

EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

**JORGE LUIS MENDEZ DÍAZ
MAYERLIS CATINA MONCALEANO ROSADO**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA
2017**

EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CÁNCER DE PRÓSTATA

**JORGE LUIS MENDEZ DÍAZ
MAYERLIS CATINA MONCALEANO ROSADO**

Tesis de grado como requisito para optar al título de MÉDICO

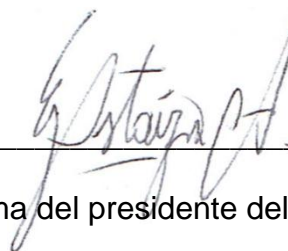
Asesores

**MANUEL GARCÍA FLOREZ
Dr. En ciencias biológicas**

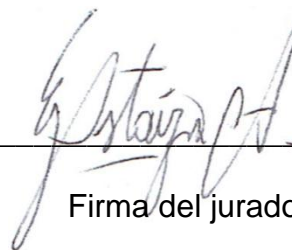
**GILBERTO ASTAIZA
Dr. En salud pública, esp. epidemiología**

**UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA
2017**

Nota de aceptación



Firma del presidente del jurado



Firma del jurado

Neiva, 22 de Septiembre de 2017

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	9
1. ANTECEDENTES	10
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA	13
2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA	14
3. JUSTIFICACIÓN	15
4. OBJETIVOS	16
4.1 OBJETIVO GENERAL	16
5. MARCO TEÓRICO	17
6. HIPÓTESIS	25
7. OPERALIZACIÓN DE VARIABLES	26
8. DISEÑO METODOLÓGICO	27
8.1 TIPO DE ESTUDIO	27
8.2 LUGAR	27
8.3 POBLACIÓN Y MUESTRA	27
8.4 TÉCNICAS	27

8.5 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	28
8.5.1 Análisis de la expresión de microRNAs y RNAm DE RA.....	28
8.5.2 Extracción de RNA y miRNA.....	28
8.5.3 Transcripción reversa (RT).	29
8.5.4 Amplificación del RNAm y microRNA.	29
8.5.5 Análisis de la expresión de microRNA por PCR en tiempo real cuantitativo.	30
8.6 INSTRUMENTO.....	30
8.7 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS	30
8.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS	31
9. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	32
10. DISCUSIÓN	35
11. CONCLUSIÓN	37
BIBLIOGRAFIA.....	38
ANEXOS.....	44

LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Operalización de variables.....	26
Tabla 2. Características demográficas, clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con cáncer de próstata usados en el estudio.....	32
Tabla 3. Caracterización individual de muestras patológicas significativas.	34

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Vías principales de acción hormonal en la glándula prostática.....	19
Figura 2. Biogénesis de los microRNAs y de su actividad sobre el RNA mensajero.	22
Figura 3. Resultados de la expresión génica	33

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A. Prueba piloto	45
Anexo B. Display options	46
Anexo C. Instrumento	47

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata ha aumentado la incidencia de forma acelerada en todo el mundo, y es una patología con gran mortalidad si no se trata adecuada y oportunamente, afecta la calidad de vida de quien lo padece y genera grandes gastos en el sector salud, por eso la importancia de realizar estudios orientados al conocimiento de los distintos factores que comprende el cáncer prostático; razón por la cual el siguiente estudio está direccionado a establecer la relación existente entre la sobre y subexpresión de diferentes microRNA, relacionados con la severidad del cuadro clínico en los pacientes con cáncer de próstata.

Esta investigación busco identificar las alteraciones de expresión de los microRNA en los diferentes grupos de riesgo de cáncer de próstata, correlacionar los patrones de expresión de esos microRNA con la evolución de la neoplasia, analizando la recidiva bioquímica en pacientes que fueron tratados con prostatectomía radical.

Se aplicó un estudio observación al descriptivo, donde a partir del análisis molecular de las muestras de las biopsias de próstata se hizo una amplificación del miARN. Donde evidenciamos Una sobre y subexpresión de los miRNA en relación a la evolución de la neoplasia en pacientes según su respectivo grupo de riesgo. De esta manera podría ser implementada como futura ayuda para diagnóstico precoz de Ca prostático y encaminar un adecuado tratamiento.

1. ANTECEDENTES

El cáncer de próstata es el tipo de cáncer más común entre los hombres en Colombia. Según estimativos, se calcula que en el 2015 habrá cerca de 6.500 nuevos casos de pacientes con esta enfermedad y que alrededor de 3.000 hombres morirán por esta causa en nuestro país.

El cáncer de próstata es la segunda principal causa de muerte por cáncer en los hombres colombianos y sólo la sobrepasa el cáncer gástrico. Su índice de mortalidad está aumentando y se ha triplicado en los últimos 30 años.

Los hombres con antecedentes familiares, fumadores, obesos o de raza negra son algunos grupos con factores de riesgo que se deben tener en cuenta. En Colombia de cada cuatro tumores que se detectan en la próstata, tres se encuentran en estado avanzado y con serias posibilidades de desarrollar cáncer.

Los microARNs (miRNAs) son una clase abundante de pequeños RNAs no codificantes de proteínas que funcionan como reguladores de genéticos negativos (Hutvagner et al. 2001; Ketting et al. 2001). Regulan diversos procesos biológicos, y datos biológicos indican que cada miARN puede controlar cientos de genes blanco, subrayando la influencia potencial de los miRNAs en casi todas las vías genéticas. Evidencia ha demostrado que las mutaciones de los genes de miARN o mala expresión de estos se correlacionan con varios cánceres humanos e indica que los miRNAs pueden actuar como supresores de tumores y oncogenes. miRNAs se han demostrado como supresores de la expresión de genes importantes relacionadas con el cáncer y podría resultar útil en el diagnóstico y tratamiento del cáncer. (Ketting et al. 2001).

Solo una pequeña fracción de las funciones biológicas de estas moléculas se conoce actualmente. Estos miRNAs regulan procesos relacionados con el cáncer, como el crecimiento celular y la diferenciación tisular, y por lo tanto podrían, ellos mismos funcionar como oncomiARNs. Por ejemplo, los miRNAs que están codificados por los LIN-4 y LET-7 controlan la diferenciación y proliferación celular en *C. elegans*. Las mutaciones de estos genes en *C. elegans* conducen a anomalías en la salida del ciclo celular y la diferenciación terminal, que son características que se encuentran en las células del cáncer. Curiosamente, los homólogos mamíferos de LIN-4 y LET-7 controlan la proliferación celular en líneas celulares humanas y también se asocian con varios tipos de cáncer (Karube et al, 2005).

Se ha demostrado que componentes de la síntesis de microARN están implicados en la tumorigénesis. La expresión de DICER en cáncer de pulmón esta disminuida. Los niveles de expresión de ARN de DICER y DROSHA en muestras de cáncer pulmonar de células “no pequeñas”. Ellos encontraron que la expresión reducida de

DICER se correlacionaba con menor supervivencia post-operatorio, lo que indica que Dicer podría ser capaz de prevenir la transformación del tejido pulmonar. (Karube et al, 2005)¹.

El primer indicio de que los miRNAs podrían funcionar como supresores tumorales provino de un informe de *Calin et al.* que demostró que los pacientes que fueron diagnosticados con una forma común de leucemia en adultos, leucemia linfocítica crónica de células B (CLL), a menudo tienen supresiones o regulación a la baja de dos genes miARN agrupados, mir-15a y mir-16-1. Las deleciones dentro de los locus 13q14 ocurren en más de 65 % de los casos en CLL, así como en 50 % de los linfomas de células de manto, 16-40% de los mielomas múltiples y 60 % de los cánceres de próstata (Kanellopoulou et al, 2005)².

Un informe reciente mostró que los miR-15a y miR-16-1 regulan negativamente al BCL2, que es un gen anti - apoptótico que a menudo se sobreexpresa en muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo leucemias y linfomas (Cimmino et al, 2005)³. Por lo tanto, se cree que la supresión o regulación a la baja de los miR-15a y miR- 16-1 resultan en el aumento de expresión de BCL2, la promoción de la leucemogénesis y linfomagénesis en las células hematopoyéticas.

Análisis por Northern –blot, han sido útiles en la determinación de "firmas" de genes miARN en tejidos específicos de humanos. Los diferentes perfiles de expresión de los genes miARN que se han observado en ciertos de órganos subrayan la importancia de miRNAs en el mantenimiento de las células madre y en la dirección de la diferenciación de ciertos tipos de células durante el desarrollo^{4, 5}. Los investigadores están utilizando firmas de miARN de expresión para clasificar los cánceres y definir marcadores miARN que podrían predecir pronóstico favorable.

En un informe reciente encontraron que para analizar los perfiles de expresión de algunos miRNAs (~ 200 genes), tenían que clasificar con precisión los cánceres humanos⁶. Este grupo diseñó un nuevo método, que se basa en la citometría de flujo con perlas, para estudiar la expresión de miRNAs tanto en tejidos normales como cancerosos. Los tumores que se originaron a partir de diversos tejidos se agruparon únicamente sobre la base de sus perfiles de expresión de genes miARN. Esto dio lugar a los tumores se agrupan de acuerdo a su linaje embrionario. Por ejemplo, los tumores de origen endotelial como el de colon, hígado, páncreas y el estómago se agruparon juntos, y tumores de origen hematopoyético también se agruparon juntos. Curiosamente, cuando se analizaron los perfiles de expresión de unos 16.000 genes de codificación de proteínas de ARNm en el mismo conjunto de tumores, la agrupación jerárquica fue incapaz de agrupar los tumores de una manera coherente, por ejemplo, tumores gastrointestinales podrían no estar agrupados. Por lo tanto, las firmas de miARN en tumores reflejan su historia evolutiva, una hipótesis que es compatible con la evidencia de que las funciones directas del desarrollo en tejidos específicos mediada por miRNAs.

