on options for treatment of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Onco Targets Ther*; 3:39-51.
61. Wang L, Han S, Jin G, Zhou X, Li M, Ying X, Wang L, Wu H, Zhu Q. Linc00963: a novel, long non-coding RNA involved in the transition of prostate cancer from androgen-dependence to androgen-independence. *Int J Oncol*. 2014 Jun;44(6):2041-9. doi: 10.3892/ijo.2014.2363. Epub 2014 Apr 2. PMID: 24691949.
62. Wagner S., Ngezahayo A., Murua M., Nolte I. 2014. Role of miRNA *Let-7* and Its Major Targets in Prostate Cancer. *BioMed Research International*, 376326.
63. Wang S. and Olson E. (2009) AngiomiRs-Key Regulators of Angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev*; 19(3): 205–211.
64. Wang G., Zhao D., Spring D., DePinho R. 2019. Genetics and biology of prostate cancer. *GENES & DEVELOPMENT* 32:1105–114.
65. Wang G., Zhao D., Spring D., DePinho R. 2018. Genetics and biology of prostate cancer. *GENES & DEVELOPMENT* 32:1105–1140.
66. Warburg, O. 1956. On respiratory impairment in cancer cells. *Science* 124, 269–270.
67. Yang X., Yang Y., Gan R., Zhao L., Li W., Zhou H., Wang X., Lu J., Meng Q. (2014) Down-Regulation of miR-221 and miR-222 Restrain Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration that is Partly Mediated by Activation of SIRT1. *PLOS ONE*. Volume 9, issue 6.
68. Yin D., Li Y., Fu C., and Feng Y. (2018). Pro-Angiogenic Role of LncRNA HULC in Microvascular Endothelial Cells via Sequestering miR-124. *Cell Physiol Biochem*. 50; 2188-2202.
69. Yu Q., Liu P., Li Z., Zhang C., Chen S., Li Z., Zhang G., Li J. (2018). miR-103/107 induces tumorigenicity un bladder cancer cell by suppressing PTEN. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*.
70. Yu H., Xue Y., Wang P., Liu X., Ma J., Zheng J., et al. (2017). Knockdown of long non-coding RNA XIST increases blood-tumor barrier permeability and inhibits glioma angiogenesis by targeting miR-137. *Oncogenesis*; 6 e303.
71. Zhang X., Jin K., Luo J., Liu B., Xie L. (2019). MicroRNA-107 inhibits proliferation of prostate cancer cells by targeting cyclin E1. *NEOPLASMA*.
72. Zhao Z., Sun W., Guo z., Zhang J., Yu H., Liu B. (2019). Mechanisms of lncRNA/miRNA interactions in angiogenesis. *Life Science*.

