

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

**Expresión y validación del miRNA-107 en biopsias
líquidas de pacientes mexicanos con cáncer de
próstata**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS GENÓMICAS

P R E S E N T A :

DAVID ALEJANDRO DE LA ROSA PÉREZ

D I R E C T O R A

DRA. MARÍA ELIZBETH ÁLVAREZ SÁNCHEZ

Ciudad de México, enero de 2018

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. Mario César López Camarillo
Secretario: Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Vocal: Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga

Lugar donde se realizó el posgrado:

PLANTEL DEL VALLE, UACM.

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. María Elizbeth Álvarez Sánchez
Universidad Autónoma de la Ciudad de México

Comité Tutorial:

Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, UACM

Dr. Mario César Lopez Camarillo, UACM

Dr. José Alí Flores Pérez, Nanopharmacia

M. en C. Raúl Aragón Franco, Hospital Central Militar

M. en C. Miguel Ángel del Moral, Saint Luke

Lectores de tesis

Dra. Lilia López Cánovas, UACM

Dr. Mario César Lopez Camarillo, UACM

Dra. Elisa Irene Azuara Liceaga, UACM

Agradecimientos

El presente trabajo de tesis se realizó en el Laboratorio 1 del Posgrado en Ciencias Genómicas de la Universidad Autónoma de la Ciudad de México, en colaboración con el área de Urología del Hospital Central Militar, bajo la Dirección de la Dra. María Elizabeth Álvarez Sánchez, a quien agradezco la confianza, la orientación y el apoyo brindado, así como los consejos y conocimientos adquiridos durante la estancia en el laboratorio que dirige y principalmente por su infinita paciencia en la recta final de los estudios de maestría.

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

Agradezco también al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al Dr. Mario Cesar López Camarillo por sus consejos y su amplio apoyo en el desarrollo experimental.

Al Dr. José Alí Pérez Flores por su experiencia invaluable, así como sus puntuales recomendaciones, al M. en C. Miguel Ángel del Moral por sus acertadas observaciones y consejos, al M. en C. Raúl Aragón Franco por su invaluable colaboración y apoyo.

Al Teniente Coronel Médico Cirujano, José Gadú Campos Salcedo y al Mayor Médico Cirujano, Carlos Omar German Garrido por su cooperación en la toma de muestras y su guía para el entendimiento de los datos clínicos de los pacientes voluntarios.

A los pacientes que aceptaron voluntariamente participar en el presente estudio por su confianza en la investigación científica.

A los compañeros del laboratorio 1 y 2 Alma, Laura, Jacqueline, Jonatan, Olga y Raúl, por compartir su sabiduría y experiencia, en el desarrollo de las técnicas del laboratorio.

A los compañeros de generación Mónica, Yareli, Diana, Frederik, Jorge y Víctor principalmente por su apoyo moral, por su alegría, camaradería y compartir todos los momentos de angustia y felicidad durante el desarrollo de nuestros estudios.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi familia, principalmente a Beatriz, por todos los sacrificios que has realizado, su apoyo y paciencia, —¡no lo habría logrado sin ti!—, a Alejandra, Emmanuel y María, por haberme prestado tiempo que no se como reponer, son la principal fuente de motivación e inspiración para poder superarme y buscar así un futuro mejor.

A mis padres por sus enseñanzas y educación que son los simientos para crecer y perseverar para cumplir con mis ideales.

A mis hermanos Pilar y Luis, por su apoyo moral y ayuda cuando fue necesario, lo que al final ha sido decisivo en el cumplimiento de esta etapa de vida.

Índice

Agradecimientos	iv
Dedicatoria	vi
Índice	vii
Índice de tablas	x
Índice de figuras	xi
Abreviaturas	xiii
Resumen.....	1
Abstract.....	3
1. Introducción	5
1.1. Antecedentes generales del tema	5
1.1.1. Cáncer	5
1.1.2. Carcinogénesis	5
1.1.3. <i>Hallmarks</i> del cáncer.....	8
1.1.4. Cáncer de próstata	9
1.1.5. Epidemiología	10
1.1.6. Diagnóstico del cáncer de próstata.....	12
1.1.7. Clasificación del cáncer de próstata.....	13
1.1.8. Tratamientos para el cáncer de próstata.....	15
1.1.9. Costos de atención del cáncer de próstata.....	21
2. Estado del arte	22
2.1. Marcadores tumorales.....	22
2.1.1. El papel de la proteómica y la genómica en la búsqueda de marcadores. ...	24
2.1.2. Los microRNAs	25
2.1.2.1. Biogénesis de los miRNAs.....	26

3. Antecedentes particulares de su proyecto.....	28
3.1. Biopsias líquidas	28
3.2. Los miRNAs circulantes	29
3.3. La función del miRNA-107 en cáncer.....	31
4. Importancia de continuar con el estudio	34
5. Justificación	35
6. Hipótesis.....	36
7. Objetivos.....	37
7.1. Objetivo general	37
7.2. Objetivos particulares.....	37
8. Estrategia experimental.....	38
9. Metodología.....	40
9.1. Obtención de las muestras.....	40
9.2. Aislamiento de RNA total	40
9.3. Retrotranscripción del miR-107.....	41
9.4. Cuantificación del miRNA por qRT-PCR	41
9.5. Cálculo de fold change.....	42
9.6. Análisis bio-informático	42
9.7. Amplificación del vector.....	43
9.7.1. Transformación de células <i>E. coli</i> DH5 α	43
9.7.2. Extracción del plásmido	43
9.8. Procedimiento de clonación de la región 3' UTR PTEN	43
9.9. Validación del blanco modulado por el miR-107 mediante ensayos de luciferasa.....	47
9.9.1. Transfección del vector en células PC3.....	47
9.9.2. Ensayo de medición de actividad de luciferasa	48

9.10.	Análisis de inmunodetección.....	48
9.10.1.	Preparación de extractos proteicos	48
9.10.2.	Determinación de la concentración de proteínas	49
9.10.3.	Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes.....	49
9.10.4.	Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa	49
9.10.5.	Ensayo de Western Blot.....	50
9.11.	Ensayo de herida	50
10.	Resultados	51
10.1.	Objetivo 1.....	51
10.1.1.	Criterios de inclusión en el estudio	51
10.1.2.	Estimación del tamaño de la muestra	52
10.1.3.	Datos clínicos de los casos.....	53
10.1.4.	Expresión relativa del miR-107 entre casos y controles.....	57
10.2.	Objetivo 2.....	62
10.2.1.	Secuencia y localización del miR-107.....	62
10.2.2.	Análisis de enriquecimiento y ontología	64
10.2.3.	Identificación de posibles sitios de unión del miR-107 en PTEN	68
10.3.	Objetivo 3.....	71
10.3.1.	Hibridación de nucleótidos	71
10.4.	Expresión relativa del miR-107 en las líneas celulares DU145 y PC3	76
10.5.	Ensayo de luciferasa.....	76
10.6.	Evaluación de la proteína PTEN en la línea celular pC3.....	80
10.7.	Evaluación del ensayo de herida	80
11.	Discusión.....	83
12.	Conclusión	85

13.	Perspectivas de la investigación	90
14.	Referencias Bibliográficas	91

Índice de tablas

Tabla 1.-	Mortalidad por tumores malignos en México de 1990 a 2012.	11
Tabla 2.-	Funciones del miR-107 en algunos tipos de cáncer.	32
Tabla 3.-	Resumen de información clínica de los tumores, ordenados por etapa clínica (I al IV), y distribuidos por puntuación de Gleason y valor TNM.	54
Tabla 4.-	Edad y concentración de PSA en la sangre de Casos y controles	55
Tabla 5.-	Proteínas y vías de señalización identificadas como reguladas por el miRNA-107 en el análisis de ontología.	67

Índice de figuras

Figura 1.-	Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel global.	7
Figura 2.-	Biogénesis de los miRNAs.	27
Figura 3.-	Expresión del miR-107 en diferentes tejidos.	33
Figura 4.-	Mapa del vector pMIR-REPORT.	45
Figura 5.-	Distribución de los tratamientos del gupo de estudio.	56
Fgura 6.-	Expresión relativa del miRNA-107 en los grupos de estudio.	58
Figura7.	Expresión relativa del miRNA-107 en el grupo de estudio estratificado por etapa clínica del CaP.	59
Figura 8.-	Expresión relativa del miR-107 en el grupo de estudio de acuerdo a su evolución (CaPRC y CaP).	60
Figura 9.-	Curva Receptor Operador de la expresión relativa del miR-107.	61
Figura 10.-	Mapa del cromosoma 10.	63
Figura 11.-	Sección del extremo 3'UTR del mRNA de PTEN.	69
Figura 12.-	Posibles itios de unión del miR-107 a la sección 3'UTR del mRNA de PTEN	70
Figura 13.-	PCR colony de colonias transformadas con el vector pMIR	72
Figura 14.-	Hibridación de los insertos.	73
Figura 15.-	Verificación del vector con insertos por doble digestión	74
Figura 16.-	Liberación de los insertos por doble digestión.	75
Figura 17.-	Expresión relativa del miRNA-107 en las líneas celulares 1)PC3 sin	78

transfectar el pre-miRNA-107 y 2)PC3 transfectada

Figura 18.-	Ensayo de luciferasa	80
Figura 19.-	Inmunodetección de las proteínas PTEN, AKT fosforilada (ser 437) y AKT desfosforilada, GADPH como normalizador.	81
Figura 20.-	Ensayo de migración celular.	82
Figura 21.-	Vía de señalización PIP3 – AKT.	89

Abreviaturas

OMS	Organización Mundial de la Salud
FDA	Siglas en inglés de la Administración Federal de Fármacos
PSA	Siglas en inglés de Antígeno Prostático Específico
RNA	Siglas en inglés de Ácido Ribonucleico
DNA	Siglas en inglés de Ácido Desoxirribonucleico
miRNA	micro Ácido Ribonucleico.
Pri-miRNA	microRNA primario
Pre-miRNA	precursor del microRNA
mARN	Ácido Ribonucleico mensajero
RNAsas	Ribonucleasas
CaP	Cáncer de Próstata
CaPRC	Cáncer de Próstata Resistente a la Castración
TAC	Tomografía Axial Computarizada
RM	Resonancia Magnética
LDH	Enzima Lactato Deshidrogenasa
2D-DIGE	Electroforesis diferencial en gel de dos dimensiones
MS	Siglas en inglés de Espectrometría de Masas
MRM-MS	Siglas en inglés de Espectrometría de masas de monitoreo de reacciones múltiples
RISC	Siglas en inglés de Complejo de Silenciamiento Inducido de RNA
LHRH	Hormona Liberadora de la Hormona Leutinizante

PAP	Siglas en inglés de Fosfatasa Ácida Prostática
SDS-PAGE	Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Condiciones Desnaturalizantes con Dodecil Sulfato de Sodio.
ROC	Siglas en ingles de Curva de Operador Receptor
RT-qPCR	Transcripción Reversa Cuantitativa de la Reacción en Cadena de la Polimerasa
pM	Unidad de concentración, pico Molar
mL	Unidad de volumen, mililitro
ng	Unidad de masa, nanogramos
μL	Unidad de volumen, microlitro
°C	Unidad de temperatura, grado Célcius
ASRM	Siglas en inglés Tasa de Mortalidad Estandarizada por Edad
ADD	Siglas en inglés de Promedio de Edad al Deceso
APC	Siglas en inglés de Porcentaje Anual de Cámbio
GnRH	Agonistas de la hormona leutinizante
TOF-MS	Siglas en inglés de Espetrometría de Masas – Tiempo de Vuelo
SELDI	siglas en inglés deDesorción por Ionización de Superficie Mejorada por Laser
PCR	Siglas en inglés de Reacción en Cadena de la Polimerasa
SNC	Sistema Nervioso Central
rpm	Unidad de velocidad angular, revoluciones por minuto
min	Unidad de tiempo, minuto
pb	Longitud de una cádena de ácido nucleico en pares de bases

Kb	Longitud de la cadena de ácido nucleico en miles de pares de bases
----	--

Resumen

El cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad en el mundo, siendo el cáncer de próstata (CaP) el primero en hombres, en México el cáncer de próstata también es la principal causa de muerte por cáncer en hombres, el 96% de los casos de cáncer de próstata son adenocarcinomas, de los cuales cerca del 30% evolucionan en cáncer de próstata resistente a la castración, el único biomarcador autorizado para el diagnóstico y monitoreo es el antígeno prostático específico (PSA) en sangre con un valor máximo normal de 4ng/mL, sin embargo existen varias causas de tener un valor de PSA elevado como infecciones en la próstata, prostatitis, entre otros, por lo que éste marcador tiene baja sensibilidad, lo que hace necesario continuar con investigaciones que buscan obtener nuevos biomarcadores con mayor sensibilidad.

Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes que ejercen un control post-trascricional de los genes al acoplarse a regiones complementarias de los mRNA, estos se han encontrado des-regulados en diversas enfermedades como el cáncer, por lo que podrían ser evaluados para poder utilizarse como biomarcadores en cáncer.

En la presente investigación se evaluaron los niveles séricos del miR- a través de un estudio observacional transversal de casos y controles; se realizó una búsqueda bioinformática de posibles blancos involucrados con las vías de señalización del cáncer. Y se evaluó la función del miR-107 sobre el fenotipo de invasión en células de próstata, así como el blanco predicho, con un ensayo de luciferasa. Los resultados muestran que el miRNA-107 se encuentra sobre-expresado a niveles séricos en pacientes con cáncer de próstata y que es posible diferenciar a los pacientes que se encuentran en etapas de cáncer avanzadas (etapa IV), de igual forma para aquellos pacientes que tienen cáncer de próstata resistente a la castración, por lo que podría ser utilizado como posible biomarcador de seguimiento o evaluación al tratamiento. Se encontraron posibles blancos involucrados con la vía de señalización PIP3-AKT, involucrada en sobrevivencia, evasión de la apoptosis y angiogénesis. Se seleccionó a PTEN como posible blanco a evaluar, encontrando que si es blanco del miR-107, en

un ensayo de luciferasa, este silenciamiento afecta de forma indirecta a la función de la proteína AKT, al alterar la proporción de la proteína AKT fosforilada respecto al AKT no fosforilada, de igual forma el fenotipo de invasión es incrementado cuando se transfectan las células de próstata con el pre-miR-107. Estas observaciones podrían sugerir que las células cancerosas de próstata liberan por distintos medios el miR-107 al torrente sanguíneo y que este actúa dentro de la célula de próstata regulando negativamente la expresión de la proteína PTEN, la cual al disminuir su expresión proteica altera el balance de fosforilación de la proteína AKT, el cual al encontrarse en mayor proporción fosforilado, continúa con su función corriente abajo de la vía de señalización, de igual forma se observa que la capacidad invasiva de las células de próstata se incrementan al incrementar la expresión del miR-107 vía a transfección del pre-miR-107.

Abstract

Cancer is the leading cause of death due to disease in the world, with prostate cancer (CaP) being the first in men, in Mexico prostate cancer is also the main cause of cancer death in men, 96% of the cases of prostate cancer are adenocarcinomas, of which about 30% evolve in castration-resistant prostate cancer, the only biomarker authorized for diagnosis and monitoring is the prostate-specific antigen (PSA) in blood with a normal maximum value of 4ng / mL, however there are several causes of having a high PSA value such as infections in the prostate, prostatitis, among others, so this marker has low sensitivity, which makes it necessary to continue with research seeking to obtain new biomarkers with greater sensibility

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that exert a post-transcriptional control of the genes when they are coupled to complementary regions of the mRNA, these have been found to be deregulated in various diseases such as cancer, so they could be evaluated for can be used as biomarkers in cancer.

In the present investigation the serum levels of the miR- were evaluated through an observational cross-sectional study of cases and controls; A bioinformatic search of possible targets involved with cancer signaling pathways was carried out. And the function of miR-107 on the invasion phenotype in prostate cells was evaluated, as well as the predicted target, with a luciferase assay. The results show that miRNA-107 is over-expressed at serum levels in patients with prostate cancer and that it is possible to differentiate patients who are in advanced stages of cancer (stage IV), in the same way for those patients who They have castration-resistant prostate cancer, so it could be used as a possible biomarker for monitoring or evaluation of treatment. Possible targets were found to be involved with the PIP3-AKT signaling pathway, involved in survival, evasion of apoptosis and angiogenesis. PTEN was selected as the target to be evaluated, finding that if it is target of miR-107, in a luciferase assay, this silencing indirectly affects the function of the AKT protein, by altering the proportion of the phosphorylated AKT protein. to non-phosphorylated AKT, similarly the invasion phenotype is increased when the prostate cells are transfected with the

pre-miR-107. These observations could suggest that prostate cancer cells release miR-107 into the bloodstream by different means and that it acts inside the prostate cell, negatively regulating the expression of the PTEN protein, which, by decreasing its protein expression, alters the balance of phosphorylation of the AKT protein, which, being present in a greater phosphorylated proportion, continues with its function downstream of the signaling pathway, in the same way it is observed that the invasive capacity of the prostate cells is increased by increasing the expression of the miR- 107 through the transfection of the pre-miR-107.

1. Introducción

1.1. Antecedentes generales del tema

1.1.1. Cáncer

El cáncer es un grupo de enfermedades etiológicamente distintas entre sí, caracterizadas por una generación exacerbada de células con capacidad de invadir tejidos subyacentes y diseminarse a otros órganos (Parkin, et al 2005).

El término cáncer se refiere a más de cien formas de la enfermedad, de acuerdo al tejido afectado, incluso dentro de un mismo tejido se puede encontrar distintas variedades de cáncer con distinta morfología y grado de malignidad.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha determinado que el cáncer se ha convertido en la primera causa de muerte por enfermedad a nivel global con alrededor de 8.2 millones de defunciones ocurridas en el año 2012 (57% hombres y 43 % mujeres), lo que los coloca como uno de los principales problemas de salud pública a nivel mundial (GLOBOCAN, 2012) (Figura 1).

1.1.2. Carcinogénesis

El origen del cáncer proviene del daño al ADN de una célula, el cual sufre alteraciones incluyendo mutaciones, deleciones inserciones, traslocaciones, duplicaciones, cambios de sentido. Las cuales son transmitidas a su descendencia (clonas) en el proceso de división celular, provocando cambios en la diferenciación celular, la proliferación, crecimiento y migración en diversas etapas que dan lugar a la carcinogénesis, la cual se puede dividir en las siguientes etapas (Maemura *et al*, 2014):

- Inicio: en esta etapa los cambios genéticos de la célula le proporcionan características de crecimiento y división aumentados comparando con una célula normal, la cual se debe a la constante exposición a un agente carcinógeno, generando anomalías genómicas que promueven la transcripción de oncogenes apagando la expresión de genes supresores de

tumores. Los oncogenes permiten la expresión de diversos factores de transcripción, de crecimiento celular y de moléculas que promueven una división celular desregulada (K-ras y N-ras; Erb-B-2, C-myc, C-fos entre otros.), alterando el control del ciclo celular. La etapa de inicio, puede ser controlada por mecanismos de reparación de ADN, o apoptosis.

- Promoción: en esta etapa se desarrolla la expansión de células cancerosas, debido a que la exposición continua a agentes carcinogénicos ocasiona daños que promueven la disfunción de señales de muerte celular o senescencia, ya sea a través de la modificación de receptores celulares relacionados con señales de control de la proliferación o con sus respectivas vías de señalización.
- Progresión: en esta etapa la célula cancerosa continúa acumulando alteraciones en el ADN lo que la lleva a modificar su proceso proliferativo y su diferenciación. Esta fase es irreversible, se advierten alteraciones en mecanismos mitóticos y en el funcionamiento y tamaño de los telómeros, también se advierten cambios epigenéticos, que facilitan la generación de una masa tumoral de la cual posteriormente se iniciarán procesos celulares que facilitan la invasión a otros órganos y la migración hacia otros tejidos lejanos (Blanco y Bullón, 1987; Larid, 1997).

Se estima que el 80% de los cánceres esporádicos se deben a exposición a factores ambientales. Por ejemplo: el cigarrillo predispone al cáncer de pulmón y de vejiga; las aminas aromáticas al cáncer de vejiga; la aflatoxina al cáncer de hígado y el benceno a las leucemias entre otros. (León *et al*, 1988).

La mutación genética en la vía de la carcinogénesis también puede dar origen a:

- a) Los cánceres heredables por mutaciones en uno o ambos alelos de las células germinales (Cramer *et al*, 1994; Narod, 1993).
- b) Los cánceres esporádicos, donde las alteraciones genéticas dependen de los mutágenos ambientales (virus, radiaciones o sustancias químicas) (Gallo, 1997; Green1977, Iwasawa *et al*, 1996).

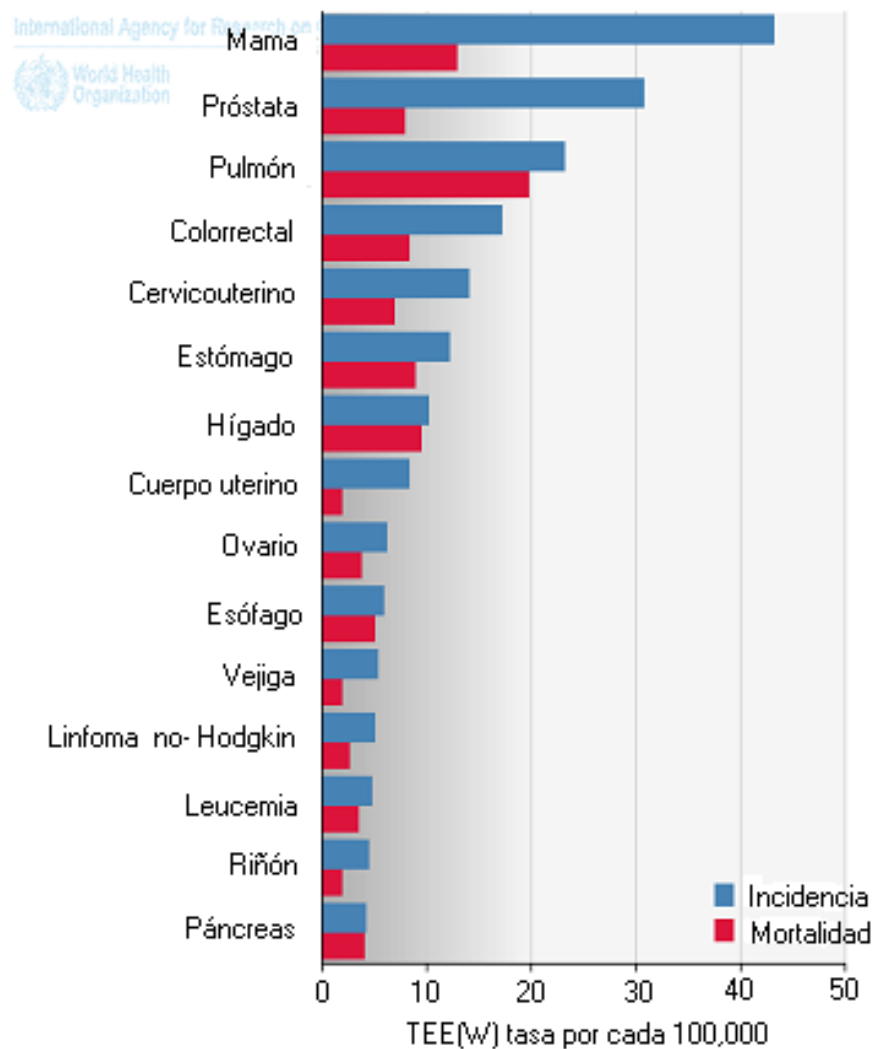


Figura 1.- Incidencia y mortalidad del cáncer a nivel global, modificada de GLOBOCAN, 2012.

1.1.3. *Hallmarks del cáncer*

Cien billones de células componen el organismo humano, diferenciadas para cumplir funciones específicas, las cuales deben de reproducirse para reemplazar a las células, que llegadas al final de su ciclo de vida deben morir (Bullón, 1987; Cavenee y White, 1995). La división celular está controlada por dos sistemas, uno estimulador y otro inhibitorio de los cuales dependen la normalidad de los tejidos y los órganos; dichos sistemas consisten en sustancias elaboradas por la misma célula (autorregulación o autocrinas) o por las células vecinas, de la matriz extracelular o de otros tejidos distantes (hormonas, factores de crecimiento, entre otros) (Cavenee y White, 1995; Esteves, 1978). Estos estímulos actúan sobre las células a través de receptores proteicos que se encuentran en la superficie de la membrana celular, desencadenando la activación de diversas vías de señalización, las cuales activan factores de transcripción de genes blanco; lo cual comanda la expresión o represión de diversas proteínas con actividad específica dentro de cada tipo celular. En las células cancerosas estos controles de crecimiento y proliferación son ignorados, respondiendo solo a señales internas que estimulan el crecimiento y la proliferación celular.