Estos investigadores también compararon los perfiles de expresión de genes miARN de muestras tumorales en comparación con el tejido normal y se encontró que 129 de 217 miRNAs tenían un menor nivel de expresión en tumores independientemente del tejido de origen⁶.

Por lo tanto, en un sentido global, los miRNAs podría funcionar para conducir las células a un estado más diferenciado, y los perfiles de expresión de miRNAs en los tumores en comparación con los tejidos normales podría representar el grado de diferenciación en esas células. Estos estudios establecen a los miRNAs como "oncomiRs" e implican que las anomalías en la expresión de miRNA podrían resultar directamente en la indiferenciación de las células, lo que permite la formación de tumores.

Se han desarrollado métodos diseñados para seleccionar los genes miARN que controlan específicamente procesos relacionados con el cáncer, como la proliferación celular y la apoptosis. En el futuro, la administración de oligonucleótidos antisentido sintéticos que codifican secuencias que son complementarias para madurar miRNAs oncogénicos -llamados oligonucleótidos anti-miARN (AMOs) - podrían inactivar efectivamente los miRNAs en los tumores y frenar su crecimiento⁷.

En la clínica, la inactivación de los genes miARN se podría lograr a través de la administración frecuente o continua de 2'-O- metilo u oligonucleótidos bloqueadores de ácido nucleico antisentido, que están diseñados específicamente para ser más estables y menos tóxicos que otros tratamientos del cáncer con el fin de orientar la transformación de los miRNAs⁸.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 DESCRIPCIÓN DEL PROBLEMA

El cáncer de próstata (CaP) se considera uno de los problemas médicos más importantes a los que se enfrenta la población masculina. En Europa, el CaP es la neoplasia sólida más frecuente, con una incidencia de 214 casos por 1.000 varones, superando en número a los cánceres de pulmón y colorrectal. Además, el CaP constituye actualmente la segunda causa más frecuente de mortalidad por cáncer en los varones. Además, desde 1985, se ha producido un ligero aumento del número de muertes por CaP en la mayoría de las naciones, incluso en países o regiones en los que el CaP no es frecuente.

Sin embargo, según evidencia, el diagnóstico temprano de esta enfermedad es poco, a pesar del temor que esta patología causa, muchos prefieren evadir los exámenes de diagnóstico. Las razones son varias. A veces porque buena parte de la población mayor de 40 años no tiene cobertura médica y muchos porque aún consideran la prueba de tacto rectal es muy engorrosa. Los hombres que le huyen al examen tacto-rectal, están optando únicamente por la prueba de sangre (antígeno prostático) para determinar si hay afección. Sin embargo, está por sí sola no sirve para determinar si hay presencia de cáncer ya que en las etapas iniciales el paciente puede no manifestar síntomas.

Los miRNA son moléculas con una amplia función en diferentes vías moleculares, de expresión proteica y en mecanismos de degradación de proteínas, por lo cual

podrían tener un importante papel en el desarrollo de neoplasias de distintos órganos entre ellos la próstata.

En estudios anteriores se ha descrito la relación que tienen los diferentes niveles de miRNA con la progresión tumoral. Algunos actúan como supresores tumorales y otros como inductores tumorales, por ello la importancia de determinar los diferentes perfiles de expresión tempranamente en pacientes con riesgo de desarrollar Ca prostático. Teniendo los pacientes con perfiles supresores menor riesgo de desarrollar neoplasias agresivas, a diferencia de paciente con perfiles inductores, que podrían desarrollar neoplasias mucho más agresivas y presentar diversas complicaciones que incluyen la muerte.

Los microARN pueden contribuir como marcadores moleculares precisos para dilucidar alteraciones inducidas en periodos tempranos del desarrollo sobre la glándula prostática, siendo más precisos y menos invasivos. Se ha descrito la posibilidad de medir niveles séricos de microRNA específicos de tejido prostático, así se podrían identificar pacientes con riesgo elevado de tener complicaciones del cáncer prostático.

2.2 FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuál es la expresión de los miARN, la evolución tumoral y bioquímica del cáncer de próstata en biopsias de pacientes del HUHMP entre junio de 2015 a junio de 2016?

3. JUSTIFICACIÓN

Comúnmente los síntomas asociados a cáncer de próstata son urinarios como: dificultad para comenzar o detener el chorro, disuria, polaquiuria o hematuria. La mayoría de cáncer de próstata surge en la periferia prostática, lejos de la uretra por lo que los síntomas urinarios son de aparición tardía.

Los exámenes actuales para la detección de cáncer prostático son el tacto rectal y la ecografía transrectal, lamentablemente son exámenes invasivos y con una especificidad y sensibilidad bajas.

Otro examen, tal vez el de mayor importancia actualmente en el diagnóstico de cáncer de próstata es el antígeno prostático específico (PSA), este es específico del órgano pero no lo es tanto del cáncer. Factores como la prostatitis, infartos, manipulación de la próstata y la eyaculación elevan los niveles séricos de PSA. Además, entre el 20 y el 40% de los pacientes con cáncer de próstata tienen valores de PSA menores a 4ng/mL.

En general, los exámenes existentes para el diagnóstico de patologías prostáticas no son precisos. Una razón que merece ser resaltada, respecto al porqué de esta investigación, es el aporte de un método diagnóstico temprano y eficaz, al tener en cuenta los microARN como marcadores moleculares precisos para alteraciones en periodos tempranos del desarrollo sobre la glándula prostática.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Establecer la expresión de los micro-RNA, la evolución tumoral y bioquímico del cáncer de próstata en piezas patológicas de pacientes del HUHMP, entre junio de 2015 a junio 2016

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar las alteraciones de expresión de los microRNA-9 y microRNA-34 en los diferentes grupos de riesgo de cáncer de próstata.
- Caracterizar los patrones de expresión de microRNA con la evolución tumoral de la neoplasia.
- Analizar la recidiva bioquímica en pacientes que fueron tratados con prostatectomía radical.

5. MARCO TEÓRICO

LOS ANDRÓGENOS Y EL DESARROLLO DE LA GLÁNDULA PROSTÁTICA

Durante el desarrollo embrionario, una vez superada la fase ambisexual del desarrollo embrionario, el aumento de las concentraciones de testosterona en los fetos machos estimula la diferenciación y crecimiento celular de los tejidos dependientes de andrógenos. Uno de ellos, la próstata tiene origen con el surgimiento de cordones epiteliales a partir del seno urogenital (estructura de forma tubular derivada de la porción final del intestino posterior - SUG) en dirección al mesénquima circundante ^[1,2]. La comprobación de que esta inducción prostática es independiente del sexo genético, es demostrada cuando la formación de los cordones epiteliales se presenta en el SUG de hembras estimulada con andrógenos ^[3].

El proceso que sigue, la canalización y diferenciación de los cordones inicialmente formados, es igualmente dependiente de andrógenos ^[4, 5,6]. La testosterona (T) es el principal andrógeno producido por los testículos, que es reducido a su forma activa la dihidrotestosterona (DHT), por la enzima 5α -reductasa que es la responsable final por la morfogénesis prostática ^[7,8].

La diferenciación del epitelio prostático ocurre paralelamente a la maduración del estroma. Los andrógenos actúan, a través de sus receptores (RAs), en el mesénquima urogenital (MUG) para inducir la proliferación epitelial, ramificación ductal y diferenciación en los subtipos celulares basal y luminal ^[4,9]. A su vez, el epitelio prostático en desarrollo direcciona la diferenciación de la musculatura lisa ^[10]. Los dos compartimientos celulares son interdependientes y no consiguen desarrollarse en la ausencia del otro ^[11].

Otra acción de los andrógenos durante a organogénesis es la reducción de la capa de músculo liso presente en el SUG. En las hembras la espesura mayor de esta capa, determinada por la ausencia de andrógenos, evita la interacción epitelio estroma necesaria para que la inducción prostática ocurra ^[12].

En el periodo posnatal, el crecimiento es también dependiente de andrógenos y la castración, realizada en roedores recién nacidos, evita el crecimiento y el desarrollo de la próstata durante la pubertad, un efecto que puede ser revertido con la administración de testosterona ^[4,13].