En el año 2000, Hanahan y Weinberg propusieron un modelo que define las seis propiedades que adquiere y caracterizan a un tumor maligno: potencial replicativo ilimitado, auto-suficiencia en señales de crecimiento, insensibilidad a inhibidores del crecimiento, evasión de la apoptosis, angiogénesis mantenida y capacidad de invadir los tejidos y generar metástasis.

La angiogénesis y la metástasis son características distintivas del cáncer aunque buena parte de los avances en el conocimiento se han centrado en los mecanismos moleculares y genéticos de la transformación oncogénica, desde el punto de vista biosanitario el gran problema es la adquisición de un fenotipo invasivo y metastásico, causantes de los mayores porcentajes de morbilidad y mortalidad en oncología. En este contexto, juegan un papel fundamental los dos últimos sellos distintivos del cáncer: angiogénesis e invasión y metástasis. Para que un tumor pueda crecer más

allá de unos pocos milímetros, es esencial que adquiriera la capacidad de inducir y mantener angiogénesis. El resultado final es la formación de una nueva red vascular que irriga el tumor, aportándole los nutrientes y el oxígeno que necesita para expandirse. Además del crecimiento tumoral, la angiogénesis es clave para posibilitar la invasión y el crecimiento de metástasis. Once años después de la publicación de su influyente revisión, Hanahan y Weinberg consideraron que era necesario actualizarlos, en esta nueva revisión “Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 144: 646- 674, 2011”, los autores defienden que la noción de "las características distintivas del cáncer" representa un principio de organización para racionalizar la diversidad y complejidad de las enfermedades neoplásicas. En esta extensa revisión los autores hacen un ejercicio sistemático, incorporando progresos conceptuales de la última década, que les lleva a ampliar los sellos con cuatro nuevas características, las cuales incluyen la desregulación energética, la evasión del sistema inmune, la inestabilidad genética y la promoción de señales pro-inflamatorias. Sin embargo este incremento de características ha generado confusión principalmente porque estas características no son exclusivas de tejido tumoral, por lo que en el año 2017 se realizó una nueva revisión, en la cual se redefinen las características distintivas de las neoplasias debido a que ciertas características antes enunciadas no son exclusivas de las células cancerosas e incluso se encuentran presentes en tumores benignos. Por lo que se redefinieron únicamente siete características distintivas que adquieren las células durante el desarrollo de los tumores malignos las cuales son las siguientes: ventaja de proliferación selectiva, respuesta alterada al estrés, invasión y metástasis, reprogramación metabólica, modulación inmunológica, y un microambiente aberrante. (Hanahan y Weinberg, 2011, Fouad y Aanei 2017).

1.1.4. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata se define como una serie de enfermedades de diversos orígenes que provocan un crecimiento exacerbado de células prostáticas (glandulares, epiteliales o de matriz extracelular) que pueden invadir órganos adyacentes (nódulos linfáticos peritoneales, vesículas seminales y vejiga) y diseminarse a otros órganos (Cerebro, huesos y pulmón, entre otros). La próstata es

una glándula que se encuentra por debajo de la vejiga de los hombres y tiene como función operar como válvula que permite el vaciado de la vejiga y producir el vehículo para el semen. El cáncer de próstata ocurre principalmente en hombres de edad avanzada, siendo raro en hombres menores de 40 años. Los factores de riesgo de desarrollarlo incluyen: tener más de 65 años, historia familiar de cáncer, ser descendiente de raza africana y padecer sobrepeso u obesidad (Secretaría de salud, 2001).

1.1.5. Epidemiología

Hacia el año 2012 la OMS estableció que el cáncer es la principal causa de muerte por enfermedad a nivel global, En la población masculina, el cáncer de próstata es el más común seguido por el cáncer de pulmón. En el año 2012 se estimó que la incidencia del cáncer de próstata fue de 30.7 por cada 100 000 hombres con una tasa de mortalidad de 7.8 por cada 100 000 hombres (Tasas estandarizadas por edad) (GLOBOCAN, 2012).

En México en el año 2012 se determinó que para la población masculina la principal causa de muerte relacionada con cáncer fue el cáncer de próstata, con una tasa de mortalidad (estandarizada por edad en mayores a 20 años) de 10.4 por cada 100 000 hombres (Tabla 1). Con una distribución por entidad federativa heterogénea, los estados que mayor tasa de mortalidad presentaron para cáncer de próstata en el año 2012 fueron Aguascalientes (15.8), Nayarit (14.2), Jalisco (13.7), Colima (13.5), y Sinaloa (13.4), mientras que las tasas más bajas se encontraron en Quintana Roo (6.7), Yucatán (7.2) e Hidalgo (7.9) [número de personas por cada 100,000 hombres] (Rizo y col, 2015).

Tabla 1.- Mortalidad por tumores malignos en México de 1990 a 2012.

	Tipo de cáncer	Decesos 2012	Tasa de mortalidad 2012	ASMR 2012	ADD 2012	APC
Hombres	Próstata	5,908	10.3	10.4	77	2.9
	Bronquios y pulmón	4,140	7.2	8.0	70	-0.6
	Estómago	2,981	5.2	5.8	66	-0.1
	Hígado	2,757	4.8	5.4	69	1.8
	Colon	2,034	3.6	4.0	64	4.6
	Páncreas	1,836	3.2	3.7	67	2.1
	Leucemia linfoide	1,139	2.0	2.0	34	1.3
	Cerebro	1,126	2.0	2.2	51	2.2
	Riñón	1,114	1.9	2.2	63	2.8
	Laringe	747	1.3	1.5	70	-0.2
	Inespecífico	1,001	1.8	1.9	63	-0.9
	Resto	11,321	19.8	21.2	61	1.9
	Total	36,104	63.1	67.7	65	1.4

Tasa de mortalidad por cada 100,000; ASMR = tasa de mortalidad estandarizada por edad en mayores de 20 años; ADD = promedio de edad al deceso; APC = porcentaje anual de cambio. Modificada de Rizo y col., 2015.

1.1.6. Diagnóstico del cáncer de próstata.

Un hombre con sospechas de cáncer de próstata puede padecer alguno de los siguientes síntomas:

- Problemas para orinar, dificultad para iniciar o detener el flujo de orina o goteo
- Dolor en la parte baja de la espalda
- Dolor al eyacular

Por lo que deberá acudir con un médico especialista para que se realice el diagnóstico con precisión, el cual se establece a través de estudios como el tacto rectal digital, ultrasonografía (US), tomografía axial computarizada (TAC), resonancia magnética nuclear (RMN), y la determinación de marcadores séricos del tumor; de éste último, el único que se encuentra autorizado por la Administración Federal de Fármacos de los Estados Unidos de América (FDA por sus siglas en inglés) es el antígeno prostático específico (PSA por su siglas en inglés) el cual se produce únicamente en el citoplasma de células prostáticas epiteliales, tanto benignas como malignas, su nivel sérico se correlaciona con el volumen de la próstata tanto en condiciones cancerosas como benignas (Secretaría de Salud, 2001).

El PSA es una gluco-proteína que tiene como función hidrolizar la semenogelina-1, lo que lleva a la licuefacción del coágulo seminal en los conductos de las vesículas seminales para liberar el tránsito del fluido seminal (Mendez *et al.*, 2008).

El PSA se analiza en suero sanguíneo definiendo como valores normales las concentraciones menores a 4 ng/mL, valores intermedios (zona gris) cuando existen concentraciones entre 4.1 y 10 ng/mL y altamente sospechosos cuando existen concentraciones mayores a 10 ng/mL. Estas últimas concentraciones requieren la confirmación a través de una biopsia. El 66% de los casos de cáncer prostático se ubican en personas con resultados mayores a 10 ng/mL (Secretaría de Salud, 2001).

El tipo histológico del cáncer de próstata es muy importante para determinar las acciones y terapias que puede recibir el paciente, aproximadamente el 95% de todos los carcinomas prostáticos son adenocarcinomas acinares originados en la porción glandular de la próstata y sólo un 4% es transicional, escamoso o endometroide, estos derivan de los conductos y por lo tanto son hormono-independientes. El 1% son sarcomas (cáncer que se desarrolla en tejido conjuntivo) (Secretaría de Salud, 2001)

1.1.7. Clasificación del cáncer de próstata

Una vez que se confirma a través de una biopsia el diagnóstico, se realizan algunos ensayos de laboratorio para clasificar el grado de avance del cáncer.

La puntuación de Gleason (solo aplicable a adenocarcinomas) es una clasificación basada en la diferenciación celular y la relación estroma-glándula del cáncer, para determinarla, una muestra de tejido se observa al microscopio y se le asigna un puntaje de 1 a 10 dependiendo de las diferencias entre las células, la puntuación depende de la morfología del total de células observadas. La puntuación Gleason es importante porque determina el pronóstico y evolución del cáncer (Secretaría de salud, 2001). El médico asigna una puntuación a las células entre el 1 y el 5, la cual, se basa en qué tan anormales se ven las células. El grado 1 significa que las células se ven como células prostáticas normales. El grado 5 significa que las células se ven diferentes a las células prostáticas normales. La mayoría de los cánceres de próstata contienen células en grados diferentes. Por lo tanto, la puntuación se otorga con base en el número más frecuente de células anormales. La puntuación de Gleason se determina sumando los dos grados más comunes. Por ejemplo, si el grado más común de las células en una muestra de tejido fuera grado 3, seguido del grado 4. La puntuación de Gleason para esta muestra sería 7. La puntuación más alta indica un cáncer de crecimiento más rápido por lo que es más probable que se disemine.

Actualmente la puntuación más baja asignada a un tumor es grado 6. Las puntuaciones menores a 6 muestran células normales o casi normales. La puntuación de Gleason se complementa con la clasificación Tumor, Nódulo, Metástasis (TNM), en donde de la evaluación inicial se determina el estadio local del

tumor, por ejemplo enfermedad intracapsular (T1-T2) y extracapsular (T3-T4). Ésta clasificación tiene un impacto importante en la toma de decisiones para el tratamiento.

- TNM I o A: es un cáncer de próstata descubierto incidentalmente en el paciente con adenoma operable, en el informe del patólogo aparece el cáncer de próstata.
- TNM II o B: se detecta al tacto mediante la palpación de un adenoma que presenta pequeños nódulos duros en su interior. B 1 ó 2 depende del tamaño y de si está en los dos lóbulos de la próstata o no.
- TNM III o C: es una próstata que al tacto está dura y fija por que el cáncer se extiende más allá de la cápsula prostática.
- TNM IV: es el cáncer que ya presenta metástasis al hacer el diagnóstico.

La estadificación o etapa del cáncer es una manera de describir cuánto ha avanzado el cáncer en el cuerpo del paciente y en dónde está ubicado, así como si se ha diseminado a otros órganos. Cuanto más alto sea el estadio, más avanzado será el cáncer.

Cáncer en etapa I. El cáncer solo se encuentra en una parte de la próstata, se conoce como cáncer de próstata localizado. No se puede sentir durante un examen rectal digital o verse con pruebas de imageneología. Si el PSA es menor a 10 y el puntaje de Gleason es de 6 o menor, el cáncer en etapa I probablemente crecerá lentamente.

Cáncer en etapa II. El cáncer está más avanzado que en la etapa I. No se ha diseminado más allá de la próstata y se le sigue llamando localizado. Estas células son menos normales que las células en etapa I, y pueden crecer más rápido. Existen dos tipos de cáncer de próstata en etapa II:

Etapa II-A se encuentra más a menudo en un solo lado de la próstata.

Etapa II-B se puede encontrar en ambos lados de la próstata.

Cáncer en etapa III. El cáncer se ha diseminado más allá de la próstata hacia el tejido local. Se puede haber diseminado a las vesículas seminales, se le conoce como cáncer de próstata localmente avanzado.

Cáncer en etapa IV. El cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo. Puede estar en los nódulos linfáticos o huesos cercanos, con frecuencia los de la pelvis o la columna. Otros órganos como cerebro, vejiga, hígado o pulmones pueden estar involucrados (Secretaría de Salud, 2001).

1.1.8. Tratamientos para el cáncer de próstata

Una vez que se diagnostica y se determina la etapa del cáncer de próstata, es mucha la información que debe tomar en cuenta antes de que el médico seleccione un plan de tratamiento. Dependiendo del tipo histológico y la clasificación, las opciones de tratamiento para los hombres con cáncer de próstata pueden incluir las siguientes (Heidenreich *et al*, 2010):

- Espera en observación o vigilancia activa para cáncer de próstata Con frecuencia el cáncer de próstata crece muy lentamente, por lo que algunos hombres (de edad avanzada o con otros problemas graves de salud) no necesitarán tratamiento contra el cáncer de próstata. La vigilancia activa se refiere a la observación minuciosa del cáncer. Por lo general, este método incluye una visita al médico con una prueba de sangre PSA y un examen digital del recto alrededor de cada seis meses. Adicionalmente se realizan biopsias de la próstata cada año. La espera en observación por otro lado se define como el realizar algún tipo de seguimiento menos intensivo e invasivo que requiere menos pruebas se basa en los cambios de los síntomas para decidir si el tratamiento es necesario (Heidenreich *et al*, 2010,).
- Cirugía: es una opción para tratar de curar el cáncer de próstata si no se ha propagado hacia el exterior de la glándula prostática. El principal tipo de cirugía para el cáncer de próstata es la prostatectomía radical, en la cual, el cirujano extirpa toda la glándula prostática además de una porción del tejido que le rodea, incluyendo las vesículas seminales. Una prostatectomía radical

se puede hacer de diferentes maneras, abordaje abierto (método retropúbico, método perineal), métodos laparoscópicos, métodos asistidos por robot (Ng A.T. y Tam P.C., 2014).

- Radioterapia: La radiación se puede emplear: Como tratamiento inicial para tratar el cáncer que se encuentra confinado en la glándula prostática y que es de bajo grado, como parte del tratamiento inicial (junto con terapia hormonal) para el cáncer que han crecido fuera de la próstata y hacia tejidos cercanos, o para el cáncer no se extirpó por completo o para aquel que es recurrente en el área de la próstata después de la cirugía y también para el cáncer avanzado, lo que ayuda a mantenerlo bajo control por tanto tiempo como sea posible y para ayudar a prevenir o aliviar los síntomas. Los dos tipos principales de radioterapia usados para el cáncer de próstata son radioterapia de rayos externos y braquiterapia (radiación interna) (Kass-Iliyya *et al.* 2018).
- Crioterapia: también conocida como criocirugía o crioablación, emplea temperaturas muy frías para congelar y eliminar las células cancerosas de la próstata. A pesar de que a veces se le denomina criocirugía, no es realmente un tipo de cirugía. El doctor emplea la ecografía transrectal (TRUS) para guiar varias sondas huecas (agujas) a través de la piel que se encuentra entre el ano y el escroto hasta la próstata. Entonces, se utilizan crio-gases a través de las agujas para congelar y destruir el tejido canceroso (Werneburg *et al.* 2017).
- Terapia hormonal: también conocida como terapia de privación de andrógenos o terapia supresora de andrógenos, tiene como objetivo reducir los niveles de hormonas andrógenas en el cuerpo, o evitar que estas hormonas estimulen el crecimiento de las células cancerosas de la próstata. Los andrógenos principales en el cuerpo son la testosterona y la dihidro-testosterona. Los testículos producen la mayor parte de los andrógenos, aunque las glándulas suprarrenales también producen una pequeña cantidad. Reducir los niveles de andrógenos o evitar que alcancen las células cancerosas de próstata provoca que se reduzca el tamaño de los tumores o que crezcan con menor velocidad

por un tiempo. Esta terapia se recomienda cuando el cáncer se ha propagado y no puede ser extirpado con cirugía o eliminado por radiación, si el cáncer continúa o regresa después del tratamiento con cirugía o radioterapia; también puede ser aplicado junto con la radioterapia como tratamiento inicial o antes de la terapia de radiación para tratar de reducir el tamaño del tumor e incrementar la eficacia del tratamiento (Ohlmann *et al*, 2017)

Dentro de los tratamientos para reducir los niveles de hormonas andrógenas, se encuentran la Orquiectomía (extirpación quirúrgica de los testículos) y el uso de fármacos agonistas de la hormona liberadora de la hormona leutinizante (LHRH), también llamados análogos de LHRH o agonistas GnRH. Estos medicamentos reducen la cantidad de testosterona producida por los testículos con una efectividad comparable con la orquiectomía. Cuando se administran por primera vez los agonistas de LHRH, aumentan brevemente los niveles de testosterona antes de disminuir a niveles muy bajos (fenómeno de exacerbación). Se puede evitar la exacerbación mediante la administración de medicamentos llamados antiandrógenos por varias semanas cuando se comienza el tratamiento con los agonistas de LHRH.

Los agonistas y antagonistas de LHRH pueden hacer que los testículos dejen de producir andrógenos, aunque otras células en el cuerpo, incluyendo las mismas células cancerosas de la próstata, pueden continuar con la producción de pequeñas cantidades, lo que puede estimular el crecimiento del cáncer. La abiraterona bloquea una enzima llamada CYP17 que ayuda a que estas células dejen de producir andrógenos.

La abiraterona puede usarse en pacientes con cáncer de próstata resistente a castración (el tumor canceroso que continúa desarrollándose a pesar de los bajos niveles de testosterona debido ya sea a un agonista de LHRH, antagonista de LHRH o a orquiectomía). La abiraterona se administra oralmente cada día, y no detiene la producción de testosterona por parte de los testículos de modo que los pacientes que no se hayan sometido a una orquiectomía necesitan continuar el tratamiento con un agonista o un antagonista de LHRH. (Gartrell y Saad. 2015, Ohlmann *et al*, 2017)

Los antiandrógenos son fármacos que se adhieren a estos receptores de modo que los andrógenos no puedan hacerlo, estos se administran diariamente vía oral, pero no se usan de forma frecuente por sí solos. Un antiandrógeno puede agregarse al tratamiento si la orquiectomía o un agonista/antagonista de LHRH ya no es eficaz por sí solo. Normalmente, cuando los andrógenos se unen al receptor, se activa una vía de señalización, indicando el crecimiento y división celular, por lo que los antiandrógenos bloquean esta señal, lo que es útil en pacientes con cáncer de próstata resistentes a la castración.

Un antiandrógeno también puede ser combinado con orquiectomía o un agonista de LHRH como terapia hormonal de primera línea (conocido como bloqueo combinado de los andrógenos). Si un antiandrógeno ya no surte efecto, simplemente la suspensión del antiandrógeno puede causar que el cáncer deje de crecer durante poco tiempo.

- Quimioterapia: se refiere a utilizar medicamentos que se administran vía oral o intravenosa, que se distribuyen en el cuerpo por el torrente sanguíneo, lo cual permite que este tratamiento sea potencialmente útil para aquellos cánceres que han hecho metástasis. La quimioterapia se usa cuando el cáncer de próstata se ha propagado fuera de la glándula prostática y la terapia hormonal ya no es eficaz. Aunque también se ha mostrado que la quimioterapia puede ser útil si se administra junto con la terapia hormonal. La quimioterapia no es un tratamiento convencional para el cáncer de próstata en etapa temprana, pero algunos estudios están determinando si este tratamiento podría ser útil si se administra por un corto periodo de tiempo después de la cirugía. Para el cáncer de próstata, por lo general, los medicamentos de quimioterapia se usan uno a la vez. Algunos de los medicamentos de quimioterapia que se utilizan para tratar el cáncer de próstata incluye: Docetaxel (Taxotere), Cabazitaxel (Jevtana), Mitoxantrona (Novantrone) y Estramustina (Emcyt) (Karandish *et al*, 2017).

En la mayoría de los casos, el primer medicamento de quimioterapia que se administra es el docetaxel, combinado con el medicamento esteroide prednisona. Si

este medicamento no surte efecto (o deja de funcionar), a menudo el próximo medicamento de quimioterapia a tratar es cabazitaxel, ambos medicamentos han demostrado eficacia al incrementar la sobrevivencia de los pacientes, sin embargo, es poco probable que la quimioterapia cure el cáncer de próstata (Ganju et al. 2014)

- El tratamiento con vacunas: se usa para combatir el cáncer reforzando el sistema inmunitario para ayudarlo a atacar a las células cancerosas de la próstata. La vacuna se usa para tratar el cáncer de próstata avanzado que ya no responde a la terapia hormonal inicial, pero que causa pocos o ningún síntoma (Handy y Antonarakis, 2017).

La vacuna se produce específicamente para cada paciente. Para producir esta vacuna, se le extraen los glóbulos blancos de la sangre por varias horas, entonces, las células se envían a un laboratorio, donde son expuestas a la proteína fosfatasa ácida prostática presente en las células cancerosas de la próstata. Luego las células son enviadas de regreso al consultorio médico u hospital, donde se administran al paciente por vía intravenosa. Este proceso se repite dos o más veces con 2 semanas de diferencia. Estas células ayudan a las otras células del sistema inmunitario a atacar el cáncer de próstata (Baxevanis et al, 2015).

La vacuna no ha demostrado que detenga el crecimiento del cáncer de próstata, pero parece ayudar a los pacientes a tener una sobrevivencia promedio de varios meses más. Al igual que la terapia hormonal y la quimioterapia, este tipo de tratamiento no ha demostrado curar el cáncer de próstata.

- Tratamiento dirigido a los huesos: Si el cáncer alcanza al sistema óseo, el control o alivio del dolor y otras complicaciones también es una parte muy importante del tratamiento. Los tratamientos como la terapia hormonal, la quimioterapia y las vacunas pueden ayudar con estos problemas, aunque otros tratamientos atacan más específicamente la metástasis en los huesos y los problemas que esto puede causar (San Martin et al, 2017)

Se define como carcinoma de próstata avanzado, al cáncer que ocurre en aquellos pacientes que han completado uno o varios tratamientos de intención curativa o

aquellos diagnosticados inicialmente con diseminación a distancia, así mismo se denomina cáncer prostático resistente a la castración a aquel que persiste en pacientes que han sido tratados con terapia hormonal, análogos de la LHRH con o sin antiandrógenos, orquiectomía o estrógenos (NCI, 2017; NICE, 2017; Ryan *et al*, 2013).

Los criterios que definen el cáncer de próstata resistente a la castración son:

- Tres elevaciones consecutivas de PSA, separadas por al menos una semana, con dos incrementos del 50% sobre el nadir (horizonte límite de detección o punto más bajo detectado) y siempre que este incremento de lugar a un PSA mayor de 2 ng/mL.
- Niveles de testosterona inferiores a 50 ng/dL ó 1.7 nmol/L.
- Progresión de lesiones óseas ≥ 2 en gammagrafía ósea o progresión de lesiones de tejidos blandos

En la evaluación inicial de un paciente con CaPRC se observan dos escenarios distintos, el paciente sin metástasis de inicio y el paciente que ya en el diagnóstico inicial presenta metástasis.

En los pacientes sin metástasis, se debe considerar los factores de riesgo, principalmente, la cinética del PSA. En este caso, a los pacientes se les debe fijar el tiempo de duplicación del PSA. Si el tiempo de duplicación es inferior a 6 meses la evaluación para detectar metástasis se deberá de realizar entre 3 y 6 meses. Si el tiempo de duplicación del PSA es superior a 6 meses, se deberán de realizar pruebas de imagen entre 6 y 12 meses. Lo que puede verse alterado ante signos de alarma como puede ser la clínica o analítica que presentan los pacientes (Schröder, 2008).

Otros factores de riesgo a considerar son la edad, PSA total > 20, puntuación Gleason, LDH y comorbilidades o dolor óseo. Por lo tanto, el riesgo debe de ser evaluado individualmente para ajustar las pruebas de imageneología a lo

estrictamente necesario y así tener un manejo económicamente viable y eficaz de la evolución de la enfermedad (Montgomery *et al*, 2008, Schröder, 2008).

Las Pruebas de Imagen están destinadas a identificar la progresión con la menor carga de exploraciones posible, adaptadas a los patrones concretos de enfermedad metastásica. La aparición de dolor en nuevas localizaciones, síntomas neurológicos, o alteraciones bioquímicas orienta, en cada visita, la necesidad de solicitar exploraciones concretas valorando la afectación ósea no solo en número de estas sino también el área e intensidad. Siendo la RM la más adecuada para medir el tamaño de la lesión y la respuesta al tratamiento (Taylor *et al*, 1993).

1.1.9. Costos de atención del cáncer de próstata

En algunos países como Holanda, Suecia, Canadá y Estados Unidos el costo de atención al cáncer de próstata puede alcanzar del 5 al 6% del presupuesto otorgado al sector salud para atender las enfermedades oncológicas (Moore, 1997; Hodgson, 1983).

El crecimiento de la población y la transformación de la pirámide poblacional en México hacen de ésta una enfermedad en constante crecimiento (Secretaría de salud, 2017). En el año 2005 en México se realizó un estudio con 109 pacientes con diagnóstico de cáncer de próstata en el Hospital General “Dr. Manuel Gea González” en el cual se cuantificaron los costos de atención anual (Día-paciente, consulta, atención, observación, urgencias adultos, consulta externa, anatomía patológica, examen de laboratorio, examen de medicina nuclear e intervención quirúrgica promedio), obteniéndose que cada paciente pagó en promedio por tratamiento anual \$17,697.00 pesos mexicanos (mínimo \$ 4,462.00 y máximo \$40,621.00) y el costo por paciente para el hospital fue de \$24,146.00 pesos mexicanos (mínimo \$ 3,405.00 y máximo \$54, 866.00), lo que representa el 2% del presupuesto asignado al Hospital (Márquez y col, 2005), estos datos muestran que el cáncer de próstata representa una importante carga económica tanto para el paciente, como para las instituciones de salud, así mismo se ha demostrado que entre más tardía es la etapa de detección, más altos resultan los costos económicos por año por paciente y es más baja la probabilidad de sobrevivida de los mismos, por lo que se vuelve necesario

encontrar medios de diagnóstico temprano que ayuden a disminuir la carga económica y aumentar la sobre vivencia del paciente (Grover *et al*, 1999; Otnes *et al*, 1995).

2. Estado del arte

2.1. Marcadores tumorales

Un marcador es una biomolécula que se utiliza como indicador de un estado biológico, de forma que pueda medirse objetivamente para comparar un estado normal contra un estado patológico o de respuesta a un tratamiento farmacológico. Los marcadores tumorales son expresados tanto por células normales, como por el tumor como parte del metabolismo o funcionamiento de la célula, estas biomoléculas pueden expresarse de forma diferenciada (Hotaling *et al*, 2018).

La medición del nivel de los marcadores tumorales puede ser útil, cuando se utiliza junto con otras pruebas para la detección y el diagnóstico de algunos tipos de cáncer. Sin embargo, la medición de los niveles de los marcadores tumorales por sí sola no es suficiente para diagnosticar un cáncer por las siguientes razones:

- El nivel de un marcador tumoral puede elevarse en personas sin cáncer.
- El nivel de un marcador tumoral no se eleva en todas las personas con cáncer, especialmente en las etapas tempranas de la enfermedad.
- Muchos marcadores tumorales no son específicos a un tipo particular de cáncer; el nivel de un marcador tumoral puede aumentar como consecuencia de más de un tipo de cáncer.

En la actualidad, el uso principal de los marcadores tumorales es evaluar la reacción del cáncer al tratamiento y controlar la recaída así como su papel potencial en la detección y diagnóstico temprano del cáncer (Velonas *et al*, 2013).

Con los inconvenientes bien descritos de la prueba de PSA, hay un esfuerzo concertado para desarrollar herramientas de detección de reemplazo para CaP. La prueba de PSA es actualmente el mejor biomarcador para la recurrencia de CaP e

indudablemente ha sido en parte responsable de la concientización del CaP en la población masculina. Sin embargo, no hay estudios que a la fecha haya demostrado que la detección con PSA reduzca la mortalidad por Cap. Es un gran desafío reemplazar PSA debido a su naturaleza mínimamente invasiva y a su bajo costo, pero existe una necesidad apremiante de complementar el PSA con biomarcadores que pueden aumentar la especificidad y la sensibilidad. Un panel de biomarcadores de diagnóstico y pronóstico que funcionarán junto con PSA será ideal.

La detección de analitos múltiples al mismo tiempo en una muestra es ideal. Diferentes plataformas multiplex son capaces de lograr esto, como la técnica de ELISA, espectrometría de masas y matrices de anticuerpos, aunque cada método tiene sus ventajas y desventajas. En un típico ensayo de ELISA tipo sándwich, dos anticuerpos se utilizan para aumentar la precisión, especificidad y detección del antígeno de interés. Sin embargo, el rendimiento del método depende de la calidad del anticuerpo y de la metodología empleada por el usuario. Los ensayos con la metodología de ELISA también carecen de sensibilidad cuando se usa el método tradicional y son relativamente lentos, la reactividad cruzada de los anticuerpos es otro inconveniente de este método. La posibilidad de que un anticuerpo se una a más de un antígeno, produciendo un falso positivo el resultado es un problema común. Además, el análisis de un solo antígeno a la vez no es ideal debido a la heterogeneidad del CaP. Es muy poco probable que solo un marcador sea suficientemente sensible y específico para diagnosticar con precisión a todos los pacientes. El análisis de un panel de múltiples biomarcadores puede reflejar mejor el estado de la enfermedad de un individuo y tales ensayos multiplex son el foco para muchos grupos (Xie *et al*, 2011; Laxman *et al*, 2008).

Una matriz de anticuerpos es un método que se ha propuesto analizar múltiples marcadores simultáneamente a partir de una pequeña muestra biológica. Este método es relativamente fácil de usar y eficiente; Sin embargo, la precisión y la reproducibilidad debe ser investigado. Además, esta plataforma comparte algunas de las mismas desventajas que ELISA la variabilidad inter e intra laboratorio es un problema que arroja resultados diferentes entre las clínicas. Estos problemas deben

ser solucionados antes de que pueda ser utilizado para el diagnóstico de pacientes con CaP.

2.1.1. El papel de la proteómica y la genómica en la búsqueda de marcadores.

El análisis e interpretación de los cambios proteómicos que ocurren en la progresión de la enfermedad de próstata es una tarea desalentadora hecho que se hace aún más difícil por la heterogeneidad biológica de la enfermedad. Avances en TOF-MS, lo que resulta en la tecnología SELDI, han proporcionado un enfoque para el sensible y directo análisis de proteínas en muestras biológicas complejas. Aplicaciones sofisticadas de la proteómica como el 2D-DIGE combinado con MS han demostrado ser una poderosa herramienta para identificar proteínas expresadas diferencialmente en tejido de cáncer prostático. Como ejemplos se tienen las siguientes proteínas identificadas como posibles marcadores potenciales para el cáncer de próstata (Geisler *et al*, 2015):

Galectina-3, identificada en orina de pacientes con cáncer de próstata utilizando espectrometría de masas (MRM-MS). Esta metodología también es adecuada para cuantificar la fosfatasa ácida prostática (PAP por sus siglas en inglés) en la orina. (Wulfkühle *et al*, 2003)

Secernina-1, propuesta como un posible candidato a marcador de diagnóstico para el cáncer de próstata en el tejido, validada mediante el análisis de Western blot.

Vinculina, está regulada positivamente en muestras de tejido del paciente de cáncer de próstata, mientras que la orina de pacientes recurrentes de cáncer de próstata mostraron mayores niveles de vinculina que los pacientes con cáncer de próstata no recurrente (Geisler *et al*, 2015).

Vinculina y Galectina-3 parecen ser prometedores candidatos a marcadores para diferenciar cáncer de próstata recurrente del no recurrente, mientras que secernina-1 podría ser potencial marcador para diagnóstico de tejido de próstata canceroso.

Aún con los avances tecnológicos y los análisis proteómicos en suero sanguíneo, aún existen retos presentados por la amplia variabilidad de concentración de

proteínas, el enmascaramiento por proteínas abundantes y la alta concentración de sales que interfieren en el análisis, sumado esto a la variabilidad entre los individuos se traduce en una pérdida de reproducibilidad, por lo que se ha pensado en nuevos tipos de biomoléculas como posibles marcadores.

Los avances en análisis genómicos han hecho posible la rápida detección de cambios globales y específicos en expresión génica que ocurre solo en células cancerosas, lo que requiere de tejidos tumorales apropiadamente procesados para el análisis, sin embargo, para el análisis de la expresión génica es necesario reordar que la expresión de genes podrían no reflejarse en el nivel de expresión o función de la proteína. Este es un tema importante a considerar debido a que la mayoría de las las pruebas disponibles para la detección de enfermedades se basan en ensayos de detección y cuantificación de proteínas. El ensayo de inmunodetección es generalmente el más confiable y sensible, con pruebas robustas, lineales y precisas, y tiene un precio razonable. El uso de un sistema ELISA para evaluar la presencia de la enfermedad requiere ser validado meticulosamente para proponer a cualquier proteína como biomarcador de la enfermedad, así como un anticuerpo de alta afinidad bien caracterizado que puede detectar de forma exclusiva a la proteína de interés.

Un biomarcador efectivo y clínicamente útil debe ser medible en el cuerpo fácilmente accesible preferentemente en medio líquido, como el suero, la orina o la saliva, de forma que la toma de biopsias sea necesaria.

2.1.2. Los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son ARNs pequeños de 18 a 22 nucleótidos de longitud, se producen a partir de un precursor de mayor tamaño (pri y pre-miRNA) que se encuentran codificados en el genoma y que regulan la expresión de los genes mediante el acoplamiento con regiones complementarias en el RNA mensajero (mRNA). Esta unión tiene como resultado la disminución de la expresión génica debido a la inhibición de la traducción o al aumento de la tasa de degradación del mRNA (regulación post-transcripcional). Debido a esta regulación de la expresión

génica los miRNAs son utilizados para la caracterización de ciertas patologías originadas por alteraciones génicas, como ejemplo en cáncer pueden ser utilizados como marcadores moleculares de diagnóstico o pronóstico (Iwasawa *et al*, 1996).

Recientemente se han encontrado miRNAs que juegan papeles cruciales en muchos procesos de alteración celular que desembocan en el desarrollo de cáncer como la proliferación (Karrich *et al*, 2013; Xu *et al*, 2015), diferenciación (Maebayashi *et al*, 2015; Baltimore *et al*, 2008), angiogénesis y evasión de la apoptosis (Jeronimo *et al*, 2011). Los miRNAs son moléculas que tienen características adecuadas para usarse como marcadores por ejemplo: su tamaño los hace poco susceptibles a la degradación por RNAsas tanto en los tumores como en suero, además de que su cuantificación es relativamente sencilla. Actualmente se han identificado alrededor de 2000 miRNAs humanos, cada uno de estos tiene un blanco en cerca de 1000 genes (Bartel, 2009). Algunos estudios han encontrado que varios miRNAs se encuentran sobre-expresados en biopsias de tejidos de pacientes con cáncer de próstata, comparando con controles sin cáncer u otras afecciones de la próstata (tabla 3) (Mitchell *et al*, 2008; Brase *et al*, 2011), cuando las muestra de tejido prostático se agrupan con precisión por tipo de cáncer, se ha observado que la firma de miRNAs en los diferentes tipos de cáncer y sus orígenes celulares son únicos (Porkka *et al*, 2007; Lu *et al*, 2005). Así mismo se pueden encontrar diferentes niveles de expresión de miRNAs en plasma y suero de pacientes con cáncer de próstata comparado con controles, por lo que se ha podido diferenciar concentraciones alteradas en pacientes con cáncer de próstata metastásico cuando se compara con casos no metastásicos (Bryant *et al*, 2012).

2.1.2.1. Biogénesis de los miRNAs

La biogénesis de los miRNAs (figura 2) comienza en el núcleo, con la transcripción de los genes de miRNAs por la RNA polimerasa II. Los transcritos primarios de miRNA que se generan se denominan pri-miRNA, contienen un capuchón 7-metil guanosina en el extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3'. Estas modificaciones

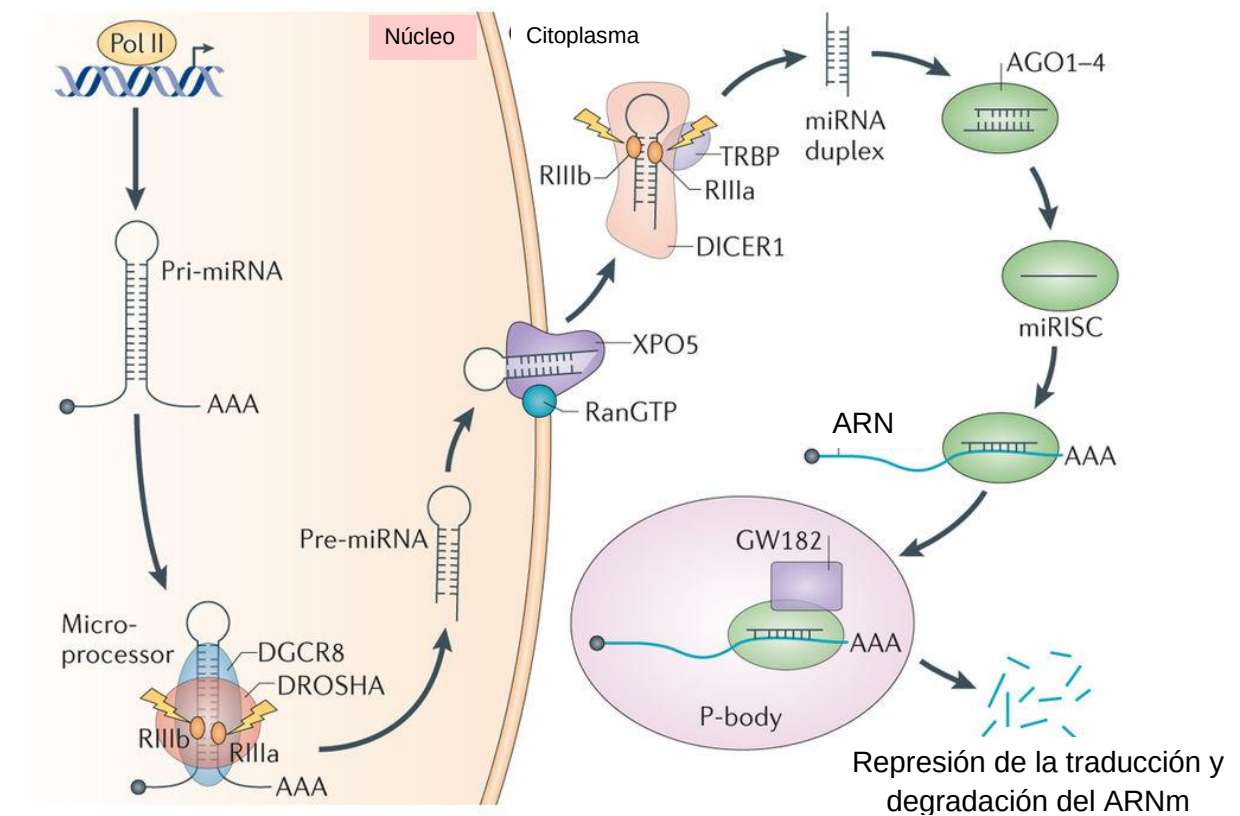


Figura 2.- Biogénesis de los miRNAs, modificada de Lin y Gregor. (2015)

El esquema muestra la biogénesis canónica de los miRNAs, a través de la transcripción del miRNA primario, el cual es escindido por la RNasa DROSHA en asociación con DGCR8 para formar el precursor del miRNA, el cual es exportado al citoplasma en donde es escindido por la RNasa DICER1, formando un miRNA de cadena doble, solo la cadena guía se asociará con el complejo de silenciamiento RISC, el cual se aparea con secuencias complementarias en los mRNA reprimiendo la traducción o guiando a la degradación del mismo.

son marcas o señales de la transcripción mediada por la RNA polimerasa III (Bartel, 2004).

Los largos transcritos primarios (pri-miRNA) son, en un primer lugar, procesados por la enzima Drosha en el núcleo, la cual se encuentra asociada a la proteína DGCR8 (anteriormente conocida como pasha), la cual tiene la función de unirse al RNA de doble cadena estabilizando a Drosha mientras realiza su función de nucleasa dando lugar a intermediarios con forma de horquilla (pre-miRNA). Estos pre-miRNA son reconocidos y exportados desde el núcleo al citoplasma mediante la proteína transmembranal nuclear Exportina 5, dependiente de Ran-GTP (Yi et al, 2003). Una vez en el citoplasma, los pre-miRNA son sometidos a un segundo paso de corte mediado principalmente por la enzima Dicer, dando lugar a los miRNAs maduros, un dúplex de RNA de doble cadena y tamaño pequeño (18-22 nucleótidos por cadena) que contiene dos miRNAs, la cadena guía y la cadena estrella, esta cadena doble de RNA es separada por la proteína argonauta generando el miRNA maduro de la cadena guía. el miRNA maduro (cadena guía) es incorporados en el complejo RISC, el complejo RISC-miRNA se dirige a sus blancos específicos para modular negativamente la expresión génica (Bartel, 2004).

3. Antecedentes particulares de su proyecto

3.1. Biopsias líquidas

Hasta el momento, para conocer cómo evoluciona un cáncer se tiene que extraer una muestra del tejido tumoral y analizarlo, este es un método invasivo para el paciente —requiere una punción, una incisión o una cirugía— no permite un seguimiento continuo del progreso patológico. Los tumores en situación metastásica liberan células, y por tanto material genético, en el torrente sanguíneo. La biopsia líquida —también conocida como test de ADN tumoral circulante o test de biomarcadores basados en la sangre— detecta las mutaciones específicas de un tumor mediante una muestra de sangre periférica. Esto evita al paciente trastornos innecesarios y representa un ahorro de tiempo, debido a que los resultados de los análisis estarán disponibles en sólo uno o dos días. Además, dado que el procedimiento es sencillo, se podrá repetir las veces que los médicos consideren

adecuadas para controlar la evolución de una patología que no es estática sino cambiante. Conocer mejor la biología y la genética del tumor facilita las decisiones que deban tomarse respecto al tratamiento, que se podrá adaptar a las características específicas de cada cáncer, por otro lado, aunque no son específicamente tejidos, también es posible identificar ácidos nucleicos en otros líquidos corporales como orina, saliva y semen (Mao *et al*, 2017).

3.2. Los miRNAs circulantes

Los miRNAs circulantes en sangre fueron descritos por Mitchell *et al*. (Lodes *et al*, 2009; Mitchell *et al*, 2008), estos miRNAs se liberan a través de la corriente sanguínea del tejido tumoral de varias maneras, como miRNAs libres, en exosomas, en micro vesículas, en grandes oncosomas, unidos a cuerpos apoptóticos, asociados a complejos lipoproteicos de alta densidad o unidos a proteínas. La presencia de miRNA en el ambiente extracelular encendió la hipótesis de que las células liberan selectivamente miRNAs que median la señalización de células a través de rutas paracrinas o incluso endocrinas (Valdi *et al*, 2007; Cortez *et al*, 2011; Chendrimada *et al*, 2005). Algunos grupos de investigación han demostrado que los miRNAs extracelulares atrapados en cuerpos apoptóticos y exosomas pueden ser transferidos a células receptoras, alteran la expresión génica y median los efectos funcionales (Valadi *et al*, 2007; Skog *et al*, 2008; Kosaka *et al*, 2010; Pegtel *et al*, 2010, Pigati *et al*, 2010; Mittelbrunn *et al*, 2011). Los patrones de ARNm en exosomas y sus células donantes se correlacionan mal, lo que sugiere una clasificación específica de miRNA "para exportación" (Valadi *et al*, 2007; Skog *et al*, 2008; D'Amico *et al*, 2006). El mecanismo detrás de esta clasificación debe investigarse con más detalle.

Los miRNAs liberados en el torrente sanguíneo están protegidos contra la degradación y son fácilmente detectables por métodos como la PCR; principalmente los niveles de miRNAs específicos del cáncer se han utilizado para correlacionar el estado de la enfermedad, la etapa clínica, la agresividad y la respuesta al tratamiento. En el caso del cáncer de próstata, los niveles de miRNAs libres en plasma o suero pueden diferenciar entre cáncer de próstata localizado y metastásico o correlacionarse con el puntaje de riesgo o puntuación de Gleason, así como con

agresividad del cáncer o enfermedad indolente y pueden ayudar en la definición de la etapa clínica del tumor y las decisiones de tratamiento en el tiempo de diagnóstico (Lian *et al*, 2015; James, *et al*, 2015; Sweeney *et al*, 2015; Agaoglu *et al*, 2011).

En un estudio se evaluaron los niveles séricos de tres miRNAs en 51 pacientes con cáncer de próstata (subdivididos en localizados, localmente avanzados y metastásicos) y 20 controles sanos. Identificaron niveles aumentados del miRNA-21 y miRNA-221 en el grupo de cáncer de próstata en conjunto en comparación con los controles. El miRNA-141 no se elevó significativamente en el grupo como un todo, pero cuando el grupo metastásico se consideró de forma aislada, los tres miRNAs se elevaron significativamente, siendo el miRNA-141 el más elevado de los tres (Agaoglu *et al*, 2015).

Lodes *et al*, (2009). analizaron sueros de pacientes en una serie de tumores malignos utilizando una técnica de hibridación de microarreglos identificando 15 miRNAs regulados positivamente en pacientes con cáncer de próstata frente a controles sanos (miRNAs-16, -92a, -103, -107, -197, -34b, -328, -485-3p, -486-5p, -92b, -574-3p, -636, -640, -766, -885-5p). Este estudio no confirmó el hallazgo de una expresión incrementada del miRNA-141; sin embargo, el grupo de pacientes era pequeño (n = 6), además, no se realizó ninguna confirmación por qRT-PCR de los resultados del microarreglo.

Como se ha comentado anteriormente, varios miRNAs se han encontrado sobreexpresados en plasma / suero de pacientes con cáncer de próstata, algunos de ellos como el miRNA-21 y el miRNA-141 se validaron sobre la función celular respecto al contexto del cáncer de próstata después de los cinco evaluación de niveles. Algunos estudios (Lodes *et al*, 2009 Bryant *et al*, 2012; Britany *et al*, 2011) informaron una sobreexpresión del miRNA-107, que se encuentra codificado en el *locus* 10p23.11 el miRNA tiene un incremento en su expresión de alrededor de 10 veces. Estos niveles de expresión relativa son significativos lo que lleva a preguntar, ¿Cuál es la función y/o asociación del miRNA-107 con el cáncer de próstata?

3.3. La función del miRNA-107 en cáncer.

La familia miR-15/107 comprende un grupo de 10 miRNAs parálogos, compartiendo la región semilla (5' AGCAGC). Estos miRNAs tienen posibles blancos comunes. Para caracterizar la expresión de la familia de miRNAs miRNA-15/107, se utilizaron microarreglos TaqMan de baja densidad personalizados, y otros miRNAs seleccionados en 11 tejidos humanos obtenidos de autopsias, incluyendo la corteza cerebral, corteza frontal, corteza visual primaria, tálamo, corazón, pulmón, hígado, riñón, bazo, estómago y músculo esquelético encontrándose que los miRNAs-103, miR-195 y miR-497 se expresaron a niveles similares en varios tejidos, mientras que miRNA-107 está enriquecido en muestras de cerebro. También se examinaron evolutivamente los miRNAs-15/107 encontrándose que están conservados en las neuronas corticales, astrocitos y microglia, respectivamente (Wang, 2013).

Cuando se estudia la función de los miRNAs en el cáncer se pueden encontrar funcionando como miRNAs promotores de tumores (oncomiRNAs) o como miRNAs protectores de tumores, algunas investigaciones han mostrado la función del miR-107 (tabla 2), teniendo ambas funciones en distintos tipos de cáncer.

La expresión del miR-107 en diferentes tejidos en condiciones normales ha sido cuantificada (figura 3) encontrándose diferentes niveles de expresión basal.

Tabla 2.- Funciones del miR-107 en algunos tipos de cáncer descritas en diversos estudios de microRNAs.

Expresión	Función	Tipo de cáncer	mRNA Blanco	Bibliografía
Sobre expresado	Induce el arresto del ciclo celular	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	CDK6	Takahashi <i>et al</i> , 2009.
Sobre expresado	Promotor de la progresión del tumor	Cáncer de mama	Let-7 miRNA	Chen <i>et al</i> , 2011
Sobre expresado	Promotor de metástasis	Cáncer de mama	Asociado a miR-16, miR.130a y miR-146 ^a	Stückrath <i>et al</i> , 2015
Sobre expresado	Promotor de proliferación celular	Cáncer hepatocelular	Axin2	Zhang <i>et al</i> . 2015.
Sobre expresado	Promotor del crecimiento del tumor, apoptosis e invasión	Cáncer de mama triple negativo	SIAH1	Zhang <i>et al</i> , 2016
Reprimido	Quimio-sensibilizante a cisplatino	Cáncer de pulmón de células no pequeñas	CDK8	Zhang <i>et al</i> , 2014
Reprimido	Supresor de invasión	Cáncer cervical	MCL1	Zhou <i>et al</i> , 2014.
Reprimido	Supresor de proliferación y migración	Cáncer de mama	CDK8	Li <i>et al</i> . 2014.
Reprimido	Supresor de tumores	Cáncer Renal	EIF5, p53, y VHL	Song <i>et al</i> , 2015.
Reprimido	Supresor de tumores	Cáncer de esófago	PIM1	Sharma <i>et al</i> , 2013.