De acuerdo con el estadio de desarrollo, la próstata responde de forma diferente al estímulo hormonal ^[11]. En el periodo neonatal, este promueve principalmente ramificación ductal ^[14]. En la pubertad, las concentraciones de andrógenos elevados estimulan el aumento del peso seco de la glándula, acompañado de un pequeño aumento de las ramificaciones epiteliales ^[15]. Ya en etapas de senescencia, el

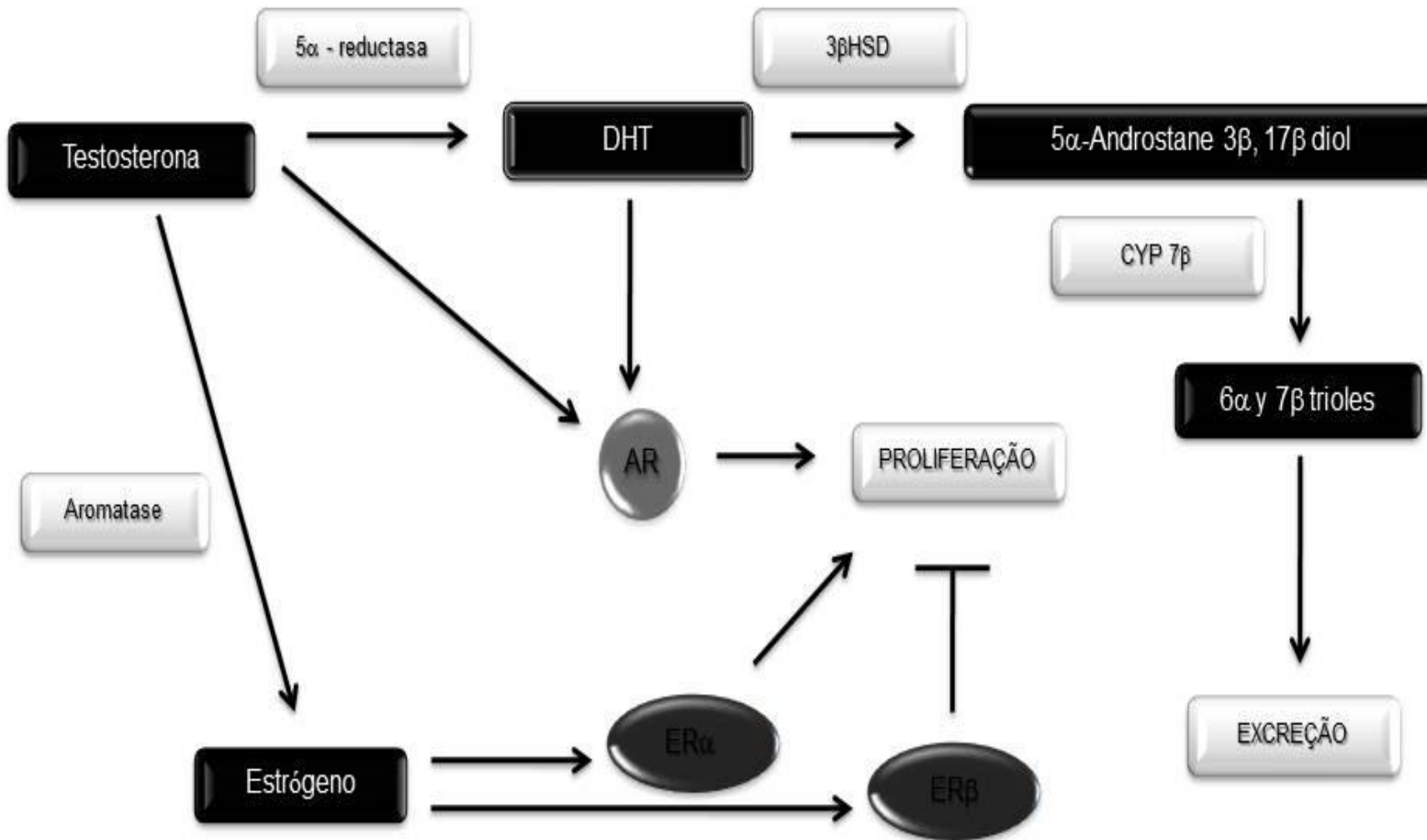
hipogonadismo asociado a la vejez desequilibra el control del eje hipófisis-hipotálamo-gónadas, estableciendo un nuevo ambiente hormonal que induce alteraciones morfológicas en la glándula. Estas alteraciones hormonales son caracterizadas por el aumento en la concentración de gonadotrofinas y disminución en las concentraciones circulantes de testosterona lo que lleva a la pérdida del balance entre estrógeno/testosterona [16].

ENDOCRINOLOGÍA PROSTÁTICA

La conversión de T en el más potente andrógeno intracelular, la 5α -dihidrotestosterona (DHT), se presenta por la acción de la enzima 5α -reductasa. Dos tipos han sido identificados, la 5α -reductasa tipo I presente en la mayoría de los tejidos, y la 5α -reductasa tipo II codificada por el gen SRD5A2, localizado en el cromosoma 2p23 [17], y predominante en órganos genitales, incluyendo la próstata. El tratamiento de pacientes portadores de patologías andrógeno dependientes prostáticas es hecho con el uso de medicamentos que afectan la interacción andrógeno-receptor. Por ejemplo, la finasterida es un inhibidor específico de la 5α -reductasa tipo II que ha sido usada para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna (BPH). Estudios demuestran que con su uso las concentraciones séricas de DHT disminuyen un 70%, y en la próstata entre el 85 y 90% [18]. La cantidad remanente de DHT en la próstata puede ser atribuida a la acción de la enzima tipo I.

La DHT intracelular es rápidamente metabolizada en una reacción reversible para 3α , 17β -androstenediol (3α -diol), o para 3β , 17β -androstenediol (3β Adiol). La enzima responsable por esta vía de inactivación es la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Tipo II (3β -HSD). El 3β Adiol es finalmente convertido irreversiblemente en esteroides inactivos hidrosolubles, por la acción de la 3β Adiol Hidroxilasa (CYP7B1) [19] (Figura 1).

Figura 1. Vías principales de acción hormonal en la glándula prostática



Fuente: García Flórez M., Oliveira CA., Carvalho HF. (2005)

Hormonas como la testosterona e DHT se unen específicamente a su receptor estimulando la proliferación celular. Los estrógenos también están presentes en la glándula producidos a través de la aromatización de la testosterona y tienen diferentes efectos [20].

ANDRÓGENOS Y CÁNCER DE PRÓSTATA

Con base en los trabajos clásicos de Huggins y Hughes, en los cuales fue comprobada la dependencia androgénica de la próstata, el tratamiento a seguir, en pacientes con cáncer, fue el bloqueo de estas vías [21]. En algunos casos el tratamiento resulta adecuado, en otros la neoplasia adquiere independencia androgénica y aun en concentraciones basales de la hormona, el nivel de expresión del RA y de sus genes blanco es mantenido, fenómeno verificado con el aumento de la concentración del antígeno específico prostático (PSA) [22].

En el cáncer *hormono refractario* la acción de los andrógenos puede verse promovida por alteraciones en la secuencia y en la estructura del RA, también la pérdida de especificidad con sus ligandos puede activarlo a través de vías de señalización paralelas, que actúan directamente en los complejos de transcripción. Es probable que el RA sea el punto donde convergen varios factores de regulación y transcripción que tiene como blanco elementos responsivos en el ADN. La castración provoca la caída en las concentraciones de T y DHT que en condiciones normales son los más potentes activadores del RA, pero en el cáncer de próstata otras vías de señalización sustituyen ese proceso fisiológico convirtiéndose en los principales en los estados avanzados de la enfermedad [22].

EL RECEPTOR DE ANDRÓGENO EN EL CÁNCER DE PRÓSTATA

En el cáncer de próstata *hormono refractario* la respuesta del RA es alterada o inexistente, y la terapia hormonal no consigue inhibir la progresión de la enfermedad. De los linajes celulares derivadas de metástasis de cáncer de próstata ni DU145 ni PC3, expresan RA. La primera fue obtenida de metástasis ósea, y la última establecida a partir de metástasis del SNC [26,27]. Por otro lado, la célula LNCaP fue obtenida a partir de metástasis linfonodal de un carcinoma hormono-sensible y presenta es RA positiva [28].

A través de marcadores específicos varios estudios han mostrado directamente en el tejido, la localización del RA en el cáncer con metástasis y no en el cáncer *hormono resistente* [29].

Por otro lado, en CWR22 un modelo xenográfico de tumor de próstata, las concentraciones de RNAm y proteína de RA permanecen constantes, a pesar de tratarse de un carcinoma hormono-independiente [30]. Diferentes mutaciones se asocian a la unión inespecífica del RA, lo que aumenta el número de ligandos que pueden regular su activación en el cáncer. La célula LNCaP, posee una mutación

en el codón 877, dada por la alteración del aminoácido treonina por la alanina, que altera la selectividad del RA haciendo posible su interacción con otros esteroides [31]. En el cáncer de próstata localizado, se identificó una mutación en el codón 730, que permite la unión del RA con los esteroides adrenales [32]. En el cáncer avanzado numerosas mutaciones han sido documentadas, el cambio del aminoácido valina en la posición 715 o 730 por el aminoácido metionina, permite la proliferación celular, inducida por el RA, con concentraciones mínimas de andrógenos [33].

Estas observaciones sugieren que las mutaciones iniciales en el RA están asociadas con el proceso de selección de las células cancerosas, mientras que las mutaciones posteriores promueven la independencia hormonal. Con el descubrimiento de los microRNA, se amplía el panorama de la acción del RA en el cáncer de próstata. Diferentes estudios han mostrado que existe una regulación del RA por diferentes miRNAs.