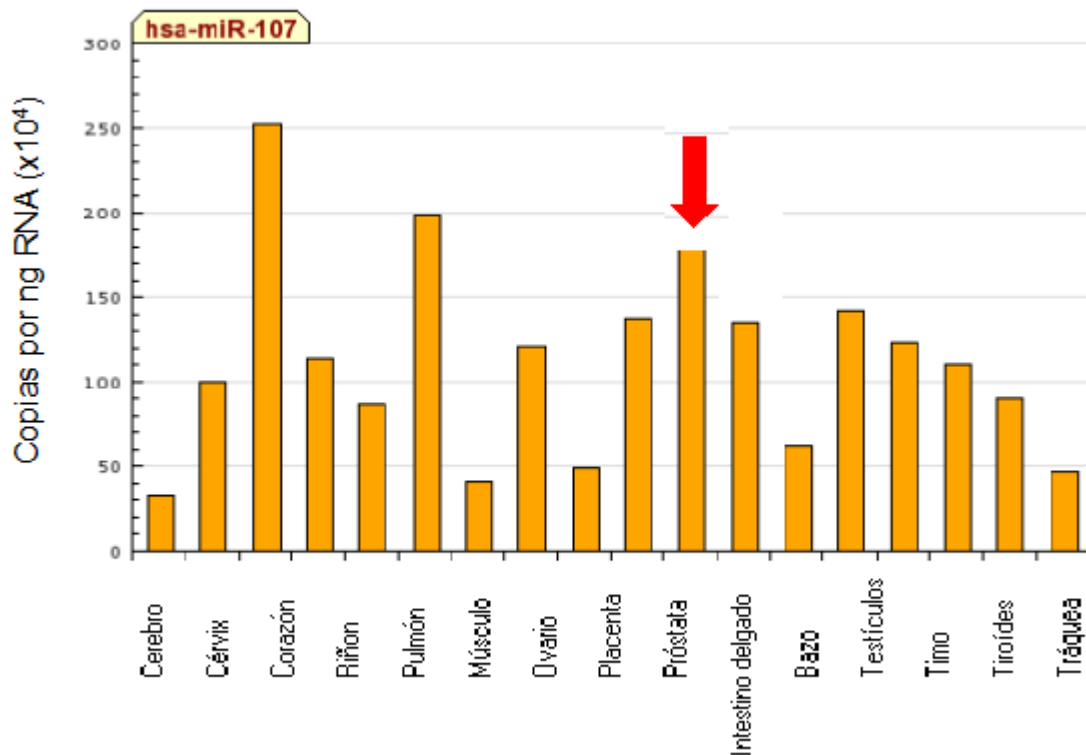


Figura 3.- Expresión del miR-107 en diferentes tejidos, modificada de mirnamap.mbc.nctu.edu.tw

Mirnamap es una base de datos que ha recolectado la información referente a los niveles de expresión de varios miRNAs en distintos tejidos, lo que puede mostrar el número de copias de los miRNAs en relación a la cantidad de RNA total del tejido. La próstata es el tercer tipo de tejido que expresa de forma basal mayor número de copias del miR-107.

4. Importancia de continuar con el estudio

Los estudios sobre las funciones de los miRNAs en condiciones celulares alteradas ofrecen información relevante a posibles blancos terapéuticos y en general a un mejor entendimiento de las alteraciones celulares. Enfermedades como el cáncer se encuentran ampliamente ligadas a alteraciones en el genoma que conducen a un crecimiento exacerbado de las células con la capacidad de invadir otros órganos, estas alteraciones sin lugar a dudas involucran a los ARN pequeños, de forma que su función también se encuentra alterada.

Diversas investigaciones han demostrado que los perfiles de expresión alterados pueden ser indicadores útiles de enfermedades específicas, de forma que junto con los síntomas y signos de los pacientes se puede usar la información de la desregulación de los miRNAs de forma objetiva para realizar el diagnóstico con mayor precisión, o realizar tareas de monitoreo de la progresión de la enfermedad o éxito del tratamiento.

En el caso del cáncer, con frecuencia es necesario obtener muestras de tejido para analizar la presencia de alteraciones, lo que suele ser incómodo para los pacientes, sin embargo los nuevos desarrollos diseñados para evaluar biopsias líquidas, las cuales de forma general no causan mayor molestia al momento de adquirirse, animan al paciente a mantener bajo vigilancia del progreso de su padecimiento.

En la presente investigación se ha propuesto evaluar las características del miR-107, el cual ya ha sido reportado como desregulado en el padecimiento con cáncer de próstata, sin embargo quedan aún muchas incógnitas que resolver, las cuales necesitarán un diseño experimental diferente o complementario. Sin duda las investigaciones sobre los miRNAs y sus posibles blancos y funciones en condiciones de alteración celular proveerán información necesaria que ayudaran a encontrar nuevos tratamientos y o nuevos marcadores que mejorarán la calidad de vida de los pacientes.

5. Justificación

El cáncer de próstata es uno de los principales problemas de salud pública en México debido a su alta tasa de mortalidad, a la creciente incidencia y a los importantes costos de tratamiento. Debido a la forma en que el cáncer de próstata se diagnostica a través de la prueba de PSA, es necesario continuar con investigaciones de biomoléculas que puedan utilizarse para ayudar en el diagnóstico, pronóstico o monitoreo del mismo. Diversos ensayos han encontrado ampliamente des-regulado al miR-107 en plasma/suero, se sugiere investigar su utilidad como posible biomarcador y su función en el cáncer en próstata.

6. Hipótesis

El miRNA-107 se encuentra asociado al cáncer de próstata al participar en alguna de las vías de señalización del cáncer y podría ser utilizado como posible biomarcador al relacionarse con las etapas clínicas del cáncer de próstata.

7. Objetivos.

7.1. Objetivo general

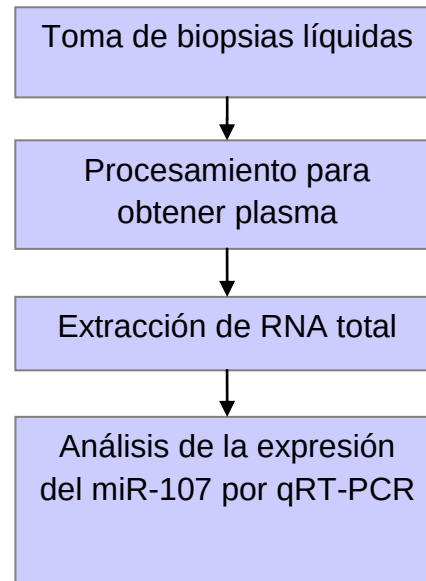
- Analizar la expresión relativa del miR-107 en biopsias líquidas de pacientes con cáncer de próstata y evaluar su posible participación en los procesos celulares del cáncer de próstata.

7.2. Objetivos particulares

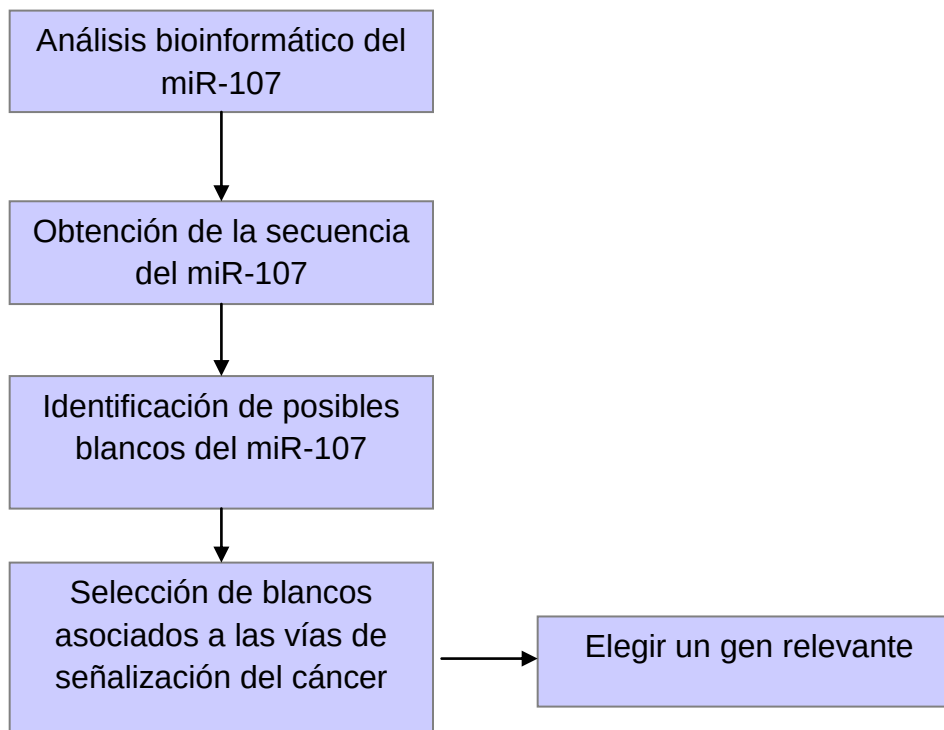
- Determinar los niveles de expresión de miR-107 en biopsias líquidas de pacientes mexicanos con cáncer de próstata en diferentes estadios.
- Predecir los posibles ARNm blanco del miR-107 y las rutas biológicas asociadas al cáncer en las cuales podrían participar las proteínas involucradas.
- Validar uno de los posibles blancos del miR-107 involucrado con alguno de los procesos celulares relacionados con el cáncer

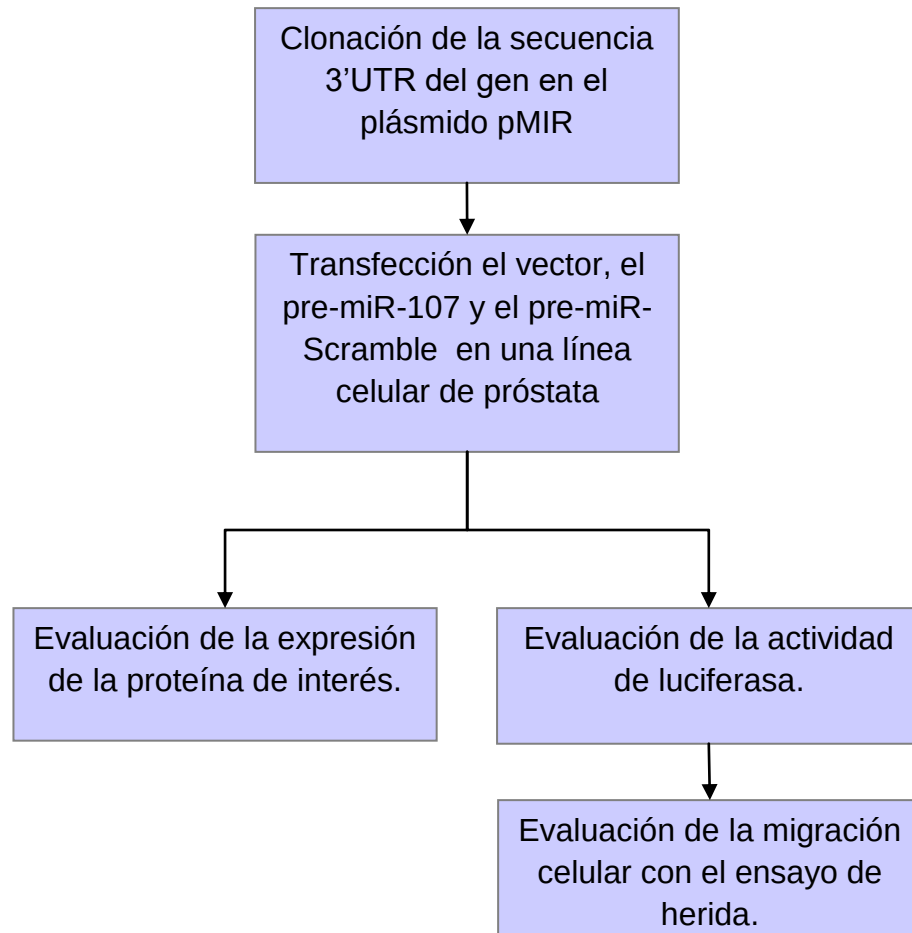
8. Estrategia experimental

- Evaluación de la expresión diferencial del miRNA-107 en los grupos de estudio.



- Búsqueda bioinformática de posibles blancos del miR-107





9. Metodología

9.1. Obtención de las muestras

El estudio se realizó con la aprobación de los comités de investigación y de ética del hospital central militar (oficio No. AEEI-79020 y S/N respectivamente).

Las muestras de sangre de pacientes mexicanos con diagnóstico de cáncer confirmado, así como de pacientes clínicamente sanos se tomaron por venopunción ante-cubital en tubos vacutainer® (Becton Dickinson) con solución anti-coagulante con citrato, se tomaron entre 4 y 6 mL de sangre, una vez tomada la muestra se invirtió el tubo 8 veces y se almacenó a 4°C, hasta por una hora antes de su procesamiento.

El plasma sanguíneo se obtuvo de la muestra por centrifugación a 5000 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Obteniéndose de 1 a 2 mL de plasma por muestra, de estas se toma una alícuota de 150 µL de suero para el aislamiento del RNA total.

9.2. Aislamiento de RNA total

El RNA total se aisló del plasma usando el Kit Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo Research, USA) siguiendo las instrucciones del fabricante: para líquidos biológicos (como la sangre, plasma o suero) por 1 volumen de muestra, se adicionan 3 volúmenes de trizol, por lo que para 150 µL se adicionaron 450 µL de trizol, se mezcló agitando de arriba abajo por 5 minutos, se centrifugó la mezcla a 12000 rpm por 5 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo, libre de RNasas.

Al sobrenadante se le adicionaron 450 µL de etanol (grado biología molecular, 95 a 100% de pureza), la mezcla se transfirió a una columna Zymo spin que se colocó dentro de un tubo de recolección y se centrifugó a 12000 rpm por 2 min a 4°C, se descartó el líquido recolectado, se adicionó 400 µL del amortiguador RNA-PreWash, a la columna y se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min. a 4°C, se descartó el líquido recolectado. Se repitió este último paso.

Se adicionó 700 µL del amortiguado RNA-Wash, a la columna y se centrifugó por 2 minutos a 12000 rpm a 4°C, se transfirió cuidadosamente la columna a un tubo

nuevo libre de RNasa y finalmente para eluir el RNA de la columna, adicionó 50 μL de agua libre de DNasa y RNasa directamente a la columna y centrifugó por 5 min. A 12000 rpm a 4°C. Posteriormente, se midió la cantidad y evaluó la calidad del RNA total extraído a través de nano-espectrometría UV NanoDrop® (Thermo Fisher, Massachusetts, USA).

9.3. Retrotranscripción del miR-107.

Se utilizó el Kit de transcripción reversa (Applied Biosystems) Se preparó una mezcla maestra (Master Mix) que contiene la mezcla de dNTPs, la Enzima RT multiscibe, el amortiguador RT 10X, inhibidor de RNasa, y agua libre de nucleasas,

Para una reacción de 15 μL se tomó de 1 a 10 ng de RNA total; se combinaron 5 μL del extracto de RNA total, con 7 μL de Master Mix, se mezcla gentilmente por pipeteo, los primers RT se descongelaron en hielo y se centrifugaron brevemente, se adicionaron 3 μL de los primer a la mezcla de RNA total con el MasterMix para alcanzar 15 μL de reacción, se mezclaron suavemente con el pipeteo. Se sellan los tubos y se centrifugaron a 5000 rpm por 1 min. Se dejó incubar por 5 minutos en hielo o hasta estar listo para cargar en el termociclador con el siguiente programa:

Tipo de paso	Tiempo (minutos)	Temperatura (°C)
Hold	30	16
Hold	30	42
Hold	5	85
Hold	∞	4

9.4. Cuantificación del miRNA por qRT-PCR

Para la reacción de PCR de 15 μL de volumen de reacción se tomaron 0.75 μL del reactivo TM (TaqMan microRNA Asay 20X), 0.99 μL del producto de retrotranscripción obtenido en el punto 9.3., 7.5 μL del reactivo Taqman 2X Universal MasterMix No AmpErase y 5.75 μL de Agua libre de nucleasas.

Primero se cargó el Reactivo MasterMix, seguido del agua libre de nucleasas, se mezcló suavemente con el pipeteo, se adicionaron el reactivo TM y finalmente el producto de la reacción de retrotranscripción. La reacción se cargó por triplicado en la placa para PCR y se selló con película adhesiva MicroAmp®.

Se centrifugó la placa para llevar los reactivos al fondo de la placa verificando que no queden burbujas en los pozos de reacción. Se protejió de la luz directa del sol cuando se transportó al equipo de PCR tiempo real, se llevó el volumen de reacción a 15 µL con el siguiente programa de termociclado:

40 ciclos			
	Hold	Desnaturalización	Alineación/Extensión
Tiempo	10 min	15 seg	60 seg
Temp (°C)	95	95	60

9.5. Cálculo de fold change.

El fold change se calculó con el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

$\Delta Ct1 = Ct_{miR-107} - Ct_{norm}$ en condiciones Alteradas (cáncer)

$\Delta Ct2 = Ct_{miR-107} - Ct_{norm}$ en condiciones normales (no cáncer)

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-(\Delta Ct2 - \Delta Ct1)}$$

Siendo el normalizador el miRNA-21

9.6. Análisis bio-informático

Para encontrar los posibles mRNA blancos, se realizó un análisis de enriquecimiento en las bases de datos miRBase (<http://www.mirbase.org/>), targetscan (http://www.targetscan.org/vert_71/), miRTarbase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>), Cometa (<http://cometa.tigem.it/>) y PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>), para la búsqueda de la distribución celular de los

blancos de los miRNAs y de las funciones ontológicas en las cuales participan, se utilizó la herramienta bioinformática David (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>).

9.7. Amplificación del vector

9.7.1. Transformación de células *E. coli* DH5 α

Células competentes *E. coli* DH5 α se descongelaron en hielo, se les adicionó 50 μ L de amortiguador de transformación y 100 ng del plásmido vector, se incubaron en hielo por 30 minutos, posteriormente se dio un choque térmico a 42°C por 90 segundos, se incubó por 3 minutos en hielo, se adicionaron 200 μ L de medio LB + ampicilina, se incubó la mezcla a 37°C por 45 minutos a 200 rpm, la mezcla se sembró por plaqueo en una caja de petri con medio LB-Agar + ampicilina, se incubó a 37°C durante la noche, las unidades formadoras de colonias contienen el plásmido vector pMIR (figura 4).

9.7.2. Extracción del plásmido

Las unidades formadoras de colonias se inocularon en 6 mL de medio LB + ampicilina, se incubando por 12 horas a 37°C, a 200 rpm, depuse se de la incubación se centrifugó el tubo por 5 minutos a 5,000 rpm, se procedió a extraer el plásmido de la pastilla celular, utilizando el Kit de extracción de plásmido de alta pureza Roche V10.0 ®. De acuerdo a las instrucciones del fabricante.

De la identificación del posible sitio blanco (posición 1070-1089, region 3'UTR del mRNA de PTEN) se diseñaron oligos de hibridación para que sean clonados en los sitios de restricción *HindIII* y *SpeI* del vector pMIR

9.8. Procedimiento de clonación de la región 3' UTR PTEN

El plasmido pMIR se sometió a doble restricción con las enzimas *HindIII* y *SpeI*, se utilizaron 0.5 μ L de cada enzima de restricción por cada μ g de plásmido en 2 μ L de amortiguador II para una reacción de 20 μ L, la mezcla se incubó a 37°C en baño maría durante 18 horas,

El plasmido restringido se verificó por electroforesis en gel de agarosa en amortiguador TAE 1X.

Posterior a la visualización en luz UV, se recortó el gel en donde se encuentra el plasmido restringido, y se realizó la purificación del plasmido con el kit Quiaex II, gel extraction kit, de Quiagen ®.

El plásmido purificado se preparo para la reacción de ligación con el oligo diseñado. Para extremos cohesivos se utilizaron 4 µL de amortiguador de ligación 5X, inserto y vector en una relación 3:1, y 0.1 unidad de enzima ligasa T4, para un volumen de reacción de 20 µL, la reacción se incubó a 18°C durante toda la noche (18 horas).

La construcción del plásmido clonado (pMIR-PTEN1a y pMIR-PTEN1a mutante) se verificó por electroforesis en gel de agarosa en amortiguador TAE, el éxito de la clonación se verificó por la liberación del inserto por doble restricción.

Las construcciones de los vectores pMIR-PTEN1a y 1a mutante se expanden con el procedimiento 9.6.1

Para el diseño de oligos de hibridación que codifican para la región 3'UTR de interés en el ARNm de PTEN, se seleccionó el sitio de unión al miR-107 que tuvo la mayor puntuación de alineamiento, en rojo se indica el sitio de unión

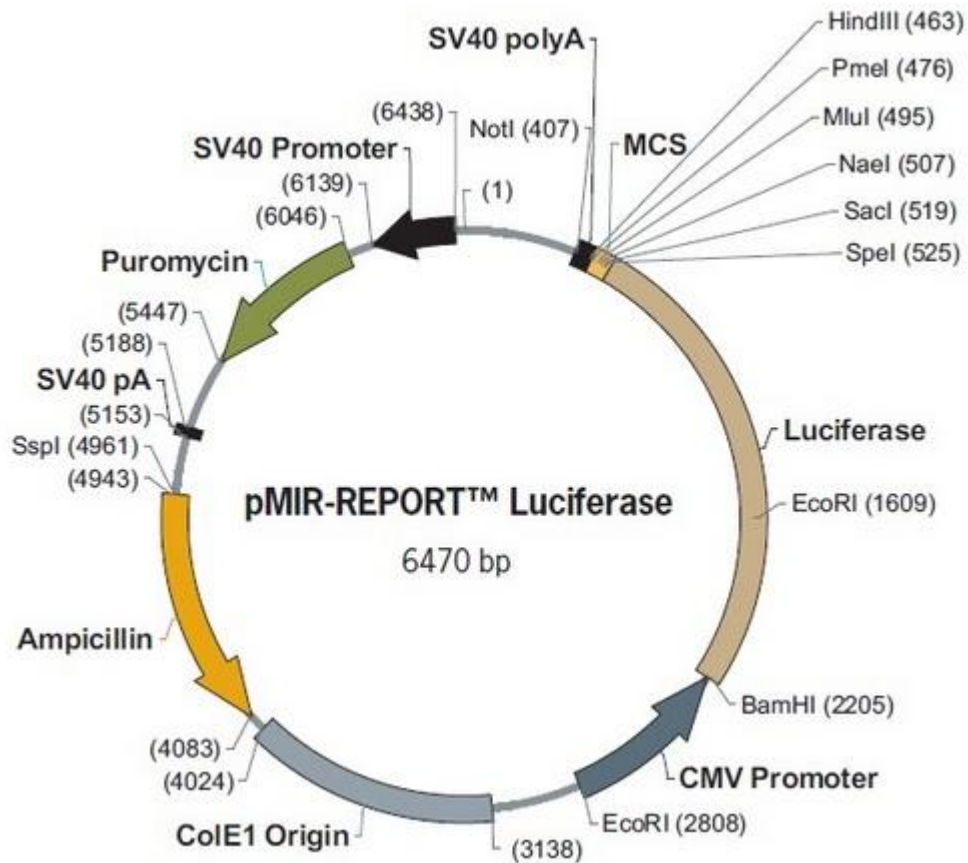


Figura 4.- Mapa del vector pMIR-REPORT.

El vector reportero pMIR consiste en un reportero experimental de luciferasa de luciérnaga al cual se le puede insertar las secuencias blanco previstas de miRNAs en el sitio de clonación múltiple en la sección 3'UTR del gen de luciferasa de forma que se puede medir la actividad de luciferasa en función de un miRNA y analizar la influencia de la sección 3 'UTR de interés.

>PTEN 3'UTR POS 1067 a 1111

5' TAAAATATTTTGTAATGCTGCACAGAAATTTTCAATTTGAGATTC 3'

3' ATTTTATAAAACATTACGACGTGTCTTTAAAAGTTAACTCTAAG 5'

De esta sección se tomó una secuencia de 35 bases para los oligos sintéticos (Uniparts) de la wild type y la mutante la secuencia forward y la secuencia reverse, se muestra a continuación

Wild Type

Forward 5' - CTAGTTAAAATATTTTGTAATGCTGCACAGAAATT - 3'

Reverse 5' – AGCTTAATTTCTGTGCAGCATTACAAAATATTTTA – 3'

Mutantes

Forward 5' - CTAGTTAAAATATTTTGTAATCCTACACAGAAATT - 3'

Reverse 5' – AGCTTAATTTCTGTGTAGGATTACAAAATATTTTA – 3'

Estos oligonucleótidos se hibridaron (figura 13) utilizando 100 pmol / μ L de cada uno, suspendiéndolos en volumen cbp 15 μ L de amortiguador de hibridación, con el siguiente programa en el termociclador:

	Hold	Hold
Temperatura (°C)	95	37
Tiempo (minutos)	5	45

Hibridación de la secuencia wild type

Forward 5'-CTAGTTAAAATATTTTGTAATGCTGCACAGAAATT ----- 3'

Reverse 3' ----- ATTTTATAAAACATTACGACGTGTCTTTAATTCGA - 5'

Hibridación de las secuencias mutantes

Forward 5' -CTAGTTAAAATATTTTGTAACTCTACACAGAAATT ----- 3'

Reverse 3' -----ATTTTATAAAACATTAGGATGTGTCTTTAATTCTGA-5'

9.9. Validación del blanco modulado por el miR-107 mediante ensayos de luciferasa

9.9.1. Transfección del vector en células PC3.

200,000 células PC3 se sembraron por pozo en una placa de 6, se adicionaron 2 mL de medio F12 (Gibco ®) y se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ por 24 horas. Posterior al tiempo de incubación se preparó la reacción de transfección para cada pozo, de la siguiente manera, en un tubo de 1.5 mL se adicionaron 5 µL de la construcción pMIR-PTEN1a-3'UTR + 150 µL del medio de transfección OPTIMEM ®, se mezcló por pipeteo suave (esta mezcla también se realizó para la construcción pMIR-PTEN1a mutante-3'UTR y para el normalizador PRL-CMV) En otro tubo de 1.5 mL se adicionaron 6 µL del agente de transfección Lipofectamina – 2000 reagent (Invitrogen ®) + 150 µL de medio OPTIMEM ®. Se mezcló por pipeteo suave, se dejaron incubar ambos tubos por 10 minutos a temperatura ambiente. Posterior a la incubación se mezclaron ambos tubos en uno solo, se homogenizaron por pipeteo suave y se dejó incubando por 10 minutos a temperatura ambiente. A cada pozo de la placa se le retiró el medio de cultivo y se lavó 2 veces con amortiguador PBS 1X pH7.0, posteriormente se adicionan 1.8 mL de medio DMEM y la mezcla de la construcción con el medio de transfección y lipofectamina (Un pozo para cada construcción). Se mezcló suavemente por oscilación y se incubó la placa por 5 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ posteriormente se le retiró el medio a cada pozo se adicionó 2 mL de medio F12, la placa se incubó a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ por 24 horas. Posterior a la incubación se co-transfectó el pre-miR-107 y

el Pre-miR-neg (scramble), y se incubaron las cajas por 48 horas a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂.

9.9.2. Ensayo de medición de actividad de luciferasa

La actividad de luciferasa fue medida utilizando el kit Dual-luciferase reporter assay system (Promega ®) preparando el amortiguador de lisis 5X en agua estéril para obtener una concentración 1X, los pozos fueron lavados con amortiguador PBS 1X pH7. Posteriormente a los pozos se les adicionó el amortiguador de lisis 1X incubando por 5 minutos en agitación en hielo. Se transfirió el lisado de cada pozo a un tubo(c/u) de 1.5 mL para vortexear por 15 segundos tres veces y centrifugar a 12,000 g por dos minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante en un tubo de 1.5 mL estéril nuevo. En una placa de fondo opaco de 96 pozos, se adicionaron 100 µL del reactivo de ensayo de luciferasa y 20 µL del lisado celular, mezclando por pipeteo suave. Se realizó la lectura de emisión de luz en un luminómetro Floroscan Ascent Fluorometer (Thermo Scientific ®) con 2 segundos de retardo entre cada lectura de 10 segundos.

9.10. Análisis de inmunodetección

Para evaluar la expresión de la proteína PTEN se realizó el ensayo de Western blot con un anticuerpo policlonal primario de conejo (GTX 101025 – GeneTex, USA.), y el secundario, anti IgG de conejo (A3687, Sigma-Aldrich). Para evaluar la expresión de AKT en su estado fosforilado y no fosforilado se utilizaron anticuerpos policlonales primarios de conejo (#9272 y #4058 respectivamente de Cell signaling) como anticuerpo secundario se utilizó anti IgG de conejo (A3687, Sigma-Aldrich). Como normalizador se utilizó el anticuerpo primario GADPH (0411-Santa Cruz Biotechnology) y como secundario anti IgG de ratón (A9044, Sigma Aldrich).

9.10.1. Preparación de extractos proteicos

Para extraer las proteínas, a los pozos de los cultivos celulares se les retiró el medio de cultivo y se lavaron 3 veces con amortiguador PBS 1X pH 7.0, frío y se incubaron con amortiguador de lisis (200 µL) TNTE frío (4°C, en agitación) durante 15 minutos, complementando con 2 µL de coctel completo de inhibidores de proteasas de Roche.

Cada pozo se raspó con una punta de micropipeta estéril. Se recupero el sobrenadante de cada pozo en un tubo de 1.5 μ L, posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 minutos a 4°C, para recuperar el sobrenadante y almacenarlo a -80°C hasta su posterior uso.

9.10.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de los extractos, se utilizó el método de Bradford. La curva se construyó con una solución de 1 mg/mL de albumina, leyendo la reacción colorimétrica en un espectrofotómetro a 595 nm de longitud de onda. Los valores obtenidos se sustituyeron en la ecuación de la recta de calibración para obtener la concentración de proteínas (μ g/ μ L).

9.10.3. Electroforesis de proteínas en condiciones desnaturalizantes

La separación de proteínas se realizó por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10% con Dodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE), el gel concentrador al 5%, con el amortiguador de corrida 1X y un potencial eléctrico constante de 70 V. Se usó el marcador de peso molecular Dual-color de Biorad. Cada carril fue cargado con la misma cantidad de proteína extraída en el punto 9.11.1,

9.10.4. Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Una vez separadas las proteínas por SDS-PAGE, se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (BIO-RAD), se utilizó el equipo Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (BIO-RAD), la transferencia se realizó durante una hora a 60 V, para confirmar la transferencia la membrana se tiñó con Rojo de Ponceu y posteriormente se lavó con amortiguador PBS 1X pH 7 hasta eliminar el color rojo de la solución de lavado.

9.10.5. Ensayo de Western Blot

La membrana se sumergió en una solución bloqueadora (leche en polvo descremada al 5% en amortiguador PBS 1x pH 7.0), durante la noche a 4°C, posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos con amortiguados PBS 1X pH 7.0 la solución con el anticuerpo primario en amortiguador PBS 1X pH 7.0, se adicionó una dilución 1:800, incubándose a temperatura ambiente por una hora o durante la noche a 4°C. Posteriormente la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos en amortiguador PBS 1X, tween 20, pH 7.0, se adicionó la solución de anticuerpo secundario (1:1000) durante 1 hora a temperatura ambiente, posteriormente la membrana se lavó 3 veces durante 5 minutos en amortiguador PBS 1X, tween 20, pH 7.0, posteriormente la membrana se incubó con la solución reveladora (peroxidasa de rabano picante) durante 3 minutos antes de ser visualizada en luz UV en el foto-documentador (BIO-RAD).

9.11. Ensayo de herida

Para evaluar el efecto del miRNA-107 sobre la migración celular se realizó el ensayo de herida, para lo que se sembraron 250,000 células PC3 en una placa de 6 pozos, en medio F12, se adicionaron 2 mL de medio F12 (Gibco ®) y se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ por 24 horas, posteriormente, se realizó la transfección del pre-miRNA-107 y miRNA-Scramble de acuerdo al procedimiento 9.10.1, posteriormente se incubaron a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ por 24 horas al tiempo de incubación se verificó la confluencia para asegurar el 90% de la confluencia. Con una punta de micropipeta de 200 µL esteril, se rasparon tres líneas paralelas en la monocapa de células de cada pocillo, se lavó cada pocillo dos veces con PBS para eliminar cualquier célula separada por el corte de la micropipeta, se incubó a 37°C en atmósfera al 5% de CO₂ y se observó a microscopio cada pozo, con una magnificación de 100X, cada 2 horas durante 8 horas, se contaron el número de células que invaden las heridas en cada pozo.

10. Resultados

10.1. Objetivo 1

Determinar los niveles de expresión de miR-107 en biopsias líquidas de pacientes mexicanos con cáncer de próstata en diferentes estadios.

10.1.1. Criterios de inclusión en el estudio

Los criterios de inclusión para los grupos de casos y controles fueron los siguientes:

Criterios de inclusión	
Casos	Controles
• Pacientes > 40 años • Con diagnóstico de cáncer confirmado • Valor de PSA > 4 ng/mL • Puntuación de Gleason > 6	• 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)
En ambos casos se descartan las muestras hemolisadas	

Los pacientes de ambos grupos se encuentran bajo atención médica en el área de urología del Hospital Central Militar por el diagnóstico de cáncer de próstata en distintas etapas clínicas o por sospecha de cáncer de próstata con confirmación negativa.

10.1.2. Estimación del tamaño de la muestra

La fórmula para calcular el tamaño de muestra cuando se desconoce el tamaño de la población es la siguiente:

$$n = \frac{N \times z^2 \times p \times q}{d^2 \times z^2 \times p \times q}$$

En donde:

Z = nivel de confianza, 1.96 para 95% de confianza

P = probabilidad de éxito, o proporción esperada

q = 1-p

d = precisión (error máximo admisible en términos de proporción)

N= tamaño de la población)

Esta fórmula es válida cuando la población es infinita o cuando la muestra es < al 5% de la población total.

Tomando en cuenta los datos epidemiológicos del cáncer de próstata en México en el año 2012 (de acuerdo a GLOBOCAN) se tiene una incidencia aproximada a 13% de la población masculina (tasa estandarizada por edad) de acuerdo a los datos del censo de población México 2010, México contaba con 119'530,753 habitantes, con una distribución de 48.6% de hombres (58'091,946 hombres), de esta población el 25% es mayor a 40 años (14'522,986 hombres) de los cuales 1'887,988 tienen riesgo de presentar cáncer de próstata.

Esta población se considera infinita para analizarla en su totalidad, por lo que se puede aplicar este método para determinar el tamaño de muestra.

$$n = \frac{1'887,988 \times 1.96^2 \times 0.035 \times 0.965}{217^2 \times 1.96^2 \times 0.035 \times 0.965}$$

$$n = \frac{244,966}{6,109.79}$$

$$n = 40.09 = 40$$

Se requieren 40 personas con diagnóstico confirmado de CaP. En el caso de los controles se requiere de al menos 20 personas clínicamente sanas.

10.1.3. Datos clínicos de los casos

Cuarenta y dos muestras de casos fueron obtenidas por punción antecubital, de las cuales se descartaron tres (dos por estar hemolizadas y una por no contar con historial clínico). Las muestras fueron obtenidas durante los meses de febrero y marzo del año 2017, todas las muestras de casos corresponden a pacientes con adenocarcinomas prostáticos, y se encuentran distribuidas entre las diferentes etapas clínicas del CaP (Tabla 3). Sobre los tratamientos que reciben los pacientes diagnosticados con CaP, se dividen en cuatro, siendo la principal la terapia de supresión de andrógenos, seguida de la radioterapia y la cirugía (prostatectomía radical y la crio-ablación prostática respectivamente) (Figura 5). Dentro de las opciones que existen para la terapia de supresión de andrógenos los casos se administra acetato de abiraterona. En el presente estudio participaron 21 pacientes que recibían terapia de supresión de andrógenos, nueve de los cuales además recibieron radio tereapia, 2 más cirugía (prostatectomía radical) y uno cirugía para aliviar síntomas. Siete de los 17 pacientes que recibieron radioterapia fueron tratados con cirugía (de 12 pacientes con éste tratamiento -prostatectomía radical-), solo 2 pacientes fueron tratados con cirugía para aliviar los síntomas (tunelización y crioablación prostática).

Para los controles las muestras fueron obtenidas por el laboratorio de análisis clínicos en tubo separador de suero, el cual fue utilizado para diversos análisis, incluyendo los niveles el PSA, de esta muestra se guardó una alícuota de 200 μ L para el análisis de expresión del miRNA-107. Los datos obtenidos de los pacientes son la edad, y concentración de PSA en sangre. (Tabla 4). 35 de 50 muestras fueron utilizadas como controles de expresión del miRNA-107 y 39 como casos de CaP para la medición de los niveles del miRNA-107.

Tabla 3.- Resumen de información clínica de los casos, ordenados por estadio del cáncer (I al IV) y distribuidos por puntuación de Gleason y valor TNM de los tumores.

Estadio del cáncer	No de Casos	Puntuación de Gleason			Valor TNM
EC -I	8	4	6	4	T2aN0M0
		3	7	2	T1cN0M0
		1	8	2	T1aN0M0
EC-II	10	1	6	1	T3aN0M0
		6	7	1	T1aN0M0
		1	8	4	T1cN0M0
		2	9	4	T2aN0M0
EC-III	10	6	7	7	pT3N0M0
		3	6	3	T3bN0M0
		1	8		
EC-IV	10	4	9	2	T1aN1M0
		1	8	1	T3aN0M1
		2	10	1	T1cN0M1b
		2	7	1	T3aN1M0
		1	6	1	T2cN0M1b
				1	T4cN0M1
				1	T2cNxM1b
				2	T1cN0M1

Tabla 4.- Edad y concentración de PSA en la sangre de ambos grupos (Casos y controles)

	Casos	Controles
Edad (años)	73.5 ± 8.9	64.1 ± 9.9
PSA (ng/mL)	13.9 ± 12.0	1.3 ± 0.97

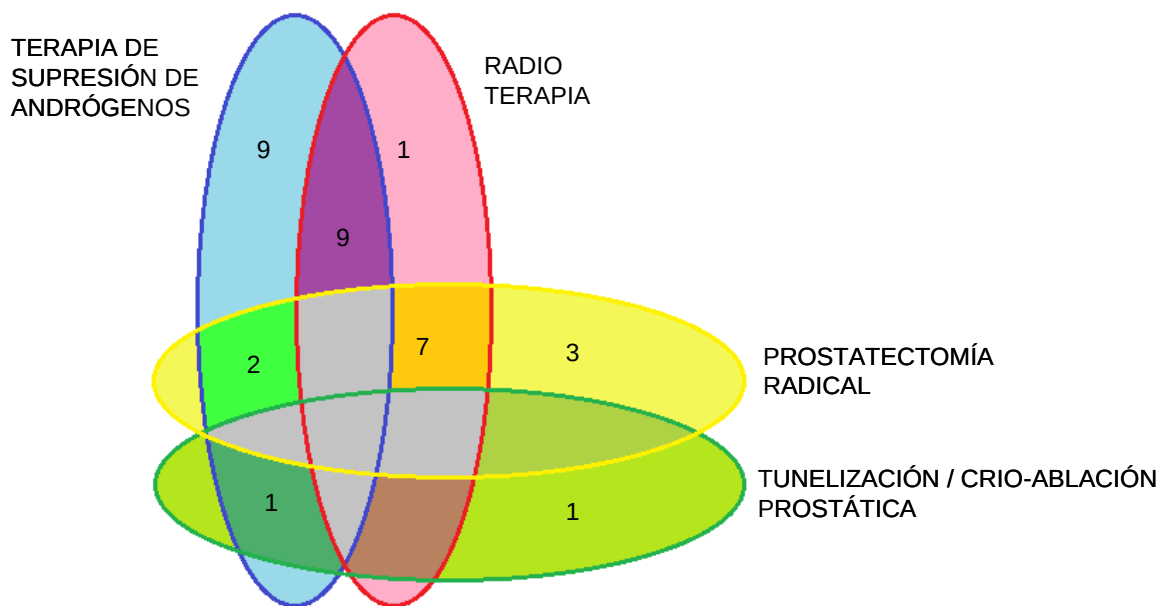


Figura 5.- Distribución de los tratamientos del grupo de estudio

Los tratamientos que reciben los pacientes son variados, siendo el más utilizado la terapia de supresión de andrógenos, seguida de la radioterapia y la prostatectomía radical.

10.1.4. Expresión relativa del miR-107 entre casos y controles

La expresión relativa del miR-107 se evaluó en 39 casos y 35 controles, obteniéndose que el grupo de casos tiene en promedio un cambio de expresión de 8.2 ± 7.5 en relación al grupo control 0.98 ± 0.16 (figura 6), por lo que el aumento de la expresión relativa del miR-107 es estadísticamente significativo ($p=0.000012$). Si agrupamos al grupo de casos por etapa clínica de cáncer (figura 7) se observa que los casos que se encuentran etapa clínica IV, tienen una expresión relativa mayor a la de los casos que se encuentran en las otras etapas clínicas, con un cambio de expresión promedio de 15.9 ± 9.9 , y una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) comparando con las etapas clínicas I, II y III. Si se agrupan los casos de acuerdo a su evolución cáncer de próstata resistente a la castración (CaPRC) y aquellos que no son resistentes a la castración, se observa que el grupo de CaPRC tiene un cambio de expresión promedio de 14.1 ± 9.0 con una diferencia estadísticamente significativa comparada con la expresión relativa del grupo no resistente a la castración de 4.97 ± 2.19 y un valor de $p = 0.0012$ (figura 8).

Con la finalidad de evaluar el poder predictivo del miR-107 en plasma de los pacientes con CaP, se elaboró una Curva de Operador Receptor (ROC) entre los casos y el grupo control (Figura 9). Obteniendo un área bajo la curva de 0.85 con un valor de corte de 1.2.

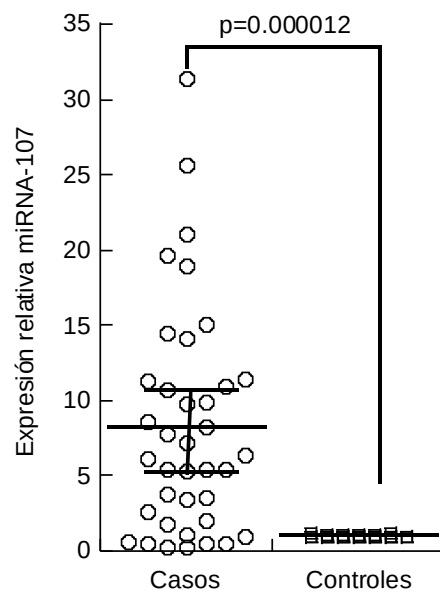


Figura 6.- Expresión relativa del miR-107 en los grupos de estudio

A pesar de la amplia dispersión de la expresión relativa en el grupo de casos, es evidente que hay una sobreexpresión del miR-107 comparada con el grupo control, la diferencia de los promedios es estadísticamente significativa $p < 0.005$ (t-Student 2 colas no pareada), miR-21 como normalizador.

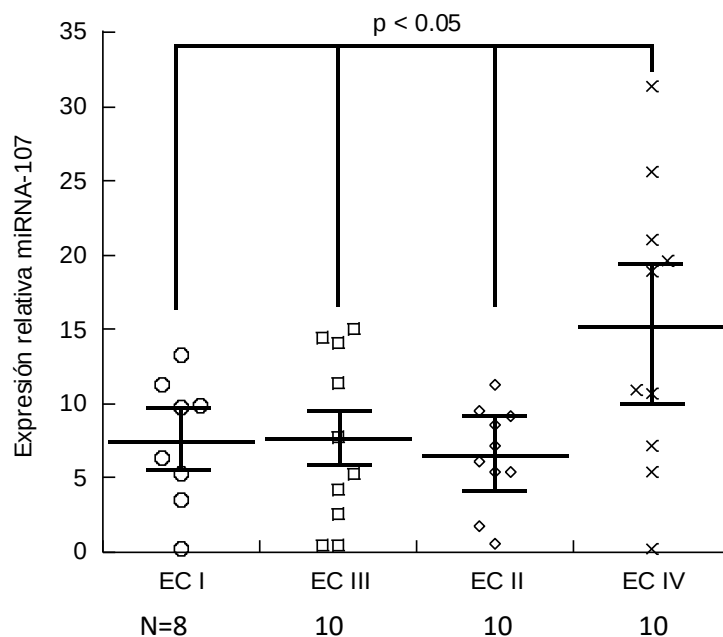


Figura 7.- Expresión relativa del miR-107 en el grupo de estudio estratificado por etapa clínica del CaP.

Estratificando el grupo de casos por etapas clínicas ([EC] I, II, III, IV) del CaP la expresión relativa del miR107 para las etapas I, II y III no muestra diferencias, pero los pacientes en etapa IV tienen una expresión relativa promedio diferente a las otras etapas, $p < 0.05$ t-student dos colas no pareadas.

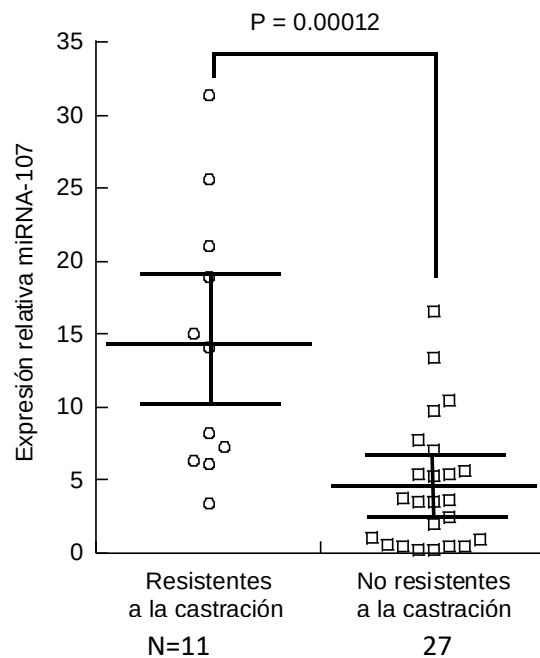


Figura 8.- Expresión relativa del miR-107 en el grupo de estudio de acuerdo a su evolución (CaPRC y CaP).

Agrupando a los casos por evolución del CaP a CaPRC se encuentran diferencias significativas en la expresión relativa promedio del miR-107, $P=0.00012$, t-student dos colas no pareadas.

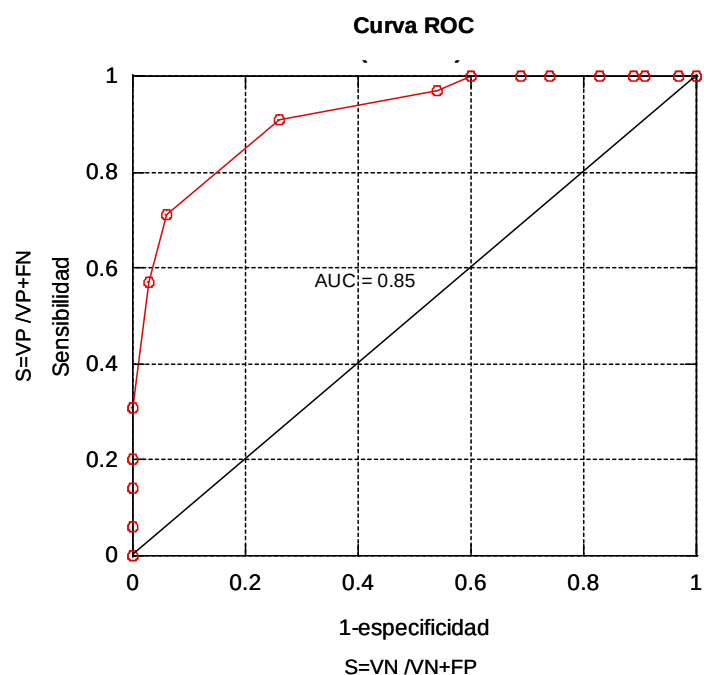


Figura 9.- Curva Receptor Operador de la expresión relativa del miR-107.