MICRORNAS

Los micro RNA (miRNA) son una clase de RNA no codificante que tienen el papel fundamental en el control de la expresión de genes [34], promueven el silenciamiento postranscripcional por el apareamiento específico con el RNAm promoviendo su degradación [35].

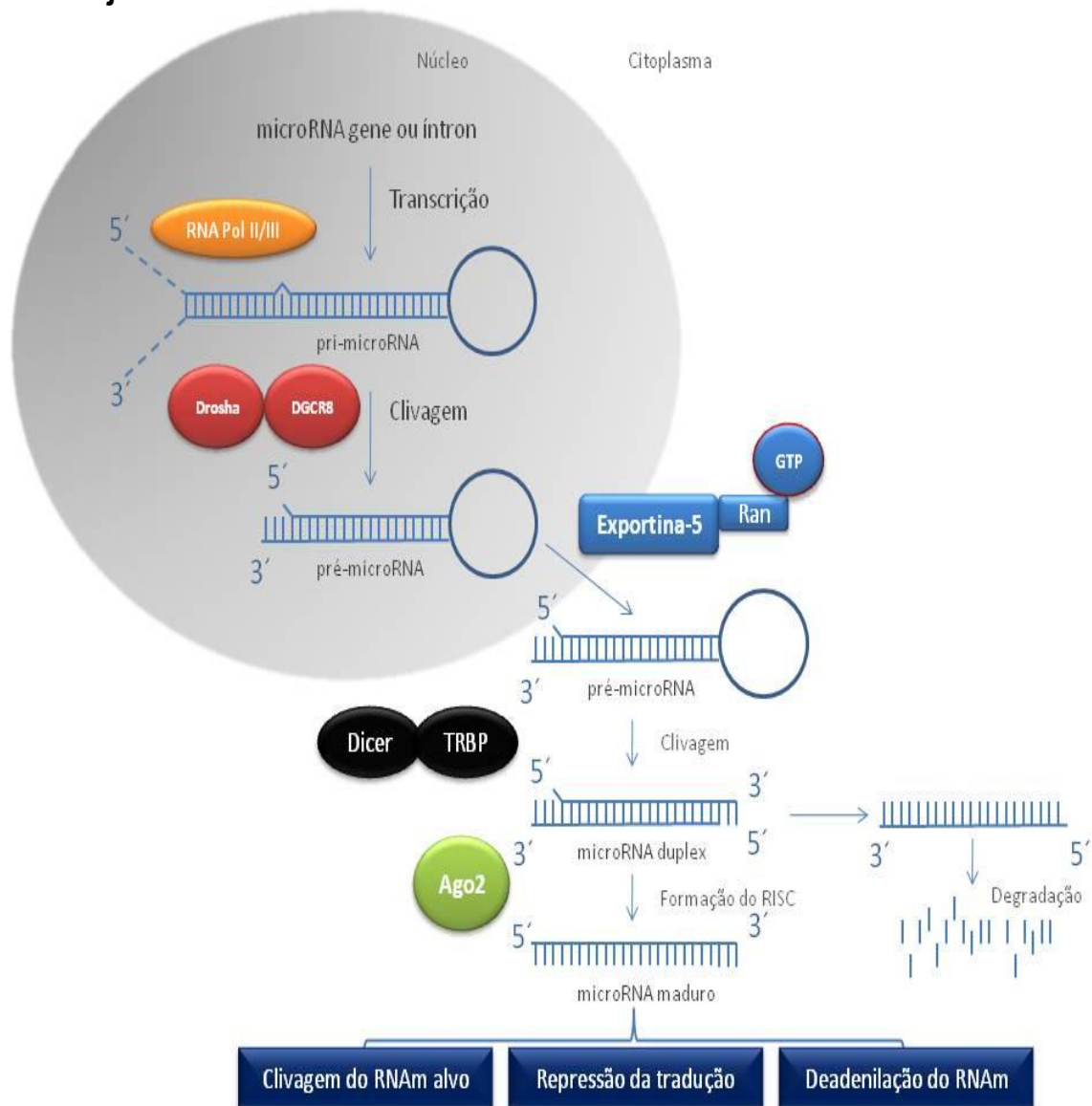
Se estima que un tercio de los genes son regulados por los miRNA, actúan así como reguladores de diversos procesos como el desarrollo [36], proliferación, muerte celular [37], apoptosis, metabolismo de lípidos [38], diferenciación celular [39,40], y desarrollo del sistema nervioso [41]. Actualmente anomalías en la expresión de miRNA han sido relacionadas al desarrollo de neoplasias como leucemias, linfomas [42, 43,44] y carcinomas incluyendo el de próstata [45]

BIOGÉNESIS DE LOS micrnas

Los pre-miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II, poseen entre 60 y 110 nucleótidos y forman estructuras del tipo *hairpin* [46]. El proceso inicial del pre-miRNA es dado por la enzima Drosha (endonucleasa RNase III), este clivaje inicial define el correcto registro dentro del miRNA precursor y define las terminaciones maduras del miRNA. Un reconocimiento inicial de la estructura *loop* del miRNA precursor es hecho por la enzima Drosha [47,48]. Una vez clivado, el pre-miRNA es transportado activamente del núcleo para el citoplasma por la Exportina-5 [49]. Ya en el citoplasma la enzima Dicer (RNase III) reconoce la porción de la doble hélice del pre-miRNA con afinidad específica y lleva al clivaje del *loop* en el extremo de la molécula convirtiéndola en un dúplex de secuencias menores de 19 a 21 nucleótidos [50]. Posterior al clivaje, el miRNA se integra con el Complejo Silenciador Inducido por RNA (RISC), llevando a la regulación negativa de la expresión génica por dos mecanismos; clivaje del RNAm o represión de la traducción.

En el primer mecanismo, el complejo RISC es direccionado a su RNAm blanco recién transcrito. Una vez asociado el complejo RISC corta la fracción complementaria del RNAm dejándolo accesible para la degradación por la acción de las RNAasas lo que evita la expresión de la proteína ^[50] (Figura 3). El segundo mecanismo es propuesto con base en los datos obtenidos en *C. elegans* donde el RNA *lin-4* específico reprime la traducción del RNAm *lin-14*. Esto surge de la simple interpretación de que la expresión de RNA *lin-4* coincide con la caída de la proteína LIN-14 sin alteración del RNAm *lin-1*^[51].

Figura 2. Biogénesis de los microRNAs y de su actividad sobre el RNA mensajero.



Fuente: Basyuk, E. Suavet, F. Doglio A., *et al.* 2003

MicroRNAS EN EL CÁNCER

La expresión de los miRNA se ha encontrado en diferentes procesos relacionados con el desarrollo de órganos y tejidos, y en procesos neoplásicos [52,53]. Varios miRNA han sido identificados en plantas, anélidos y animales, incluyendo mamíferos. Hasta el momento ya fueron identificados 25141 en 193 especies de estas moléculas (<http://mirbase.org>).

Estudios demuestran que RNAs de pequeño tamaño específicos, en cultivos de células tumorales promueven el silenciamiento de genes relacionados a la proliferación y apoptosis, vislumbrando un potencial terapéutico de estas moléculas [54, 55]. Yano y colaboradores, introdujeron una RNA de pequeño tamaño complementaria a la secuencia del gen Bcl-2, en implantes tumorales en roedores inmunológicamente comprometidos, consiguiendo una importante disminución del tamaño del tumor. En el mismo estudio, la inyección endovenosa promovió la reducción expresiva de metástasis hepática de cáncer de próstata [56].

RELACIÓN ENTRE microRNAS Y EL RECEPTOR DE ANDRÓGENO EN LA GLÁNDULA PROSTÁTICA

La dependencia hormonal de la expresión de miRNAs en la próstata en desarrollo ha sido comprobada en roedores. Posterior a la caída de testosterona, como consecuencia de la castración, existe una reducción en la expresión de miRNA específicos, proceso que es revertido mediante la aplicación de DHT. De forma interesante, tejidos que son igualmente andrógeno-dependientes, presentan distintos patrones de expresión de miRNAs asociados al RA [57].

Ya en el cáncer de próstata, los estudios son iniciales y en general utilizan linajes celulares. Östling *et al.* Encontraron una relación cualitativa entre la expresión de miRNA 34 específicamente miR34c y miR34a y la disminución de la expresión de AR en los linajes LNCaP y 22Rv1 [57]. De forma interesante, esos miRNAs han sido descritos como controladores de oncogenes como el E2F y BCL-2, y su baja expresión puede llevar a un estímulo en la proliferación, supervivencia, migración e invasión tumoral [58]

No obstante, algunos resultados se presentan contradictorios; Waltering *et al.* [59], demostraron que los miRNA 29a y 29b, son dependientes de andrógeno en modelos *in vitro*, pero su dependencia hormonal cambia en modelos *in vivo* cuando posterior a la castración estos continúan siendo detectados en el tejido.

Recientemente, se encontró la disminución de la expresión de los miRNA let7c, 100 y 218, en la transición de cáncer de próstata localizado para cáncer metastásico. Estos miRNA están involucrados con el control de genes relacionados a procesos de proliferación y control del ciclo celular [60]. El análisis posterior indica que la

súperexpresión de miR100 está relacionada con la recidiva bioquímica de la neoplasia en pacientes sometidos a la prostatectomía radical ^[61].

Con el objetivo de contribuir con la investigación del papel de los miRNA en el cáncer de próstata, se busca analizar los niveles de expresión de miRNAs que están involucrados con la regulación del receptor de andrógeno en especímenes clínicos de cáncer de próstata.

El proyecto que aquí se plantea se considera como pionero en el país. La Facultad de salud cuenta con la infraestructura necesaria para la elaboración de la investigación lo que permitirá un mejor aprovechamiento de los recursos ya existentes. Un vacío que este proyecto pretende llenar es la conciliación entre el área clínica y la investigación básica.

6. HIPÓTESES

- Los diferentes perfiles de microARN (subexpresión o sobreexpresión en pacientes con cáncer de próstata suponen diferente estadificación (grupo de riesgo bajo, intermedio y moderado) de la neoplasia.
- Los microARN son marcadores moleculares altamente sensibles por ser supresores o inductores tumorales a la hora de diagnosticar cáncer de próstata en estadios tempranos.
- La expresión de microARN se relacionan con la evolución favorable o desfavorable de la neoplasia.
- Los microARN son supresores tumorales efectivos.

7. OPERALIZACIÓN DE VARIABLES

Tabla 1. Operalización de variables

VARIABLE	SUB-VARIABLE	DEFINICIÓN	INDICADOR	NIVEL DE MEDICIÓN
Expresión del microARN		Niveles de microRNA	Subexpresión	Nominal
			Sobrexpresión	
			Sobrexpresión	
Expresión del antígeno prostático específico (psa)		Nivel	Ng/ml	Nominal
Características clínicas	Edad	Características que da la probabilidad de presentar cáncer de próstata	Edad en años cumplidos	Razón
	Evolución tumoral		Estadio tumoral	Nominal
	Escala de gleason (evolución tumoral)		<= 7: bajo riesgo >7: alto riesgo	Interval

Fuente: Autores

8. DISEÑO METODOLÓGICO

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio observacional descriptivo de serie de casos, de tipo retrospectivo; es descriptivo debido a que busca describir la distribución de diferentes variables sin considerar hipótesis, y son aquellos que estudian situaciones que ocurren en condiciones naturales, más que en situaciones experimentales, es observacional, puesto que su objetivo solo es obtener información de la población, sin la intervención directa sobre la misma; es retrospectivo porque se realiza la recolección de datos de pacientes que ya cursan con cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna, donde se determinaran la características clínicas, así como la relación entre la expresión de los microRNA y la severidad de su cuadro.

8.2 LUGAR

El estudio se realizó en la primera fase (extracción y corte de piezas anatomopatológicas) en los laboratorios de patología del Hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva, centro de atención hospitalaria de tercer nivel y centro de referencia para la zona sur de Colombia, comprendido por los departamentos de Caquetá, Putumayo, Amazonas y parte sur del departamento del Tolima y Cauca. En la segunda fase (análisis de muestras) en el laboratorio del grupo de investigación biomédica de la facultad de salud de la universidad Surcolombiana.

8.3 POBLACIÓN Y MUESTRA

La Población de estudio fueron las piezas patológicas de próstata, obtenidas en prostatectomías por cáncer prostático en el periodo de tiempo comprendido entre 1 de junio del 2015 al 1 de junio del 2016, clasificados según la escala Gleason de severidad, en el servicio de urología del hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo de la ciudad de Neiva.

8.4 TÉCNICAS

Para la realización de este estudio se utilizaron los datos registrados en las historias clínicas de pacientes llevados a prostatectomía de donde se extrajo un fragmento de próstata de la pieza de patología en el hospital universitario Hernando Moncaleano Perdomo de Neiva.

8.5 PROCEDIMIENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Los experimentos serán divididos en tres fases, la primera comprende la clasificación de los carcinomas de próstata de bajo riesgo, riesgo intermedio o alto riesgo siguiendo los criterios de D'Amico. La segunda comprende los análisis de expresión de miRNA, RNA mensajero de RA a través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real cuantitativo.

8.5.1 Análisis de la expresión de microRNAs y RNAm DE RA. Fragmentos de 1cm² de muestras quirúrgicas de pacientes portadores de cáncer localizados y almacenados en congelador – 80°C serán utilizados para la evaluación de la expresión de los miRNA y RNAm. Todos los pacientes fueron operados por el mismo cirujano y todos los especímenes quirúrgicos fueron analizados en su totalidad de forma estandarizada por el mismo patólogo.

Los pacientes fueron informados del estudio y concordando en participar del mismo se les solicitó firmar el consentimiento y todos los procedimientos serán realizados de acuerdo con el Comité de Ética Institucional.

Como control, será usado el tejido normal de próstatas de pacientes operados por hiperplasia prostática benigna. Será estudiado el tejido de 30 pacientes de cada grupo caracterizando los criterios de riesgo alto y bajo.

- a. Riesgo Bajo – PSA pre operatorio <15 ng/mL, clasificación de Gleason ≤ 7 , y estadio clínico hasta T2a.
- b. Riesgo Alto– PSA pre operatorio >15 ng/mL, clasificación de Gleason >7, y estadio clínico T2b.

8.5.2 Extracción de RNA y miRNA. Para la extracción del RNA total y el miRNA, serán usadas las respectivas muestras de tejido prostático de acuerdo con los grupos ya mencionados. Los especímenes congelados a -80°C serán macerados y colocados en tubo de microcentrifuga de 1,5 ml estéril. El kit usado será el mirVana (Ambion®) siguiendo las instrucciones del fabricante.

En el tubo serán agregados 500 μ l de buffer de lisis (10 x el volumen de la masa de la muestra) y 50 μ l del aditivo de homogeneizar, posteriormente la solución será dejada en hielo durante 10 min. A seguir, se adicionarán 500 μ l de fenol-cloroformo y las muestras serán mezcladas y centrifugadas en la velocidad máxima (14.000 RPM) por 5 min en temperatura ambiente.

La fase acuosa será removida para un nuevo tubo, en el que será agregado un tercio del volumen de etanol 100%. Entonces la solución será transferida para un filtro y centrifugada a 10.000 g por 15 seg.

El filtro sobrante que contiene el RNA total será lavado con las respectivas soluciones y retomando en volumen conocido y almacenado para los ensayos posteriores con el RNAm do RA. En el filtrado con los miRNAs, serán aumentados dos tercios de etanol 100%. La solución será transferida para una nueva columna y centrifugada a 10.000 g por 15 seg.

En seguida, será realizado el lavado con 700 µl de la solución de lavado 1/3, y las muestras serán centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. Serán hechas entonces dos lavados con 500 µl de solución de lavado 2/3, y en los intervalos las muestras serán centrifugadas por 10 seg a 10.000 g. El filtrado será ahora descartado y serán adicionados 100 µl de agua libre de RNAsas a 95°C en el filtro y en las muestras serán nuevamente centrifugadas a 10.000g por 10 seg. Finalmente, el filtrado con los miRNAs será almacenado en freezer -80°C hasta su uso. La concentración y pureza serán estimadas en espectrofotómetro (Nanodrop ND-1000, Wilmington, EUA) (260/280 nM).

8.5.3 Transcripción reversa (RT). El DNA complementario (cDNA) será generado usando los kits *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*[®] (Applied Biosystems, CA, USA) para el RNA y Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit[®] (Applied Biosystems, CA, USA) para el microRNA. Las respectivas soluciones serán entonces sometidas a ciclos de temperaturas en equipo de PCR Veriti (Applied Biosystem, Foster City, CA), siguiendo los siguientes parámetros: reacciones de RNA serán incubadas a 25° C por 10 minutos, seguida por 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos, y las del microRNA a 16° C por 30 minutos, 42° C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos. El cDNA obtenido será almacenado a -20° C hasta su uso.

8.5.4 Amplificación del RNAm y microRNA. Los iniciadores que serán utilizados para la amplificación de los genes serán diseñados en el programa primer Express (Applied Biosystems, California, USA), que cubre los requerimientos de *Real Time* PCR que serán realizadas en el termociclador ABI 7500 Fast (Applied Biosystems, California, USA) en el modo standard usando Master Mix PCR Taqman Universal. Las principales características de estos oligos son: amplificar fragmentos cuyo tamaño máximo no excede 20 pb, cantidad moderada de CG (40-60%), no poseen capacidad de anillar entre sí o de formar una estructura secundaria, y temperatura de anillamiento entre 58°C y 60°C. Llevando en cuenta los parámetros citados, los iniciadores entonces serán diseñados para cada uno de los genes que serán analizados. Los siguientes miRNA ya relacionados al control del RA serán analizados: miR-9, miR-34 (Anexo 2) ^[57-59].

8.5.5 Análisis de la expresión de microRNA por PCR en tiempo real cuantitativo. Para la cuantificación de las muestras será utilizado el kit TaqMan (Applied Biosystems, California, USA). Este protocolo utiliza dos iniciadores no fluorescentes y una sonda con doble marcación que se une a la región localizada entre los iniciadores. Esta marcación doble es formada por un fluoróforo que emite luz cuando es excitado y un *quencher* que absorbe la luz emitida por el fluoróforo. Durante los ciclos de la reacción de PCR, la sonda es quebrada por la enzima *Taq* polimerase en la etapa de extensión del iniciador anillado. Esta quiebra de la sonda elimina la absorción por el *quencher* de la fluorescencia emitida que puede ser entonces medida a través de una cámara situada en la parte superior del equipo. La cuantificación de la emisión absorbida por la cámara después de la quiebra de la sonda permite entonces la detección del producto de PCR en tiempo real (RT-PCR).