La curva nos permite evaluar la especificidad contra la sensibilidad de una prueba basándose en el área bajo la curva, mientras más cercana es a 1 mejor valor predictivo tendrá la prueba, 0.85 es un mejor valor predictivo que los ensayos realizados con PSA

10.2. Objetivo 2

10.2.1. Secuencia y localización del miR-107

El análisis bioinformático realizado en las diferentes bases de datos de miRtaR base, Miranda, Target Scan, Pictar y Cometa nos indicó que el miR-107 tiene la siguiente secuencia:

5'CUCUCUGCUUUCAGCUUCUUUACAGUGUUGCCUUGUGGCAUGGAGUUCAAG
CAGCAUUGUACAGGGCUAUCAAAGCACAGA 3'

Obteniendose como producto de la maduración la siguiente secuencia del miRNA-107.

5' AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUCA 3'

Este miRNA-107 se encuentra codificado en el locus 10q23.31 intrón del gen PANK1 (figura 10) en una región regulada por p53, sin embargo al encontrarse como intrón su génesis se realiza por la vía no-canónica independiente de DROSHA y tiene mas de mil blancos predichas.

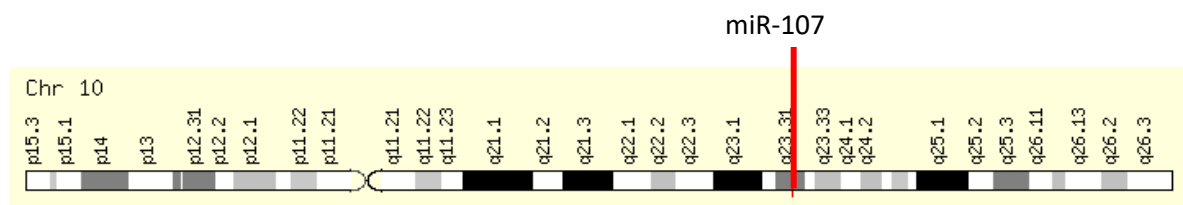


Figura 10.- Mapa del cromosoma 10.

Se indica el locus 10q23.31 en donde se encuentra codificado el miR-107 dentro del cromosoma.

10.2.2. Análisis de enriquecimiento y ontología

El análisis de enriquecimiento en las base de datos Targetscan, miRtarbase, Cometa y Pictar predicen aproximadamente 1288 posibles blancos para el miR-107. Un análisis de Ontología (KEEG), realizado con “DAVID bioinformatics database”, de estos blancos predichos nos permite encontrar aquellos ARNm que codifican proteínas involucradas en vías de señalización que participan en los procesos celulares del cáncer (tabla 5). Los blancos coincidentes entre estas bases de datos indican posibles blancos dentro de la vía PIP3-AKT, la cual es una de las principales debido a que regula corriente abajo muchos procesos relacionados con la proliferación celular, angiogénesis y evasión de la apoptosis, las cuales son características importantes de las células cancerosas. De este grupo de posibles blancos PTEN regula tanto a PIP3 como a AKT al desactivarlos vía desfosforilación.

PTEN es un supresor tumoral que actúa como una proteína fosfatasa de doble especificidad, defosforila las proteínas fosforiladas en los residuos tirosina, serina y treonina. También actúa como una lípido-fosfatasa quitando el grupo fosfato de la posición D3 del anillo inositol del fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato PtdIns(3,4,5)P₃, fosfatidilinositol-3,4-difosfato PtdIns(3,4)P₂, fosfatidilinositol-3-fosfato PtdIns3P e inositol-1,3,4,5-tetrakisfosfato Ins(1,3,4,5)P₄. El orden de preferencia de sustrato *in vitro* es PtdIns(3,4,5)P₃ > PtdIns(3,4)P₂ > PtdIns3P > Ins(1,3,4,5)P₄. La actividad lípido-fosfatasa es crítica para su función supresora de tumores. Antagoniza la ruta de señalización PI3K-AKT/PKB defosforilando los fosfoinosítidos y por tanto modulando la progresión del ciclo celular y la supervivencia de la célula. La forma de la PTEN desfosforilada coopera con la AIP1 para suprimir la activación de la AKT1. La enzima defosforila la quinasa de adhesión focal fosforilada en un residuo tirosina e, inhibe la migración celular, la proliferación celular mediada por las integrinas y la formación de la adhesión focal. Juega un papel como un modulador clave en la ruta de señalización AKT-mTOR controlando el ritmo del proceso de integración de las neuronas recién nacidas durante la neurogénesis adulta, incluyendo el posicionamiento correcto de las neuronas, el desarrollo dendrítico y la formación de

las sinapsis. Puede ser un regulador negativo de la señalización por insulina y del metabolismo de la glucosa en el tejido adiposo. La forma nuclear posee más potencial apoptótico mientras que la forma citoplásmica tiene menos habilidad en la supresión tumoral.

PTEN se presenta como un monómero. Posee un dominio C2 que se une *in vitro* a las membranas fosfolípicas de una manera dependiente del Ca^{2+} . Esta unión es importante para la función supresora de tumores.

Las proteína quinasa B es una familia de proteínas codificadas en los humanos por 3 genes: AKT1, AKT2 y AKT3. Juegan un importante rol en la señalización celular en mamíferos. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las serina/treonina proteína quinasas no específicas.

La AKT1 está involucrada en la supervivencia celular, en la inhibición de procesos apoptóticos, en la inducción de la vía de síntesis de proteínas y además es clave en la vía que guía a la hipertrofia del músculo esquelético (crecimiento de tejido). También la AKT1 está implicada como principal factor de muchos tipos de cáncer (fue originalmente reconocida como un oncogén en retrovirus transformantes).

La AKT2 es una importante molécula de señalización de la vía de señalización de Insulina (induce el transporte de glucosa).

El rol de la AKT3 aún no ha sido bien entendido.

La proteína quinasa B posee dominios PH, dominio con homología a la Pleckstrina. Estos dominios se unen con alta afinidad a los fosfoinosítoles. Así, los dominios PH de la proteína quinasa B se unen al PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) y al PIP2 (fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato). Por ejemplo, al activarse un receptor acoplado a la proteína G o un receptor tirosina quinasa tal como un receptor de insulina (RI), activan a la PI3 quinasa (fosfoinositol 3-quinasa o PI3K) que va a fosforilar PIP2 para formar PIP3.

PIP3 funciona para activar los componentes de señalización en sentido descendente, el más notable es la proteína quinasa AKT, que activa las vías de señalización

anabólicas posteriores requeridas para el crecimiento celular y la supervivencia. La fosfolipasa C escinde PIP2 para producir inositol trifosfato IP3 y diacilglicerol.

PtdIns (3,4,5) P3 es desfosforilado por la fosfatasa PTEN en la posición 3, generando PI (4,5) P2, y por SHIP (fosfatasa de inositol que contiene SH2) en la posición 5 'del anillo de inositol, produciendo PI (3,4) P2.

El dominio PH en varias proteínas se une a PtdIns (3,4,5) P3. Dichas proteínas incluyen Akt / PKB, PDK1, Btk1 y ARNO. La generación de PtdIns (3,4,5) P3 en la membrana plasmática tras la activación de PI 3-quinasas de clase I hace que estas proteínas se transloquen a la membrana plasmática y afecta su actividad en consecuencia.

El dominio PH permite la unión entre PtdIns (3,4,5) P3 y G receptor quinasas acopladas a proteína (GRK). Esto mejora la unión del GRK a la membrana plasmática.

Tabla 5.- Proteínas y vías de señalización identificadas como reguladas por el miRNA-107 en el análisis de ontología.

Vía de señalización	Proteína
Uniones Adherentes	APPL
	Wnt
	Frizzled
Vía de señalización Wnt	Subunidad α
	Axin
	PIP3
Vía de señalización PI3K-AKT	AKT
	PTEN
	APPL
Uniones Adherentes	PLC β
	NOERIA
	JNK
Vía de señalización MAPK	FGF
	FGFR
	RET
Interacción de receptores citocona-cotocina	CDK4
	CiclinaE
	PIZFRAP α
Diferenciación	AML1ETC
	TFG β RII
	hMSH6
Vía de señalización TFG β	HIF β
	Otros
	Su

10.2.3. Identificación de posibles sitios de unión del miR-107 en PTEN

Utilizando la base de datos miRANDA, se obtuvo la secuencia 3'UTR del mRNA del gen PTEN, el software identifica a través de un alineamiento los posibles sitios de unión (figura 11) tomando como criterio que los sitios cuenten con la complementariedad de la región semilla del miRNA a analizar. En este caso la región semilla del miR-107 esta compuesta por 6 nucleótidos en la región 5' del miRNA con la secuencia GCAGCA, y posteriormente que tenga por lo menos el 85 % de bases complementarias a los 12 nucleótidos que componen el miRNA (figura 12). La secuencia obtenida muestra que existen tres sitios de unión que cumplen estos criterios. La longitud de los posibles sitios de union indica que el apareamiento no es perfecto y que se formarán estructuras secundarias durante la unión, mientras menos estructuras secundarias se formen, mayor será la puntuación de alineamiento.

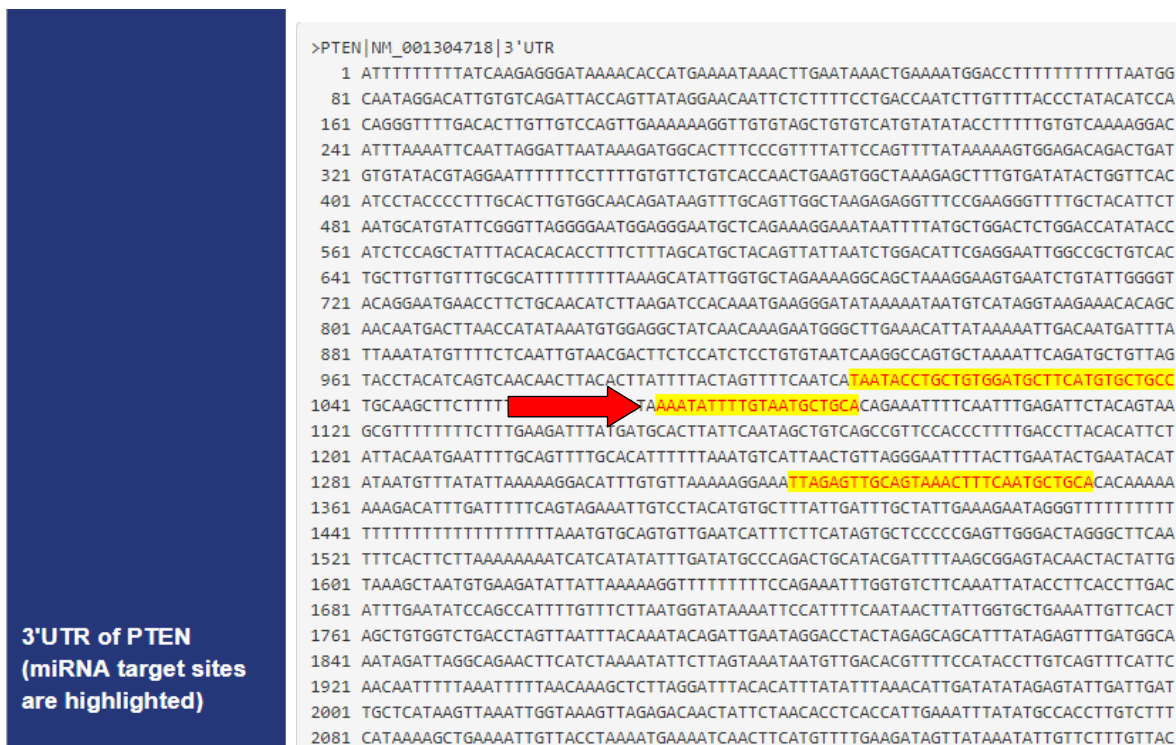


Figura 11.- Sección del extremo 3'UTR del mRNA de PTEN.

Se resaltan en color amarillo los posibles sitios de unión del miRNA-107, se indica con la flecha el que reporta mayor puntuación de alineación.

miRNA-target interactions (Predicted by miRanda)	ID	Duplex structure	Position	Score
	1	miRNA 3' acUAUCGGGACAUUUUACGACGa 5' :: Target 5' aaATA-TTTTGT--AATGCTGCa 3'	1070 - 1089	160.00
	2	miRNA 3' acUAUCGG-GACAU-----GUUACGACGa 5' :: Target 5' ttAGAGTTGCAGTAAACTTTCAATGCTGCa 3'	1323 - 1352	155.00
	3	miRNA 3' acUAUCGG-GACAU-----GU-UACGACGa 5' : : : Target 5' taATACCTGCTGTGGATGCTTCATGTGCTGCc 3'	1009 - 1040	137.00

Figura 12.- Posibles sitios de unión del miR-107 a la sección 3'UTR del mRNA de PTEN.

En orden descendiente el puntaje de alineación, así como su posición en el transcrito, enmarcado en un cuadro rojo se indica el sitio de mayor puntuación de unión

10.3. Objetivo 3

10.3.1. Hibridación de nucleótidos

Los oligonucleótidos diseñados para hibridación tienen extremos adherentes para los sitios de restricción *SpeI* (CTAG) y *HindIII* (TTCGA), de la hibridación de estos se obtiene una sección de DNA de doble cadena de 40 pb (figura 14), los cuales se clonarán en el vector pMIR en la región 3'UTR del gen de luciferasa. La figura 13 muestra las colonias positivas a el vector clonado que tiene una longitud de 6448 pb la diferencia del vector pMIR vacío y los vectores clonados es de 22 pb, lo que lo hace difícil de diferenciar del vector vacío por electroforesis en gel de agarosa (figura 15), por lo que los vectores clonados fueron sometidos a doble digestión con la enzimas de restricción *HindIII* y *SpeI*, obteniéndose la liberación de los insertos (figura 16).

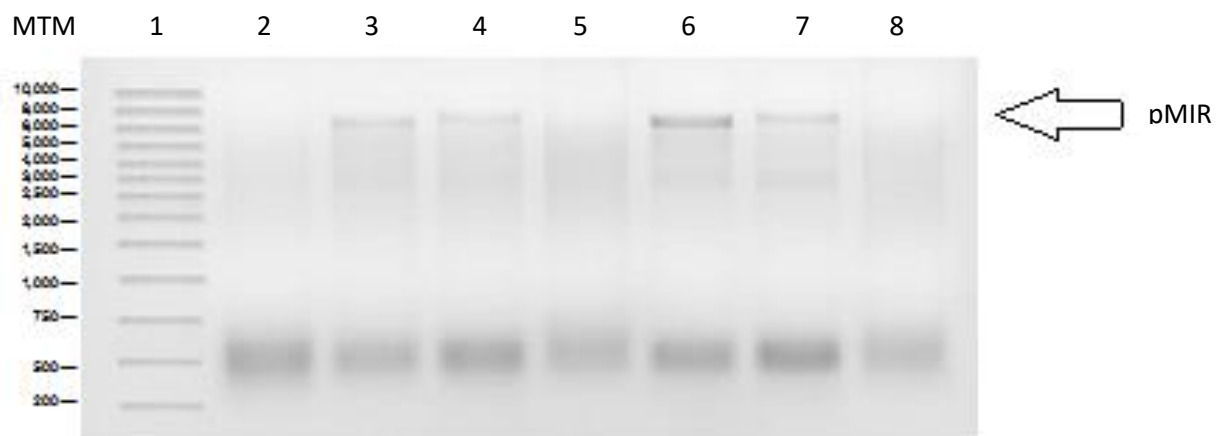


Figura 13.- PCR colony de colonias transformadas con el vector pMIR.

En los carriles 2 a 8 se encuentran el PCR colony de 7 colonias seleccionada en medio LB+ampicilina, los carriles 3, 4, 6 y 7 son positivas al vector pMIR (alrededor de 6000pb), la flecha indica el tamaño del vector pMIR. El carril 1 MTM, es el marcador de tamaño, 10 Kb. Eelectroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE,

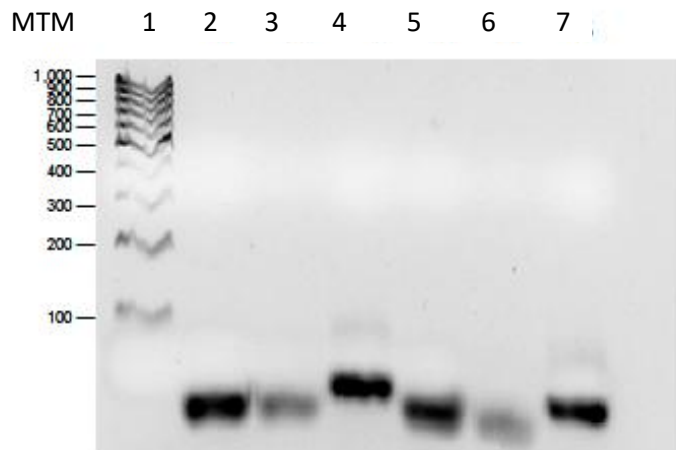


Figura 14.- Hibridación de los oligonucleótidos

Los carriles 2 y 3 contienen oligonucleótidos complementarios de PTEN wild type, el carril 4 muestra el apareamiento de estos oligonucleótidos PTEN WT a, los carriles hibridados 5 y 6 muestran los oligonucleótidos de PTEN mutante y el carril 7 e apareamiento de estos oligonucleótidos PTEN-mut , MTM marcador de tamaño de 1Kb. Electroforesis en gel de agarosa al 4% en TAE,

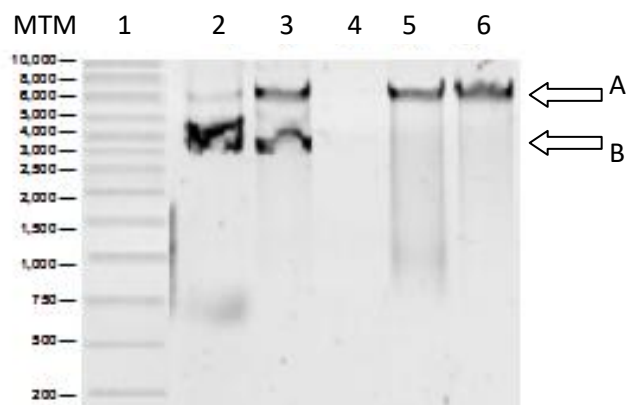


Figura 15.- Verificación del vector con insertos por doble digestión.

Los carriles 2 y 3 muestran el vector pMIR vacío después de la doble digestión, en la flecha A de 6000 pb se encuentra el vector linealizado, las bandas subsecuentes son conformaciones no lineales del vector, en el carril 5 y 6 se muestran el vector pMIR con los insertos PTEN-WT, y PTEN-mut respectivamente. Gel de agarosa al 1% en TAE, MTM marcador de tamaño de 10Kb.

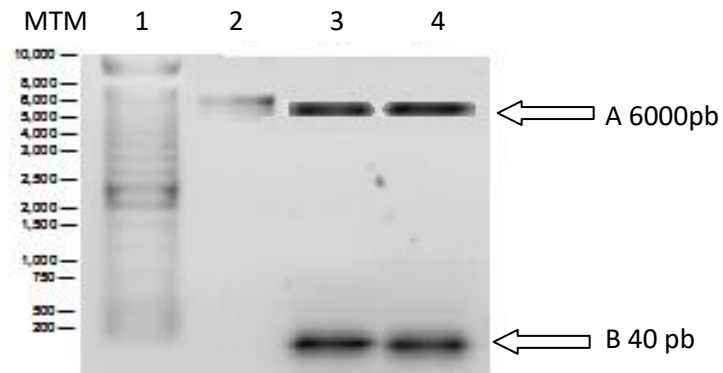


Figura 16.- Liberación de los insertos por doble digestión.

En el carril 2 se observa el plásmido pMIR vacío en un tamaño daproximado a 6000 pb, en el carril 3, renglón A se observa el vector desgnado pMIR-PTEN-WT después de la doble digestión, con un tamaño cercano a 6000 pb pero menor en relación al vector vacío, en el carril 3 renglón B se observa el inserto PTEN-WT en un tamaño menor a 200 pb (el inserto es de 40 pb), en el carril 4 renglon A se encuentra el vector designado pMIR-PTEN-mut después de la doble digestión, en el carril 4, renglón B el inserto PTEN-mut, MTM, marcador de tamaño de 10Kb. Gel de agarosa al 4% en TAE.

10.4. Expresión relativa del miR-107 en las líneas celulares DU145 y PC3

Para realizar el ensayo de luciferasa, las correspondientes construcciones (pMIR-PTEN-WT y pMIR-PTEN-mut) se realizó la transfección en líneas células de próstata, se seleccionó como línea de trabajo la línea celular PC3, esta línea proviene de un cáncer de próstata metastático a hueso en etapa clínica IV, la cual tiene un potencial metastático mayor a las líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y LNCaP, con un comportamiento similar a los pacientes que presentan cáncer de próstata resistente a la castración. Como primer paso se estableció la expresión relativa del miR-107 de las células PC3 (figura 17), observándose que comparando con la línea celular DU145 tiene una expresión relativa 25% mayor.

10.5. Ensayo de luciferasa

El ensayo de luciferasa se realizó utilizando y comparando 7 condiciones:

- | | | |
|---|--|------------------------------|
| 1 | Transfección del vector pMIR vacio | pMIR |
| 2 | Transfección de vector clonado con PTEN1a | pMIR-PTEN wt |
| 3 | Transfección del vector clonado con PTEN1a y la cotransfección del pre-miR-107 | pMIR-PTEN wt
pre-miR-107 |
| 4 | Transfección del vector clonado con PTEN1a y la cotransfección del pre-miR-neg | pMIR-PTEN wt
pre-miR-neg |
| 5 | Transfección del vector clonado con PTEN1a mut | pMIR-PTEN mut |
| 6 | Transfección del vector clonado con PTEN1a mut y la cotransfección del pre-miR-107 | pMIR-PTEN mut
pre-miR-107 |
| 7 | Transfección del vector clonado con PTEN1a mut y la cotransfección del pre-miR-neg | pMIR-PTEN mut
pre-miR-neg |

Obteniendo como resultados (figura 18) que la condición 2 y 4 mostraron una disminución del 25% de la actividad de luciferasa comparando con los controles negativos (vector vacío y condiciones 5, 6 y 7 que fueron transfectadas con el vector clonado con PTEN1a mut), mientras la condición 3 a la cual se le cotransfectó el pre-miR-107) se observó una disminución de la actividad de luciferasa del 22% comparando con las condiciones. Esta diferencia en el valor promedio de la actividad de luciferasa fue estadísticamente significativa ($p=0.013$) con una t-student de 2 colas no apareada, lo que confirma que el sitio 1070-1089 de la región 3'UTR del mRNA de PTEN es un blanco del miRNA-107. Con el objetivo de verificar la cotransfección del pre-miRNA-107 se evaluó la expresión relativa del miR-107 comparando con las condiciones a las que no se les cotransfectó el miR-107, observándose que al cotransfectar 200 pM del precursor se incrementa la expresión relativa en un 19%.

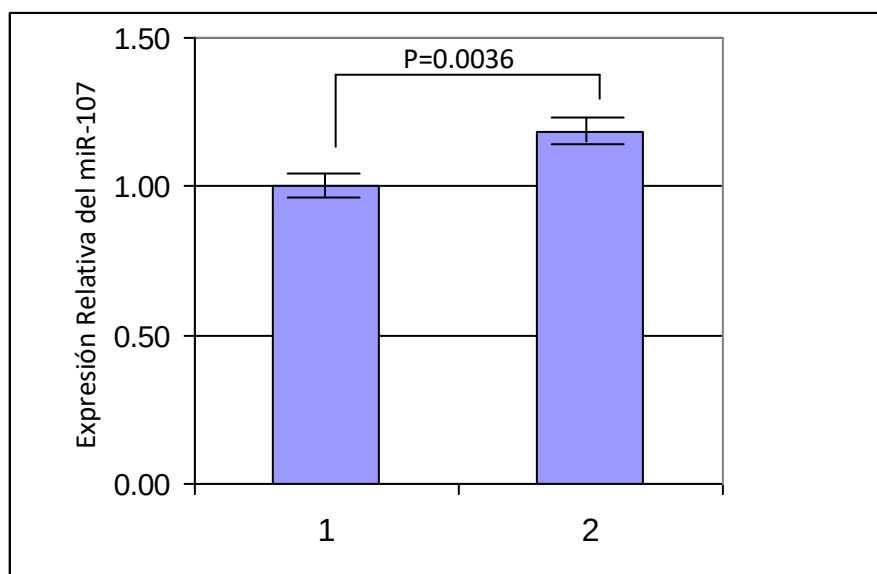


Figura 17.- Expresión relativa del miRNA-107 en las líneas celulares 1)PC3 sin transfectar el pre-miRNA-107 y 2)PC3 transfectada con 200 pM del pre-miRNA-107. $p=0.00036$ (t student 2 colas no apareadas).