Las reacciones ocurrirán en las siguientes concentraciones: 0,5µl de una solución conteniendo un par de iniciadores y la sonda, 5µl del TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystems, CA, EUA), 3,5µl de agua libre de nucleasas, y 1 µl de cDNA. Las condiciones de la reacción serán: 2 min a 50°C, 10 min a 95°C, e 40 ciclos de 15 seg a 95°C e 1 min a 60°C.

Los perfiles de expresión de los miRNAs serán obtenidos a través de cuantificación relativa determinada por el método $2^{-\Delta\Delta ct}$. Las reacciones serán conducidas en duplicado utilizando β -2 microglobulina (B2M) como control endógeno para RNA y RNU-43 y RNU-48 como controles endógenos para microRNA.

8.6 INSTRUMENTO

Se realizó un instrumento de recolección de datos tipo formulario que permite obtener tanto la información de la historia clínica (datos demográficos, el tiempo de la evolución de la enfermedad, el tipo de cirugía practicada al paciente, la recidiva bioquímica, expresión de microARN), como datos de laboratorios resultado del análisis de las piezas anatomopatológicas obtenidas tras la cirugía.

8.7 PLAN DE TABULACIÓN Y ANÁLISIS

Las historias clínicas serán revisadas por 2 investigadores quienes diligenciarán en un instrumento previamente avalado por el equipo investigador. Posteriormente la información será tabulada en Excel versión 2015, dicha base será revisada en 2 ocasiones distintas por los investigadores para evitar sesgos de información y serán eliminados los documentos de identificación de los pacientes para proteger sus identidades. Para el análisis estadístico de los datos será usado el programa MINITAB® Release 14.20. Las medias de los grupos serán comparadas utilizando el teste t-Student cuando la distribución de las muestras sea normal y las variancias

estadísticamente iguales. Para comparar las medias de muestras no paramétricas será usado la prueba Mann-Whitney. Para comparar tres o más grupos de medias será usado el teste One-way ANOVA con el posterior teste Dunnett's para comparar los valores de los tratamientos en relación al grupo control.

La interpretación de resultados: Los niveles de expresión de los miRNA serán correlacionados con los grupos de riesgo de CaP como especificado anteriormente. También relacionaremos los mismos datos con la recidiva bioquímica de la enfermedad que será considerada cuando los niveles de PSA sean superiores a 0,2 ng/mL.

8.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS

Esta investigación será realizada según las disposiciones generales consagradas en la resolución 8430 de 1993, por las cuales se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud y la cual según el artículo 11 de la misma, clasifica esta investigación como sin riesgo, que representan estudios que emplean técnicas y métodos de investigación documental y aquellos en los que no se realiza ninguna intervención o modificación intencionada de las variables biológicas, fisiológicas, psicológicas o sociales de los individuos que participan en el estudio.

Por lo tanto esta investigación considerada sin riesgo de acuerdo al párrafo primero del artículo 11 de la resolución 8430 de 1993, no necesita la aplicación de un consentimiento informado ni el sometimiento ante el comité de ética médica, debido a que no se realizara intervención directa en la población a estudio. Este estudio no presenta conflicto de intereses.

9. ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se presentan los resultados del análisis en los patrones de expresión de miRNA de un total de 39 piezas patológicas de próstata, 30 correspondían a cáncer y 9 a hiperplasia prostática benigna que fueron el tejido control. Las piezas fueron agrupadas según la estadificación tumoral (pT) y los valores de la escala Gleason: Gleason mayor o igual que ≥ 7 (alto riesgo) y Gleason ≤ 6 (bajo riesgo)

- Los pacientes tuvieron una edad media de 59,5 años ± 6 , con una variación de 46-72 años en paciente con cáncer y una Edad Media de 68, con variación de 58-81 años en HPB. (Tabla 2).
- 18 pacientes presentaron estadio tumoral pT2 y 12 pT3. (Tabla 1).
- Las biopsias analizadas para la escala Gleason determinó los grupos en: riesgo bajo, incluyó 7 casos con Gleason 6 (3 + 3) y 18 con Gleason 7 (3+4). El grupo de riesgo alto los casos fueron 3 con Gleason 8 (4+4) y 2 casos con puntuación de Gleason 9 (4+5). No teníamos en nuestra muestra casos de Gleason 5, ni Gleason 10 (5+5). (Tabla 1).
- Sólo 4 casos presentaron ganglios linfáticos positivos y ninguno de ellos tenía metástasis. (Tabla 1).

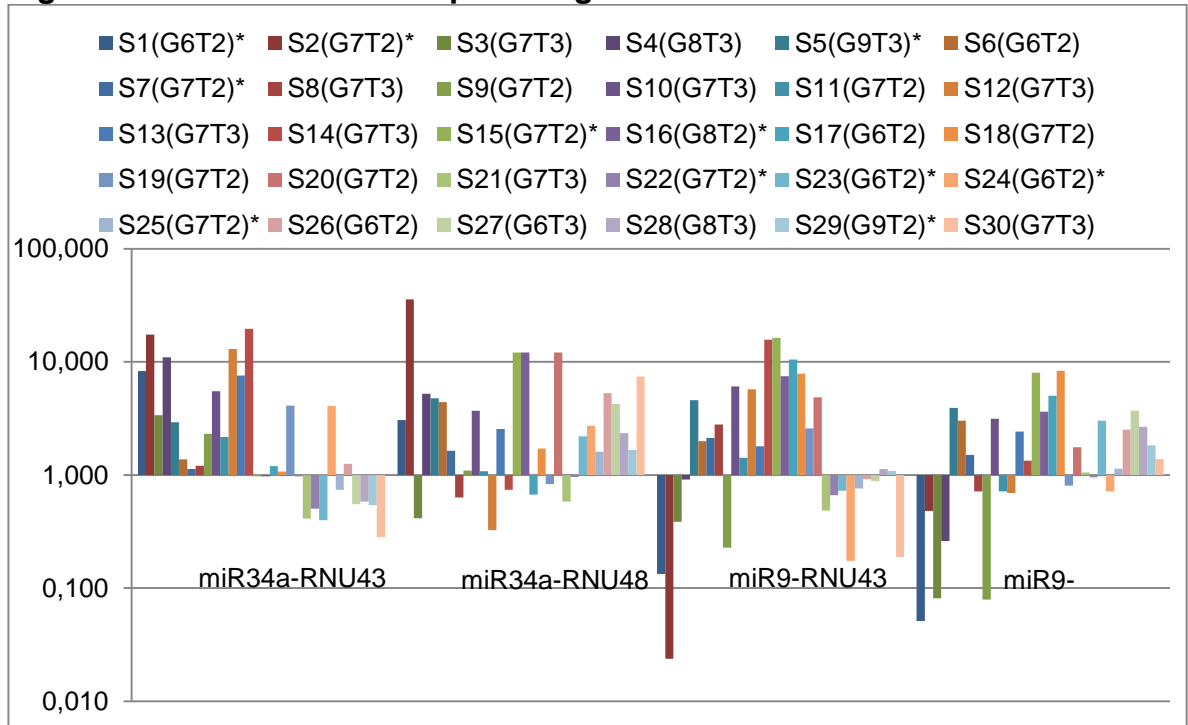
Tabla 2. Características demográficas, clínicas y anatomopatológicas de los pacientes con cáncer de próstata usados en el estudio.

	Cáncer (n=30)	HPB (n=9)
Edad (años)		
Mediana	59,5	68
variación	46 - 72	58 - 81
Clasificación de Gleason		
Mediana	7	—
Variación	6-9	—
Volumen tumoral (%)		
Mediana	14,5	—
Variación	1,5-55	—
Estadio		
pT2	18 (60%)	—
pT3	12 (40%)	—
PSA		
Mediana	6,2	1,9
Variación	4,33 – 14,6	1,3 – 2,8

Fuente: Autores

En la figura 3 se presentan los resultados de la expresión génica de los microRNA34a y miRNA 9 de las muestras de 30 pacientes en diferentes grados de evolución de cáncer de próstata.

Figura 3. Resultados de la expresión génica



Fuente: Autores

La agrupación de los diferentes valores en la gráfica 1, mostro la división de los 2 grupos de miARN estudiados, (miRNA34 y miRNA9) los resultados fueron diferentes, dependiendo del tipo de control usado. Se encontró que el control del RNU43 fue más estable para el microRNA 34, mientras que para el microRNA 9 fue el RNU 48. La expresión de los miRNA estudiados, oscilaron entre 35 veces y 0,02 veces comparados con el tejido control.

Los tumores prostáticos de bajo grado, Gleason 6 (3+3) y 7 (3+4) mostraron una regulación a la baja de miRNA – 9 en comparación con el epitelio normal, en contraste con los niveles de miRNA – 34 que estaban sobreexpresados. En los tumores de alto grado, Gleason 9 (5+4) y Gleason 8 (4+4) se evidencio una regulación a la baja de ambos miRNA, esto relacionado con estadios tumorales pT3. De acuerdo con nuestros objetivos, lo anterior, son datos que reflejan la relación de los niveles de miRNA con los diferentes grupos de riesgo de pacientes (estadio tumoral, Gleason) con cáncer prostático y la recidiva bioquímica que estos presenten, medida a través de la elevación del PSA.

Tabla 3. Caracterización individual de muestras patológicas significativas.

MUESTRA	GLEASON	pT	miR9	miR34
S2	7	2	0,024	35,758
S16	8	2	7,501	0,971
S28	8	3	1,133	0,583

Fuente: Autores

Los resultados de la tabla 3 corresponden al patrón de expresión, estadificación Gleason y pT, observado en 3 de las muestras más característicos, donde se evidencia el posible papel supresor que ejerce el miR34 sobre el parénquima tumoral, presentando características menos agresivas (G7-pT2) donde se sobreexpresa en comparación con los tejidos donde se encuentra subexpresado que presentan características tumorales e histopatológicas más agresivas (G8-pT3).

El análisis reveló el importante papel de los miRNAs como reguladores clave en la patogénesis de cáncer de próstata.

10. DISCUSIÓN

Las limitaciones de este estudio fueron principalmente por el escaso número de pacientes a los que se les realiza prostatectomía radical por Ca prostático. Por lo anterior para futuros estudios, se recomienda realizar la investigación en un periodo más amplio de tiempo y/o incluir más centros de salud para así tener un mayor volumen de pacientes. Sin embargo, aun con estas limitaciones, los objetivos del estudio se lograron y lo consideramos significativo.

Nuestros resultados evidencian desregulación de la expresión de los miRNAs 9 y 34 en el cáncer de próstata, algunos de los cuales estarían implicadas en la formación y progresión del tumor.

Hubo 11 patrones de expresión de miRNAs estadísticamente significativos que estaban altamente sobreexpresados o subexpresados. Se extendieron de 0.02 veces hasta 35 veces comparados con el tejido control y los que mostraron mayor relevancia fueron los siguientes: S1, S2, S5, S7, S15, S16, S22, S23, S24, S25 Y S29 (ver tabla 2). Según Ozen et al, el patrón de expresión de miR-9, miR-125, miR-122, miR-125a-b, miR-181a, miR-181c, miR-146b-5p, miR-184, miR193a y miR-34 se encontraron desregulados en tumores prostáticos comparados con tejido de hiperplasia prostática benigna⁶².

Tong et al, encuentra una regulación a la baja de la expresión de miR-23, miR-100, miR-9, miR-145, miR-221 y miR-22 en tumores comparados con los tejidos normales⁶³, estos estudios fueron coherentes con Schaefer et al que demostró alteración en los patrones de expresión de miR-125 ter, miR-145, miR-221, miR-34, miR-9 y miR-222 en tumores de próstata⁶⁴. Estos perfiles de expresión de miARN desregulados también fueron encontrados en nuestro estudio (ver Figura 1). Creemos que en la gran mayoría de pacientes, se encuentran mecanismos de regulación molecular endógenos, que inhiben la progresión de diversos tumores, así como mecanismos que podrían desencadenar estas neoplasias. Por qué se expresa un patrón u otro sigue siendo algo aun no claro, futuras investigaciones en este campo podrían ser de gran interés para aclarar estas vías moleculares y con esto la génesis de diversas patologías.

De acuerdo con los estudios citados previamente, nuestros datos apoyan la hipótesis de la participación de los miRNAs en el desarrollo de tumores de próstata. Dentro de nuestro estudio se evidencio un patrón diferente en la expresión de miRNA de algunos casos como el S28 que teniendo una estadificación tumoral de pT3 y una escala Gleason de 8, no mostro una desregulación marcada en ninguno de los 2 patrones de expresión (tabla 2). Esto lo asociamos a que en diversos tipos de tumores, se encuentran tipos de miRNA con patrones de expresión que no difieren entre tumores agresivos y no agresivos como en epitelio normal. Beatriz A. et al. Hallo un patrón similar en los tipos de miRNA 32, 124, 128, 84⁶⁵.

Por otro lado, en los estudios realizados a la expresión de patrones de miRNA, en tejidos control con hiperplasia prostática benigna, se encontró desregulaciones marcadas, lo que nos podría sugerir que los patrones de expresión de miRNA podrían estar alterados desde estadios tempranos de la patología.

Los diferentes patrones de expresión de miRNAs se han postulado como posibles métodos diagnósticos, pronósticos y que tengan función de biomarcadores de predicción en el cáncer de próstata. Lo anterior se centra en a base a estudios realizados con perfiles séricos de miRNAs específicos de tejido prostatico⁶⁶.

Por lo anteriormente mencionado, los estudios realizados a nivel mundial y los resultados de nuestro estudio, podemos afirmar que los patrones de expresión de los miARN están alterados en comparación con la expresión de los tejidos sanos, además cuentan con un papel predictor sobre la evolución de la enfermedad, puesto que sus niveles pueden ser medidos en muestras sanguíneas o biopsias tomadas a pacientes con riesgo de desarrollar cáncer prostático o con hiperplasia prostática benigna y realizar una aproximación de la evolución de la patología y así tomar medidas terapéuticas tempranas, lo cual será de gran utilidad para un diagnóstico temprano, una buena estatificación de los grupos de riesgo y una opción terapéutica del Ca prostático.

11. CONCLUSIÓN

Los perfiles de expresión de microARN 9 y 34 en tumores de próstata, se encuentran alterados con respecto al tejido normal. Pueden ser patrones subexpresados o sobreexpresados que pueden reflejar diferencias significativas en las alteraciones moleculares que generan el cáncer y además que ubican a los pacientes en grupos de riesgo como los de estadificación Gleason alta o baja, todo esto podría ser usado como soporte diagnóstico, además para detectar pacientes que podrían evolucionar desfavorablemente.

Estos perfiles podrían estar asociados con la transformación maligna temprana de la hiperplasia prostática benigna, además, se relaciona también con las vías que conducirán el tumor a presentaciones benignas, no tan agresivas y con bajas mortalidades.

Se evidencia una importante contribución etiológica de los miRNAs en la patogénesis del cáncer prostático y su evolución. Además de validar su uso para futuros estudios que podrían utilizarse para el desarrollo de estrategias diagnósticas individuales y más efectivas. Una comprensión más profunda de las vías moleculares implicadas en la expresión de miRNAs podría ayudar enormemente con estos diseños.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Staack A., Donjacour AA., Brody J., *et al.* 2003 Mouse urogenital development: a practical approach. *Differentiation* 71, 402-413.
2. Chrisman H., Thomson AA. 2005. Regulation of urogenital smooth muscle patterning by testosterone and estrogen during prostatic induction. *Prostate* 66, 1-12.
3. Takeda I., Lasnitzki I., Mizuno T. 1986. Analysis of prostatic bud induction by brief androgen treatment in the fetal rat urogenital sinus. *Journal of Endocrinology* 110, 467-470.
4. Cunha GR., Donjacour AA., Cooke PS., *et al.* 1987 The endocrinology and developmental biology of the prostate. *Endocrine Reviews* 8, 338-362.
5. Pointis G., Latreille MT., Cedard L. 1980. Gonado-pituitary relationships in the fetal mouse at various times during sexual differentiation. *Journal of Endocrinology* 86, 483-488.
6. Timms TL. Truong LD., Merz VW. *et al.*, 1994. Mesenchymal-epithelial interactions and transforming growth factor- β expression during mouse prostate morphogenesis. *Endocrinology* 134, 1039-1045.
7. Taplin ME, e Ho S-M. 2001. The endocrinology of the prostate cancer. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86, 3467-3477.
8. Wilson JD., Griffin JE., George FW., *et al.* 1983. The endocrine control of male phenotypic development. *Australian Journal of Biological Sciences* 36, 101-28.
9. Cunha GR., Alarid ET., Turner T., *et al.* 1992. Normal and abnormal development of the male urogenital tract: Role of androgens, mesenchymal-epithelial interactions, and growth factors. *Journal of Andrology* 13, 465-75.
10. Hayward SW., Haughney PC., Rosen MA., *et al.* 1998. Interactions between adult human prostatic epithelium and rat urogenital sinus mesenchyme in a tissue recombination model. *Differentiation* 63, 131-140.
11. Hayward SW, Cunha GR. 2000. The prostate: development and physiology. *Radiologic Clinics of North America* 38, 1-14.
12. Thompson AA., Timms BG., Barton L., *et al.* 2002. The role of smooth muscle in regulating prostatic induction. *Development* 129, 1905-1912.