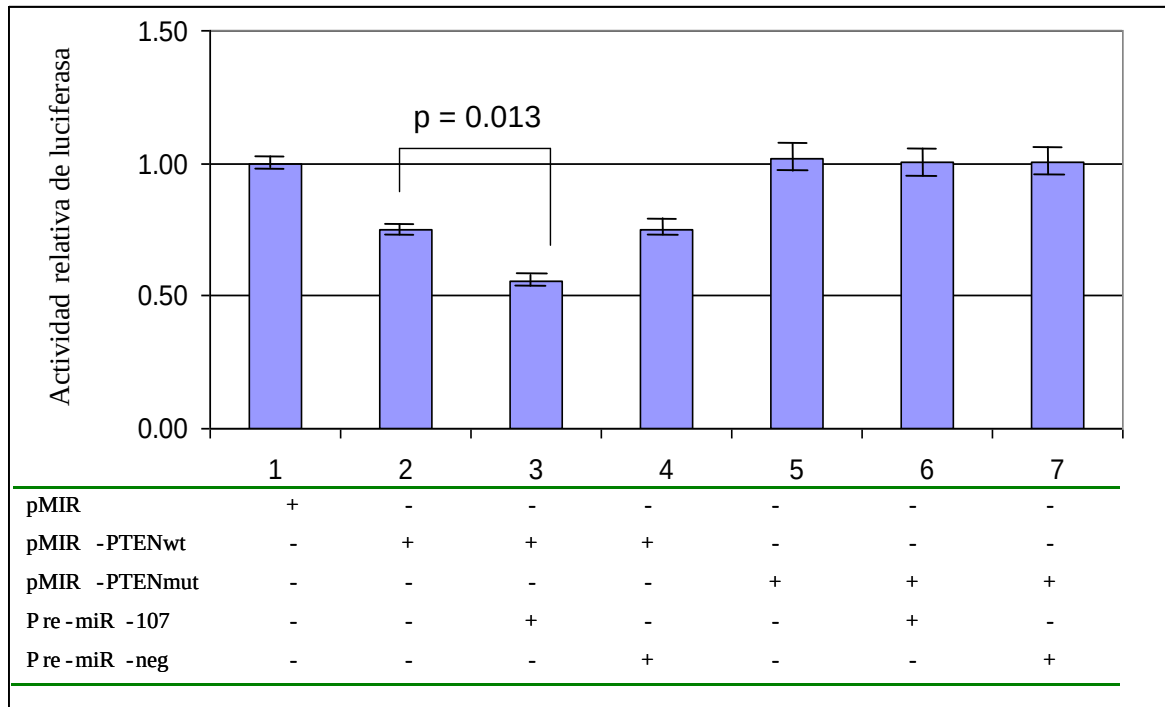


Figura 18.- Ensayo de luciferasa.

La columna 1 células PC3 transfectadas con el vector pMIR vacío, columnas 2, 3, 4 células pC3 transfectadas con la construcción pMIR-PTEN1a, columnas 3 y 4 co-transfectado con el pre-miRNA-107 y pre-miR-neg, respectivamente, columnas 5, 6 y 7 células PC3 transfectadas con la construcción pMIR-PTEN1a mut, columnas 6 y 7 co-transfectadas con el pre-miR-107 y pre-miR-neg, respectivamente.

10.6. Evaluación de la proteína PTEN en la línea celular pC3

El efecto de la transfección del pre-miR-107 en la expresión de la proteína PTEN se observó al transfectar 200 pM el precursor del miR-107 en la línea celular PC3, a través de un ensayo de inmunodetección, observándose una disminución de la expresión de la proteína de 18% respecto a los ensayos de control. Así mismo se evaluó la expresión de la proteína AKT en sus estados fosforilado y des-fosforilada, siendo el estado fosforilado 15% más abundante respecto al no fosforilado en los ensayos a los que se les transfectó 200 pM del precursor del miR-107 en la línea celular PC3 (figura 19).

10.7. Evaluación del ensayo de herida

El efecto del miR-107 sobre la capacidad de migración se observó a través del ensayo de herida, al transfectar 200 pM del pre-miRNA-107 en la línea celular PC3, tomado como referencia las células sin transfectar, observando la herida al microscopio a las 0, 2, 4 y 8 horas de manera que la condición transfectada con el pre-miRNA-107 comenzó a cerrar con mayor velocidad en comparación a los controles negativos, con una diferencia de 30% a las 8 horas de iniciado el ensayo (figura 20).

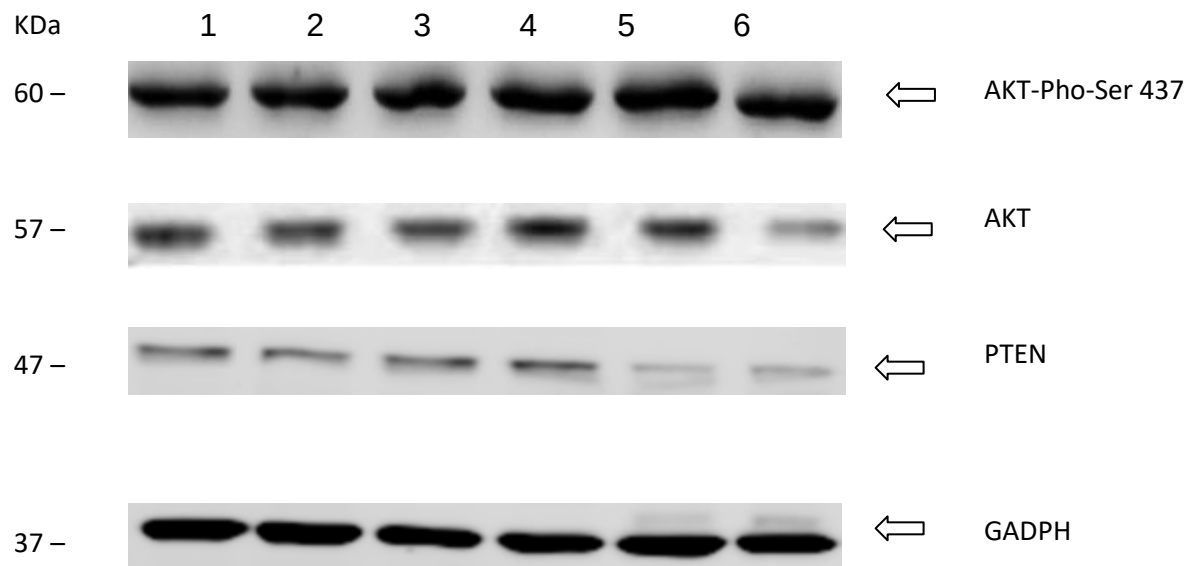
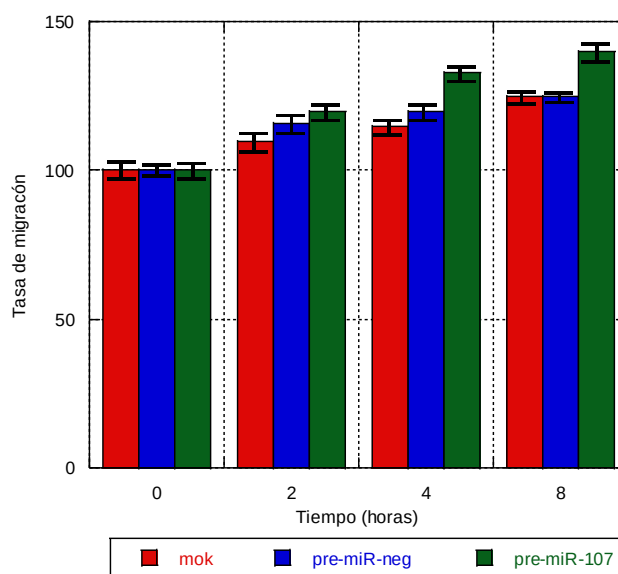
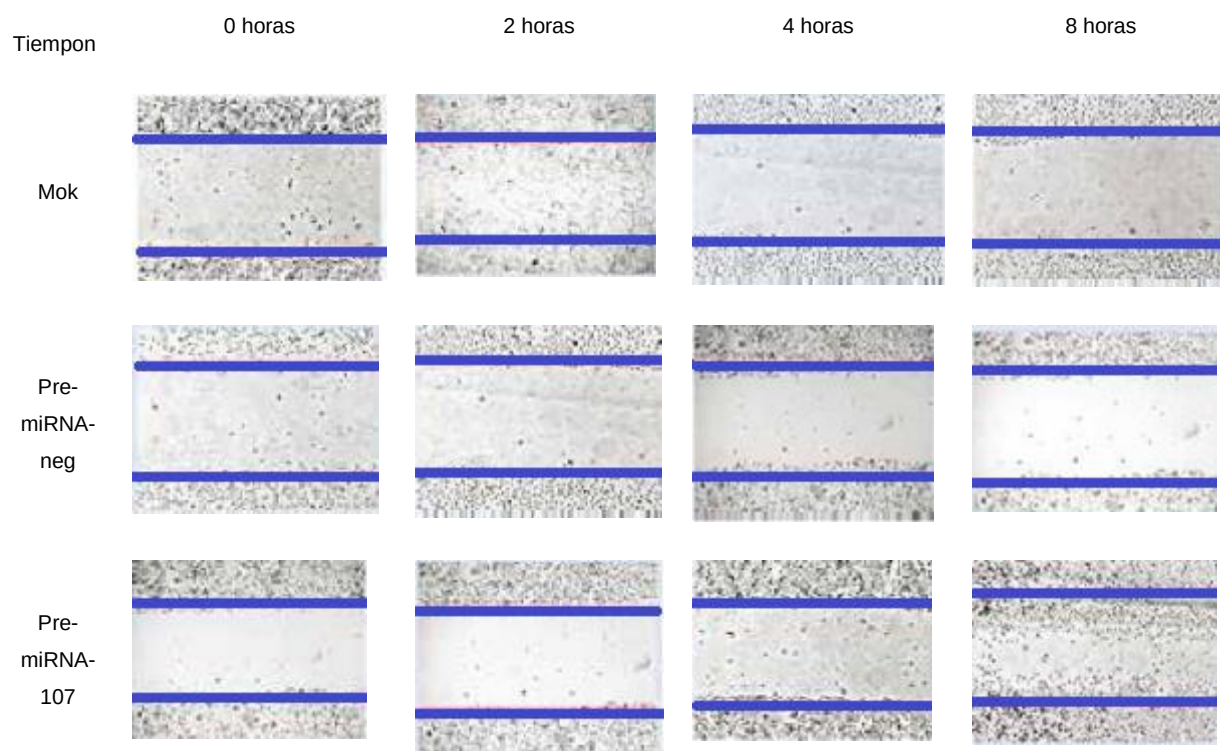


Figura 19 Inmunodetección de las proteínas PTEN, AKT fosforilada (ser 437) y AKT desfosforilada, GADPH como normalizador

Carriles 1 y 2 células PC3 - Mok, 3 y 4 células PC3 transfectadas con 200 pM de pre-miRNA-negativo (scramble), 5 y 6 células PC3 co-transfectadas con 200 pM de pre-miRNA-107. GADPH como control de carga en las 3 condiciones experimentales.

A)



B)

Figura 20.- Ensayo de migración celular.

A) Imágenes representativas de las condiciones de prueba (mok, pre-miRNA-neg, pre-MiRNA.107) a diferentes tiempos 0, 2, 4 y 8 horas. B) Tasa de migración celular en las de prueba (mok, pre-miRNA-neg, pre-MiRNA.107) al inicio del ensayo, 2, 4 y ocho horas de iniciado.

11. Discusión

El miR-107 como en estudios anteriores (Bryant *et al*, 2012) se encontro sobre expresado circulante en pacientes con cáncer de próstata , sin embargo el presente estudio tiene una población mayor (n=38 casos) comparado contra otros estudios (n=11) lo que le confiere un mayor poder estadístico a los análisis, otra característica del presente estudio es la cohorte de caos, la cual puede estratificarse tanto por etapa clínica del cáncer, como en el desarrollo de la enfermedad (CaP y CaPRC), en los estudios anteriores solo han estratificado a los casos como cáncer localizado y cáncer metastático. Un elemento importante en el desarrollo de estudios de expresión de miRNAs circulantes es el método de normalización, en el estudio de Bryant *et al*, 2012 se creó una curva estandar para cada ensayo, por lo que su observación de sobreexpresión es en número de copias del miR-107, tambien utilizaron el método de spike in en otros ensayos (Lodes *et al*, 2009 y Mihelich *et al*, 2015) se realizaron micro arreglos o la normalización con RNU-6, al respecto nuestro estudio fué normalizado con miR-21, el cual ha sido reportado como estable en su forma circulante (Solayman *et al*, 2015), sin embargo vale la pena evaluar cual sería el mejor método para normalizar, a un tejido que recoge metabolitos y algunos desechos celulares como el la sangre y sus componentes (suero o plasma), o incluso los exosomas y micro vesículas, las cuales son elegidas por otros investigadores para recolectar los miRNAs.

Sobre el poder diagnóstico del miR-107 en comparación con la prueba de PSA, se encontró una mejor área bajo la curva tomando en cuenta a la población total, estudios como (Thompson, *et al*. 2005) mejora su poder predictivo cuando se aplica a pacientes con CaP avanzado (en relación a la puntuación de Gleason), sin pero aún así el miR-107 tiene un mejor poder predictivo (basándose en el área bajo la curva), estudios como el ublicado por Janbaziroudsari *et al*. 2016 han demostrdo que los niveles de PSA en suero no se encuentran asociados con los resultados de las biopsias de tejido prostático canceroso, algo que tambien se observa en nuestros datos (tabla 3), la puntuación de Gleason no está asociada con la etapa clínica del

cáncer o el valor de TNM del mismo. Sin embargo el valor de la expresión del miR-107 si se asocia con la etapa clínica del cáncer y su desenlace. Lo que lo coloca como un candidato a ser evaluado con otros diseños experimentales como posible biomarcador de seguimiento del tratamiento o evolución del CaP.

El hecho de que el miR-107 se encuentre sobre expresado circulante en plasma en los pacientes con CaP hace necesario confirmar su función en el CaP, del análisis bioinformático se encontró su secuencia y varios posibles blancos dentro de las vías de señalización relacionadas con el cáncer. La vía de PTEN-AKT ha sido señalada de interés en el desarrollo del CaP y su progresión a CaPRC (Moulholland et al, 2006, Lin et al, 2015) debido a su relación con la proliferación, crecimiento, evasión de la apoptosis y angiogénesis sin embargo no había sido comprobado que PTEN como regulador de AKT fuera blanco del miR-107; se habían identificado a los miR-19, 23, 26 y 92 como reguladores de PTEN, sin embargo ninguno de estos ha sido reportado como sobreexpresados de forma circulante (Tian et al, 2013), lo que lo pone bajo sospecha de ser responsable de regular de forma negativa a PTEN. PTEN puede ser un buen blanco para el miR-107 debido a que tiene tres posibles sitios de unión en su extremo 3'UTR, con un puntaje de unión mayor a 100 cada uno, por lo que se prevé que formen estructuras poco complejas en el momento del apareamiento de secuencias.

La validación del blanco con el ensayo de luciferasa indica que PTEN si es blanco del miR-107 por lo menos la región de mejor puntuación de unión, por lo que deberá complementarse este ensayo con la evaluación de los otros posibles sitios de unión y posteriormente su combinación. Además de probar diferentes líneas celulares de próstata. Estudios como el de Vanacore et al, 2017 han concentrado a varios miRNAs que han sido identificados funcionales como onco-miRs o miRs-supresores de tumores, en esta lista no figura el miR-107.

El ensayo de herida para evaluar el efecto sobre la migración del miR-107 indica que hay un pequeño efecto sobre la misma, PTEN no se encuentra relacionado con la migración celular, sin embargo existen otros posibles blancos como se indicó en la tabla 7, el miR-107 tiene posibles blancos en vías de señalización de uniones

adherentes, por lo que sería necesario validar alguno de esos posibles blancos a través de un ensayo de luciferasa.

El análisis bioinformática indica que AKT3 es un posible blanco del miR-107, sin embargo Lin et al, 2015 reportaron la sobre expresión de AKT3 en cáncer de próstata, por lo que difícilmente pudiera ser un blanco y mantenerse sobreexpresado. Su análisis por western blot fue para evaluar si las posibles disminuciones en la expresión de PTEN afectaría la relación de fosforilación de AKT, siendo que si AKT se encuentra mayormente fosforilado sus funciones río abajo se encontrarán mayormente activadas.

12. Conclusión

En el presente estudio se ha demostrado que los niveles séricos del miR-107 se encuentran expresados con un nivel de cambio de 8.5 veces más en los pacientes con CaP que en el grupo control, lo cual ya había sido reportado previamente por otros investigadores, sin embargo al estratificar a los casos por etapa clínica del cáncer y por evolución del mismo, se encuentra que la expresión es mayor en promedio en aquellos pacientes que se encuentran en la etapa clínica IV y de igual forma es elevada en aquellos pacientes que desarrollan cáncer de próstata resistente a la castración, por lo que este miRNA pudiera ser probado de manera más amplia para como posible biomarcador de monitoreo de la evolución del paciente, siendo que con los datos recabados la expresión relativa del miRNA-107 se ha evaluado la sensibilidad contra la especificidad del mismo, dejando como resultado prometedor un área bajo la curva ROC de 85%.

El CaPRC es la principal causa de desenlace fatal del CaP y hasta la fecha no se han desarrollado muchos estudios que puedan diferenciar a pacientes que desarrollaran la resistencia a la castración, de manera que el miRNA 107 puede ser estudiado con un mayor número de pacientes que han sido diagnosticados como resistentes al tratamiento de castración (química o física).

Las características de los miRNAs circulantes como resistencia a la degradación y la facilidad relativa a ser analizados y cuantificados lo colocan como buen candidato a biomarcador de seguimiento del CaP, por lo que se hace necesario realizar un estudio longitudinal con pacientes recién diagnosticados en etapa clínica I.

Por otro lado este miRNA también tiene una expresión diferencial en otros tipos de cáncer, lo que pone en duda la especificidad como biomarcador, al respecto la función del miRNA en otros tipos de cáncer es variable, puede funcionar como miRNA protector de tumores o como proto-onco-miRNA, por lo que se hace necesario evaluar su función en el cáncer de próstata, para tal efecto el uso de los programas bioinformáticos que predicen los posibles genes que regula de forma posttranscripcional muestran que el miRNA-107 tiene más de 1000 genes blanco, pero solo unos cuantos se encuentran involucrados en los procesos moleculares que se relacionan con las características de las células cancerosas, dentro de estos posibles blancos destaca la vía de señalización PIP3-AKT, en donde se muestra como posible blanco el gen PTEN, el cual es un regulador negativo de la vía PIP3-AKT controlando a AKT al desfosforilarla, lo que dejaría a AKT de manera funcional de forma desregulada facilitando los procesos moleculares río abajo, lo que le permitiría a una célula evadir la apoptosis, y proliferar de forma incontrolada (Figura 21). Estas características de evasión de la apoptosis, proliferación celular y angiogénesis son de las principales que se manifiestan en cáncer que ha desarrolladometástasis, en el caso del CaP el que se encuentra en la etapa clínica IV, lo que concuerda con uno de nuestros resultados, en el que los casos al ser estratificados por etapa clínica se observa que aquellos que se encuentran en la etapa clínica IV tienen una expresión relativa del miRNA-107 promedio de 15.1 veces el valor de cambio, comparando con el análisis de PSA, este también aumenta su poder predictivo cuando se estratifica a la población por etapa clínica, lo que hace necesario evaluar de forma amplia el comportamiento del miRNA-107 en una cohorte más amplia.

El ensayo de luciferasa muestra que el miR-107 sí tiene la capacidad de unirse por lo menos a uno de los 3 posibles sitios predichos por el análisis bioinformático (posición 1070 – 1089 de la región 3'UTR del mensajero de PTEN), en este punto se hace

recomendable diseñar experimentos que permitan evaluar a los 3 sitios juntos, mutando cada uno y poder valorar con mejores argumentos la funcionalidad del miR-107 sobre PTEN, así mismo PTEN puede ser blanco de más miRNAs, dentro de la familia del miRNA-107 el miRNA-103 que es un paralogo del miRNA-107 comparte la misma región semilla, lo que también lo coloca como candidato a ser evaluado como agente de control postranscripcional del gen PTEN.

Si bien los ensayos complementarios de inmunodetección de la proteína PTEN confirman un efecto de silenciamiento este parece no ser tan poderoso, cabe recordar en este punto que PTEN no es el único blanco disponible, PTEN puede hacer blanco en otras proteínas, así mismo el mRNA de PTEN puede ser silenciado por otros miRNAs. El ensayo de funcionalidad evalúa la capacidad de invasión de las células, una característica relacionada con la sobrevivencia de la célula y su proliferación.

Los resultados de la presente investigación indican que el miR-107 en cáncer de próstata tiene una función de proto-onco-miR, y su expresión relativa tanto en tejido como circulante le confiere ventajas (estabilidad y facilidad de análisis) buscadas en los biomarcadores, llamando fuertemente la atención en su capacidad para identificar a aquellos pacientes que desarrollan cáncer de próstata resistente a la castración. Sobre la función del miRNA-107 tanto molecular como sobre el fenotipo celular se observan efectos que confirman que este es un proto-onco-miR. Debido a que tiene efecto sobre el fenotipo de proliferación e invasión, se hace necesario realizar más pruebas con otra línea celular de próstata no cancerosa, en el presente estudio PC3 fue elegida por tener características compartidas con el CaPRC, sin embargo se sabe que esta línea celular es altamente proliferativa e invasiva, sin embargo los ensayos sí muestran que cotransfectar el pre-miRNA-107 incrementa estas características.

La especificidad del miR-107 en cáncer de próstata deberá de ser evaluada, ya que se ha demostrado que este se encuentra sobre expresado en otros tipos de cáncer, sin embargo ningún diagnóstico se basa solo en la evaluación de biomarcadores, todo diagnóstico comienza con la oscultación médica con el subsecuente interrogatorio y evaluación de síntomas y signos, por lo que se pueden descartar

otros tipos de cáncer como el pulmonar, estomacal, de colón y de páncreas cánceres en donde se ha reportado la sobreexpresión del miR-107.

Sobre la hipótesis que dio inicio a la presente investigación “El miR-107 se encuentra asociado al cáncer de próstata al participar en alguna de las vías de señalización del cáncer y podría ser utilizado como posible biomarcador al asociarse a el grado de malignidad del cáncer de próstata”

Se tiene suficiente evidencia para aprobar la hipótesis ya que el miRNA-107 si se encuentra participando en vías de señalización del cáncer, se demostró que puede regular post-transcripcionalmente a PTEN, y que este regula la vía de señalización PIP3-AKT, la cual es fundamental en la proliferación celular, evasión de la apoptosis, angiogénesis, se mostró evidencia que indica que el miRNA-107 se encuentra mayormente sobreexpresado en la etapa clínica IV del cáncer de próstata y en pacientes que desarrollaron CaPRC, y tambien se encotró evidencia de que una mayor expresión en líneas celulares de próstata, altera el fenotipo celular incrementando la proliferación e invasión de las mismas.

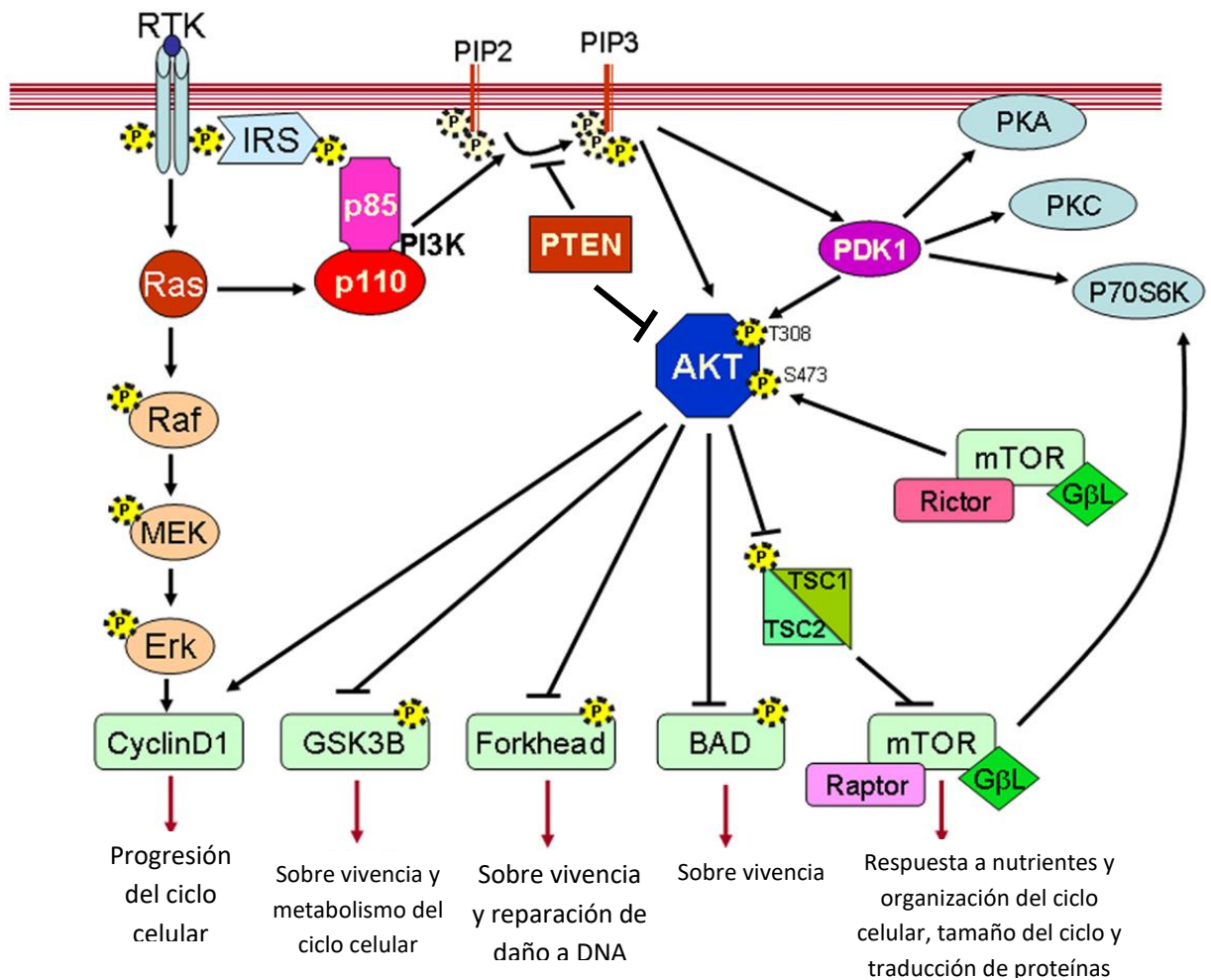


Figura 21.- Vía de señalización PIP3 – AKT.

Regulador principal de procesos de proliferación, organización del ciclo celular y supervivencia de la célula.

13. Perspectivas de la investigación

Esta investigación puede continuar por diferentes caminos y resolver nuevas preguntas que surgieron durante el desarrollo de la misma, estas son, conocer si la expresión del miR-107 es constante o variable durante el desarrollo del cáncer de próstata, lo que requiere cambiar el modelo de investigación a uno longitudinal prospectivo.

Evaluar otros sitios de unión en PTEN, realizar los ensayos en líneas celulares de próstata no cancerosas, o probar aproximaciones indirectas como el uso de esponjas en líneas celulares cáncerosas.

También se hace necesario que se evalúe la expresión del miR-107 en sujetos sanos a lo largo del desarrollo, así como su expresión relativa en otros padecimientos en el género femenino.

Por otro lado sobre el cáncer de próstata, se hace necesario incrementar el número de muestras a evaluar con diferentes tratamientos y de otras instituciones de salud, así como el uso de otras tecnologías de análisis como la ddPCR (PCR digital) que puede arrojar los resultados analíticos en unidades no relativas.

14. Referencias Bibliográficas

- Agaoglu FY, Kovancilar M, Dizdar Y, Darendeliler E, Holdenrieder S, Dalay N, Gezer U: (2011). Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumor Biol*, 32(3) p583–588.
- Arrabal-Martína, M, Anglada-Curadob, F, Cózar-Olmo, JM Soler-Martínez, J. Moreno-Jiménez, J. Castiñeiras-Fernández, J. Ledo-Cepero, M.J. Beardo-Villar, P. Requena-Tapia, M.J. Zuluaga-Gómez A. (2013) Acetato de abiraterona prequimioterapia. Propuesta de un algoritmo de tratamiento en el carcinoma de próstata resistente a castración. *Actas Urol Esp*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.acuro.2013.10.008>.
- Baltimore D., Boldin M.P., O'connell R.M. Rao D.S., Taganov K.D. (2008). MicroRNAs new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol*; 9(8):839 – 845.
- Bartel D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136:215-233.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116(2).
- Baxevanis CN, Papamichail M, Perez SA. (2015) Prostate cancer vaccines: the long road to clinical application. *Cancer Immunol Immunother*. 2015 Apr;64(4):401-8
- Blanco J, Bullón M. Cuadernos de genética. España: Marban, 1987.
- Brase J.C., Johannes M., Schlomm T., Falth M., Haese A., Steuber T., Beissbarth T., Kuner R., Sultmann H. (2011). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer *Int J Cancer* 128: 608-616.

-
- Brittany L. Mihelich, Joseph C. Maranville, Rosalie Nolley, Donna M. Peehl, Larisa Nonn. (2015). Elevated Serum MicroRNA Levels Associate with Absence of High-Grade Prostate Cancer in a Retrospective Cohort. PLOS ONE 10(4): e0124245
 - Bryant R.J., Pawlowski T., Catto J.W.F., Marsden G., Vessella R.L., Rhee B., Kuslich C., Visakorpi T., Hamdy F.C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. British Journal of Cancer 106(4), 768 – 774.
 - Bryant R.J., Pawlowski T., Catto J.W.F., Marsden G., Vessella R.L., Rhee B., Kuslich C., Visakorpi T. Hamdy F.C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. British Journal of Cancer 106(4), 768 – 774.
 - Cavenee WK, White RL. (1995).The genetic basis of cancer. Sci Am 272(3):72-79.
 - Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. Nature 436, 740–744.
 - Chen P.S., Su J.L., ChaS.T., Tarn W.Y., Wang M.Y., Hsu H.C., Lin M.T., Chu C.Y., Hua K.T., Chen C.N., Kuo T.C., Chang K.J., Hsiao M., Chang Y.W., Chen J.S. Yang P.C., Kuo M.L. (2011). miR-107 promotes tumor progression by targeting the let-7 microRNA in mice and humans. The Jour of Clin Invest. 121(9) 3442 – 3455.
 - Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. Nat Rev Clin Oncol. Jun 7; 8(8):467-77.
 - Cramer DW, Muto MG, Reichardt JK, Xu H, Welch WR, Valles B., Ng WG. (1994). Characteristics of women with a family history of ovarian cancer. I. Galactose consumption and metabolism. Cancer; 74(4):1309-1317.
-

-
- D'Amico AV, Whittington R, Malkowicz SB, Cote K, Loffredo M, Schultz D, Ming-Hui Chen M.H., Tomaszewski J.E., Renshaw A.A., Wein A., Richie J.P., (2002). Biochemical outcome after radical prostatectomy or external beam radiation therapy for patients with clinically localized prostate carcinoma in the prostate specific antigen era. *Cancer*. 95 p281–6.
 - Estevez R. *Oncología Clínica*. El Salvador: Edic. Univ., 1978.
 - Fouad and Aanei. (2017). Review article: Revisiting the hallmarks of cancer *Am J Cancer Res* 7(5):1016-1036.
 - Gallo R. Virus oncogénicos ARN. *Seminarios de Oncología* 126-148. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana, (1997).
 - Ganju A, Yallapu M.M, Khan S, Behrman S.W, Chauhan S.C, Jaggi M. (2014) Nanoways to overcome docetaxel resistance in prostate cancer. *Drug Resist Updat*. 17(1-2):13-23.
 - Gartrell B.A. and Saad F. (2015). Abiraterone in the management of castration-resistant prostate cancer prior to chemotherapy. *Ther Adv Urol*. 7(4):194-202.
 - Geisler, C., Gaisa, N.T., Pfister, Fuessel, S., Kristiansen, G., Braunschweig, T., Gostek, S., Beine, S., Diehl, H.C., Jackson, A.M., Borchers, C.H., Heidenreich, A., Meyer, H.E., Knüchel, R., Henkel C. (2015). Identification and Validation of Potential New Biomarkers for Prostate Cancer Diagnosis and Prognosis Using 2D-DIGE and MS. *BioMed Research International*., 454256.
 - GLOBOCAN (2012). Estimated cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012: International Agency for Research on Cancer. Recuperado de http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx [consultado el 2 de agosto de 2016].
-

-
- Green M. Virus ADN: Replicación, expresión del gene tumoral y papel en el cáncer humano. Seminarios de Oncología 103-125. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 1977.
 - Grover S.A., Zowall H., Coupal L. (1999). Prostate Cancer: The economic Burden. CMAJ; 160(5).
 - Handy CE, Antonarakis ES. (2017). Sipuleucel-T for the treatment of prostate cancer: novel insights and future directions. Future Oncol. Dec 20.
 - Heidenreich A., Bolla M., Joniau S., Mason M.D., Matveev V., Mottet M., Schmid H-P, Vander Kwast T.W., Wiegel T., Zattoni F. (2010). Guía clínica sobre el cáncer de prostate, © European Association of Urology. Pp. 201.
 - Hodgson TA. (1983). The state of the art of cost-of-illness estimates. Adv Health Econ Health Serv Res; 4: 129-64.
 - Hotaling JM, Laufer N, Rosenwaks Z. (2018) Introduction: Cancer biomarkers and fertility. Fertil Steril. 109(1):4-5.
 - Iwasawa A, Nieminen P, Lehtinen M, Paavonen J. (1996). Human papillomavirus DNA in uterine cervix squamous cell carcinoma and adenocarcinoma detected by polymerase chain reaction. Cancer; 77(11):2275-2279.
 - James ND, Spears MR, Clarke NW, Dearnaley DP, De Bono JS, Gale J, Hetherington J, Hoskin PJ, Jones RJ, Laing R, Lester JF, McLaren D, Parker CC, Parmar MKB, Ritchie AWS, Russell JM, Strebel RT, Thalmann GN, Mason MD, Sydes MR. (2015). Survival with newly diagnosed metastatic prostate cancer in the “Docetaxel Era”: data from 917 patients in the control arm of the STAMPEDE Trial (MRCPR08, CRUK/06/019). Eur Urol.;67 p1028–1038.

-
- Jeronimo C., Bastian P.J., Bjartell A., Carbone G.M., Gatto J.W., Clark S.J. Henrique R, Nelson W.G., Shariat S.F. (2011). Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance. *Eur Urol*; 60(4):753-766
 - Karandish F, Froberg J, Borowicz P, Wilkinson JC, Choi Y, Mallik S. (2017). Peptide-targeted, stimuli-responsive polymersomes for delivering a cancer stemness inhibitor to cancer stem cell microtumors. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 24; 163:225-235.
 - Karrich J.J., Jachimowski L.C., Libouban M., Lyster A., Taanman-Kueter E.W., et al. (2013). MicroRNA-146a regulates survival and maturation of human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*; 122(17):3001-3009.
 - Kass-Iliyya A, Jovic G, Murphy C, Fisher C, Syndikus I, Jose C, Scrase CD, Graham JD, Nicol D, Sydes MR, Dearnaley D. (2018). Two years Postradiotherapy Biopsies: Lessons from MRC RT01 Trial. *Eur Urol*. Jan 4.
 - Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem*. Jun 4; 285(23):17442-52.
 - Laird PW. (1997). Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Mol Med Today*, 3(5):223-229.
 - Laxman, B.; Morris, D.S.; Yu, J.; Siddiqui, J.; Cao, J.; Mehra, R.; Lonigro, R.J.; Tsodikov, A.; Wei, J.T.; Tomlins, S.A.; (2008). A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res*. 68, 645–649.
 - León J, Guerrero I, Pellicer A. (1988). Activación de los oncogenes por radiación y agentes químicos. *Investig Cienc* 1988;143:20-34
 - Li X.L., Luo Q.F., Wei C.K., Li D.F., Li J., Fang L. (2014). MiRNA-107 inhibits proliferation and migration by targeting CDK8 in breast cancer. *Int J Clin Exp Med* 7(1):32-40
-

-
- Lian F, Sharma NV, Moran JD, Moreno CS. (2015). The biology of castration-resistant prostate cancer. *Curr Probl Cancer*. 39 p17–28.
 - Lin and Gregor. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer *Nature reviews cancer* 15, 321 – 333.
 - Lodes MJ, Caraballo M, Suciú D, Munro S, Kumar A, Anderson B. (2009). Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One*, 4:7.
 - López T., Silva D., López S. y Arias C., RNA de interferencia: el silencio de los genes. *Biotecnología V14 CS3.indd* 109.
 - Lu J., Getz G. Miska E.A., Alvarez-Saavedra E., Lamb J., Peck D., Sweet-Cordero A., Ebert B.L., Mak R.H., Ferrando A.A., Downing J.R., Jacks T., Horvitz H.R. & Golub T.R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435(9): 834 – 838.
 - Maebayashi T., Abe K., Aziawa T., Sakaguchi M., Ishibashi N., Fukushima S., Honma T, Kusumi Y, Matsui T, Kawata N (2015). Solitary pulmonary metastasis from prostate cancer with neuroendocrine differentiation: a case report and review of relevant cases from the literature. *World J Surg Oncol*; 13:173
 - Maemura K, Natsugoe S, Takao S. (2014) Molecular mechanism of cholangiocarcinoma carcinogenesis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci*. 21(10):754-60.
 - Mao X., Zhang Y., Xie F., Zheng X., Sun J. (2017) Can peripheral blood be used as surrogate in detecting epidermal growth factor receptor mutation status in advanced non-small cell lung cancer patients? A meta-analysis. *Oncotarget*. 8:78057-78067.
 - Márquez H.J.C, Rojas B.L., Ávila A.N., Pacheco G.C. y Calderón F.F. (2005). El costo del cáncer de próstata. *Rev Mex Urol*; 65(5): 307 – 311.
-

-
- Menez R., Michel S., Muller B.H., Bossus M., Ducancel F., Jolivet-Reynaud C. Stura E.A. (2008).Crystal structure of a ternary complex between human prostate-specific antigen, its substrate acyl intermediate and an activating antibody. *J. Mol. Biol.* 376:1021-1033.
 - Mitchell P.S., Parkin R.K., Kroh E.M., Fritz B.R., Wyman S.K., Pogosova-Agadjanyan E.L., Peterson A., Noteboom J., O'Briant K.C., Allen A., Lin D.W., Urban N., Drescher C.W. , Knudsen B.s., Stirewalt D.L., Gentelman R., Vessella R.L.,Nelson P.S., Martin D.B. Tewari M. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-basel markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 10513 – 10518.
 - Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105:10513–8.
 - Mittelbrunn M, Gutiérrez-Vázquez C, Villarroya-Beltri C, González S, Sánchez-Cabo F, González MÁ, Bernad A, Sánchez-Madrid F. (2011). Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.* 2:282.
 - Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalhorn TF, Higano CS, True LD, Nelson PS. (2008). Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. *Cancer Res*, 68(11): 4447-54.
 - Moore R, Mao Y, Zang J and Clarke K. (1997). Economic burden of illness in Canada, 1993. Ottawa: Health Canada.
 - Narod SA. (1997). Hereditary Breast Carcinoma Syndromes. Workshop on Heritable Cancer Syndromes and Genetic Testing. Supplement to Cancer; 537-541.
-

-
- NCI (National Cancer Institute). Prostate Cancer Treatment. Health professionals,
<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/prostate/HealthProfessional>. consultado el 3 de noviembre de 2017.
 - NICE (National Institute for Health and Clinical Excellence). Abiraterone for castration-resistant metastatic prostate cancer previously treated with a docetaxel-containing regimen.
<http://www.nice.org.uk/nicemedia/live/13484/59217/59217.pdf>. Consultado el 3 de noviembre de 2017.
 - Ng A.T. and Tam P.C. (2014). Current status of robot-assisted surgery. Hong Kong Med J. Jun; 20(3):241-250.
 - Ohlmann CH, Jäschke M, Jaehnig P, Krege S, Gschwend J, Rexer H, Stöckle M. (2017). Abiraterone acetate plus LHRH therapy versus abiraterone acetate while sparing LHRH therapy in patients with progressive, metastatic and chemotherapy-naïve, castration-resistant prostate cancer (SPARE): study protocol for a randomized controlled trial. Trials. Oct 4;18(1):457.
 - Otnes B., Harvey S. Fossa S.D. (1995). The burden of prostate cancer from diagnosis until death. Br J Urol; 76: 587-94.
 - Parkin D.M., Bray F., Ferlay J. Pisani P. (2005) Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J Clin. 55: 74 – 108.
 - Pegtel D. M., Cosmopoulos K., Thorley-Lawson D. A., Van Eijndhoven M. A., Hopmans E. S., Lindenberg J. L., de Gruijlc T.D., Würdinger T., and Middeldorp M.J. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 107, 6328–6333
 - Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. (2010). Selective release of microRNA species
-

-
- from normal and malignant mammary epithelial cells. PLoS One. Oct 20; 5(10):e13515.
- Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM. (Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells.
 - Porkka K.P., Pfeiffer M.J., Waltering K.K., Vessella R.L., Tammela T.L.J., Visakorpi T. (2007). Expression profiling in prostate cancer. Cancer Res 67:(13) 6130 – 6135
 - Radman, W. R. (1988). Fidelidad de la duplicación del ADN. Investig Cienc. 145:20-30.
 - Rizo R.P., González R.A., Sánchez C.F. Murgía M.P. (2015). Tendencia de la mortalidad por cáncer en México: 1990 – 2012. Evid Med Invest Salud 8 (1): 5-15.
 - Romero MP. (1993). Cáncer y Metástasis, relación con radicales libres. Oncología 3(3):79-94
 - Ryan CJ Smith MR, Bono JS, Molina A, Logothetis CJ, de Souza P, Fizazi K, Mainwaring P, Piulats JM, Ng S, Carles J, Mulders PF, Basch E, Small EJ, Saad F, Schrijvers D, Van Poppel H, Mukherjee SD, Suttman H, Gerritsen WR, Flaig TW, George DJ, Yu EY, Efsthathiou E, Pantuck A, Winquist E, Higano CS, Taplin ME, Park Y, Kheoh T, Griffin T, Scher HI, Rathkopf DE; (2013). Abiraterone in metastatic prostatic cancer previous chemotherapy. N Engl J Med. Jan 10; 368(2): 138-48
 - San Martin R, Pathak R, Jain A, Jung SY, Hilsenbeck SG, Piña-Barba MC, Sikora AG, Pienta KJ, Rowley DR. (2017). Tenascin-C and Integrin $\alpha 9$ Mediate Interactions of Prostate Cancer with the Bone Microenvironment. Cancer Res. Nov 1;77(21):5977-5988.
-

-
- Schröder FH. (2008). Progress in understanding androgen-independent prostate cancer (AIPC): a review of potential endocrinemediated mechanisms. *Eur Urol.* 53(6): 1129-37.
 - Secretaría de Salud, México. Reportes del INEGI, www.ssa.gob.mx, consultado el 5 de Marzo de 2017
 - Secretaría de Salud. (2001). Programa de acción: cáncer de próstata. México: Secretaría de Salud.
 - Sharma P., Saraya A., Gupta P., Sharma R. (2013). Decreased levels of circulating and tissue miR-107 in human esophageal cancer. *Biomarkers*, 18(4): 322–330.
 - Song N., Ma X., Li H., Zhang Y., Wang X., Zhou P., Zhang X. (2015). microRNA-107 functions as a candidate tumor suppressor gene in renal clear cell carcinoma involving multiple genes. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 1-11.
 - Skog J, Würdinger T, van Rijn S, Meijer DH, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry WT Jr, Carter BS, Krichevsky AM, Breakefield XO. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol.* Dec; 10(12):1470-6
 - Smith RA1, von Eschenbach AC, Wender R, Levin B, Byers T, Rothenberger D, Brooks D, Creasman W, Cohen C, Runowicz C, Saslow D, Cokkinides V, Eyre H. (2001) American Cancer Society. Guidelines of the early detection of cancer: update of early detection. Guidelines for prostate, colorectal and endometrial cancers. *CA Cancer J Clin*; 51:38-75.
 - Stückerath I., Rack B., Janni W., Jäger B, Pantel K. Schwarzenbach H. (2015). Aberrant plasma levels of circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a are associated with lymph node metastasis and receptor status of breast cancer patients. *Oncotarget* 6(15) 13388 – 13401.
-

-
-
- Sweeney CJ, Chen YH, Carducci M, Liu G, Jarrard DF, Eisenberger M, Wong YN, Hahn N, Kohli M, Cooney MM, Dreicer R, Vogelzang NJ, Picus J, Shevrin D, Hussain M, Garcia JA, DiPaola RS. (2015). Chemohormonal therapy in metastatic hormone-sensitive prostate cancer. *N Engl J Med.* 373 p737–476
 - Beer T.M., Armstrong A.J., Rathkopf D.E., Loriot Y., Sternberg C.N., Higano C.S., Iversen P., Bhattacharya S., Carles J, Chowdhury S., Davis I.D., de Bono J.S., Evans C.P., Fizazi K., Joshua A.M., Kim C., Kimura G., Mainwaring P., Mansbach H., Miller K., Noonberg S.B., Perabo F., Phung D, Saad F., Scher H.I., Taplin M.E., Venner P.M., Tombal B., (2014) Enzalutamide in Metastatic Prostate Cancer before Chemotherapy. *N Engl J* 371:5 424 – 433.
 - Takahashi Y., Forrest A.R.R., Maeno E., Hashimoto T., Daub C.O., Yasuda J. miR-107 and MiR-185 can Induce Cell Cycle Arrest in Human Non Small Cell Lung Cancer Cell Lines. *PloS ONE*4(8) e6677.
 - Taylor CD, Elson P, Trump DL. (1993). Importance of continued testicular suppression in hormone-refractory prostate cancer. *J Clin Oncol*, 11(11): 2167-72.
 - Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* Jun; 9(6):654-9.
 - Velonas V.M., Woo H.H., dos Remedios C.G., S.J. Assinder. (2013). Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int. J. Mol. Sci.* 14, 11034-11060.
 - Wang Z.H. Guo X.Q., Zhang Q.S., Zhang J.L., Duan Y.L., Li G.F., Zheng D.L. (2016). Long non-coding RNA CCAT1 promotes glioma cell proliferation via inhibiting microRNA-410. *Biochem. and Biophy. Res. Comm.* 480, (4): 715-720.
-
-

-
- Werneburg GT, Kongnyuy M, Halpern DM, Salcedo JM, Chen C, LeSueur A, Kosinski KE, Schiff JT, Corcoran AT, Katz AE. (2017). Effects of Focal Versus Total Cryotherapy and Minimum Tumor Temperature on Patient-Reported Quality of Life as Compared to Active Surveillance in Prostate Cancer Patients. *Urology*. Dec 22.
 - Wulfkuhle J.D., Lance A. Petricoin E. (2003) Proteomic applications for the early detection of cancer. *Cancer*. 3: 267 – 275.
 - Xie, C.; Kim, H.J.; Haw, J.G.; Kalbasi, A.; Gardner, B.K.; Li, G.; Rao, J.; Chia, D.; Liong, M.; Punzalan, R.R.; (2011). A novel multiplex assay combining autoantibodies plus PSA has potential implications for classification of prostate cancer from non-malignant cases. *J. Transl. Med*. 9, 43.
 - Xu X.H., Li D.W., Feng H., chen H.M. Song Y.Q., (2015). miR-300 regulates the malignancy of breast cancer by targeting P53. *Int J Clin Exp Med*; 8(5):6957-6966.
 - Yi, R., Y. Qin, Macara I.G., Cullen B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17(24).
 - Zhang J., Wang C.Y., Hua L., Yao K.H., Chen J.T., Hu J.H. (2015) miR-107 promotes hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting Axin2. *Int J Clin Exp Pathol* 8(5):5168-5174.
 - Zhang L, Ma P, Sun L, Han Y, Li B, Mi X, Wang E, Song M. (2016). mir-107 down-regulates *siah1* expression in human breast cancer cells and silencing of mir-107 inhibits tumor growth in a nude mouse model of triple-negative breast cancer. *Mol Carcinogen* 55:768–777.
 - Zhang Z., Zhang L, Yin Z.Y., Fan X.Y., Hu –B., Wang L.Q., Zhang D., (2014). miR-107 regulates cisplatin chemosensitivity of A549 non small cell

lung cancer cell line by targeting cyclin dependent kinase 8. *Int J Clin Exp Pathol* 7(10):7236-7241.

- Zhou C., Li G., Zhou J., Han N., Liu Z., Yin J. (2014). *Plos ONE* 9(11) e111860 1-10.