13. Corbier P., Martikainen P., Pestis J., *et al.* 1995. Experimental research on the morphofunctional differentiation of the rat ventral prostate: roles of the gonads at birth. *Archives of Physiology and Biochemistry* 103, 699-714.
14. Berry S., Isaacs JT. 1984. Comparative aspects of prostate growth and androgen metabolism with aging in the rat versus the dog. *Endocrinology* 114, 511-520.
15. Sugimura Y, Cunha GR., Donjacour AA. 1986. Morphogenesis of ductal networks in the mouse. *Biology of Reproduction* 34, 961-71.
16. Sampson N, Untergasser G, Plas E, *et al.* 2007. The ageing male reproductive tract. *Journal of Pathology* 211, 206–218.
17. Labrie F, Sugimoto Y, Luu-The V. 1992. Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* 131: 1571-1573.
18. Bartsch G, Rittmaster RS, Klocker H. 2000. Dihydrotestosterone and the concept of 5 α -reductase inhibition in human benign prostatic hyperplasia. *Eur Urol* 37: 367-380.
19. Martin C, Bean R, Rose K, *et al.* J. 2001. Cyp7b1 catalyses the 7 α -hydroxylation of dehydroepiandrosterone and 25-hydroxycholesterol in the rat prostate. *Biochem J* 355: 509-515.
20. García-Flórez M., Oliveira CA., Carvalho HF. (2005). Early effects of estrogen on the rat ventral prostate. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 38, 487-497.
21. Huggins H, Hodges CV. Studies on prostatic cancer: The effects of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1941; 1: 293±7
22. Gnanapragasam VJ, Robson CN, Leung HY, *et al.* Androgen receptor signalling in the prostate. *BJU international* (2000), 86, 1001±1013
23. Tenbaum S, Baniahmad A. Nuclear receptors: structure, function and involvement in disease. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 1325±41
24. Black B, Bryce M. Intranuclear organization and function of the androgen receptor. *TRENDS in Endocrinology and Metabolism* Vol.15 No.9 November 2004 411-417
25. Ford OH, Gregory CW, Kim D, *et al.* Androgen receptor gene amplification and protein expression in recurrent prostate cancer. *J Urol.* 2003, 170(5):1817-21.

26. Stone K, Mickey D, Wunderli H, *et al.* Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU145). *Int J Cancer* 1978; 21: 274±81
27. Kaighn M, Narayan K, Ohnuki Y *et al.* Establishment and characterization of a human prostate carcinoma cell line (PC 3). *Invest Urol* 1979; 17: 16±23
28. Culig Z, Klocker H, Eberle J *et al.* DNA sequence of the androgen receptor in prostatic tumour cell lines and tissue specimens assessed by means of the polymerase chain reaction. *Prostate* 1993; 22: 11±22
29. Hobisch A, Culig Z, Radmayr C *et al.* Androgen receptor status of lymph node metastases from prostate cancer. *Prostate* 1996; 28: 129±35
30. Wainstein MA, He F, Robinson D *et al.* CWR22: androgendependent xenograft model derived from a primary human prostatic carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54: 6049±52
31. Veldscholte J, Berrevoets CA, Ris Stalpers C *et al.* The androgen receptor in LNCaP cells contains a mutation in the ligand binding domain which affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992; 41: 665±9
32. Newmark JR, Hardy DO, Tonb DC *et al.* Androgen receptor gene mutations in human prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci* 1992; 89: 6319±23
33. Taplin ME, Bubley GJ, Shuster TD *et al.* Mutation of the androgen receptor gene in metastatic androgen independent prostate cancer. *New Eng J Med* 1995; 332: 1393±8
34. Ambros, V. 2003. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 113, 673-676.
35. Farh KK., Grimson A., Jan C *et al.* 2005. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science* 310, 1817-1821.
36. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, *et al.* 2000. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates *Caenorhabditis elegans* developmental timing. *Nature* 403, 901-906.
37. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A. *et al.*, 2003. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.
38. Xu P, Vernooy SY, Guo M, *et al.* 2003. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism. *Current Biology* 13, 790-795.

39. Dostie J, Mourelatos Z, Yang M, *et al.* 2003. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA* 9, 180-186.
40. Chen X, 2004. A microRNA as a translational repressor of APETALA2 in *Arabidopsis* flower development. *Science* 303, 2022-2025.
41. Krichevsky AM, King KS, Donahue CP, *et al.* 2003. A miRNA array reveals extensive regulation of miRNAs during brain development. *RNA* 9, 1274-1281.
42. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, *et al.* 2003. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 2999-3004.
43. Metzler, M, Wilda M, Busch K, *et al.* 2004. High expression of precursor miRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. *Genes Chromosomes Cancer* 2,167-169.
44. Michael MZ, O'Connor SM, Van Holst Pellekaan NG, *et al.* 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Molecular Cancer Research* 1,882-91.
45. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, *et al.* MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer – From high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. *Urologic Oncology in press*.
46. Basyuk, E. Suavet, F. Doglio A., *et al.* 2003. Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic Acids Research* 31, 6593-6597.
47. Lee, Y., Ahn, C., Choi, H., *et al.* 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425, 415-419.
48. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., *et al.* 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Development* 17, 3011-3016
49. Bartel DP. 2004. Micro RNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281-297.
50. Wightman, B., Ha, I., Ruvkun, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 885-862.

51. Svoboda P, Stein P, Hayashi H, *et al.* 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* 127, 4147-4156
52. McManus MT, Petersen CP, Haines BB, *et al.* 2002. Gene silencing using miRNA designed hairpins. *RNA* 8, 842-850
53. Dykxhoorn DM, Leberman J. 2005. The silent revolution: RNA interference as basic biology, research tool and therapeutic. *Annual Review of Medicine* 56, 401-423.
54. Lee SO, Lou W, Qureshi KM, *et al.*, 2004. RNA interference targeting Stat3 inhibits growth and induces apoptosis of human prostate cancer cells. *Prostate* 60, 303-309
55. Narayanan R, Jiang J, Gusev Y, *et al.* 2010. MicroRNAs are mediators of androgen action in prostate and muscle. *PLoS One*. 27;5(10):e13637.1-13
56. Yano J, Hirabayashi K, Nakagawa S, *et al.* 2004. Antitumor activity of small interfering RNA/cationic liposome complex in mouse models of cancer. *Clinical Cancer Research* 10, 7721-7726.
57. Östling P, Leivonen SK, Aakula A, *et al.* Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2011 Mar 1;71(5):1956-67
58. Hagman Z, Larne O, Edsjö A, *et al.* miR-34c is downregulated in prostate cancer and exerts tumor suppressive functions. *Int J Cancer.* 2010 15 (12):2768-76.
59. Waltering KK, Porkka KP, Jalava SE, *et al.* Androgen regulation of micro-RNAs in prostate cancer. *Prostate.* 2011 May;71(6):604-14
60. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, *et al.* 2011. MicroRNA-100 expression is independently related to biochemical recurrence of prostate cancer. *J Urol.* 185(3):1118-22.
61. Leite KR, Sousa-Canavez JM, Reis ST, *et al.* 2011. Change in expression of miR-let7c, miR-100, and miR-218 from high grade localized prostate cancer to metastasis. *Urol Oncol.* 29(3):265-9.
62. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 2008;27:1788-93.
63. Tong AW, Fulgham P, Jay C, *et al.* MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther* 2009;16:206-16.

64. Schaefer A, Stephan C, Busch J, Yousef GM, Jung K. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors. *Nat Rev Urol* 2010;7:286-97.
65. Beatriz A. Walter¹, Vladimir A. Valera¹, Peter A. Pinto², Maria J. Merino¹, Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer.
66. Selth LA, Tilley WD, Butler LM. Circulating microRNAs - macro-utility as markers of prostate cancer? *Endocr Relat Cancer* 2012.

ANEXOS

Anexo A. Prueba piloto

Resultados preliminares. A continuación se presentan los resultados iniciales del piloto realizado por el grupo de investigación. Esperamos la aprobación de este proyecto para continuar con el estudio.

Analysis of Expression of Androgen Receptor and MicroRNAs 34a and 9 in Prostate Cancer Tissue

Moncaleano JM, Zúñiga PM, Orjuela LJ, Perdomo Celis F, Cuellar JS, Torres A, Oquendo DA, Mosquera JD, García Flórez M.

Grupo Biología de la Reproducción, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia

MicroRNAs (miRNAs) are short non-coding RNA molecules that play important roles in different processes. Recently has been associated with cancer development and progression. Otherwise androgen receptor (AR) is expressed in all stages of prostate cancer progression and its levels increase in the castration-resistant tumors. However the mechanisms regulating AR expression remain poorly understood and recent results suggest a possible interaction with miRNAs

Recent results of our lab have shown different roles of some miRNAs in progression of prostate cancer, that is the second leading cause of cancer-related death in men in Brazil. Taking notice of this we investigated the expression profile of miR-9 and mir-34a together with the expression of Androgen Receptor RNAm in prostate cancer (PCa) samples of thirty patients and were related with the clinical pathological stages.

Total RNA and miRNA were isolated using RNAaqueous Kit® and a mirVana Kit® (Applied Biosystem, CA, USA), respectively, according to the manufacturer's instructions. RNA and miRNA concentration was determined by 260/280 nm absorbance using Nanodrop®ND-1000 spectrophotometer (Thermo Scientific). cDNA was generated using a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit® for RNA and a Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit® (Applied Biosystem, CA, USA) for miRNA.

For mRNA and miRNA amplification, a Taqman Reagent Kit® (Applied Biosystem, CA, USA) was used in the 7500 Fast Real-Time PCR System® (Applied Biosystem, CA, USA).

Expression profiles of miR-34a, miR-9 and AR mRNA were obtained by relative quantification using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. Reactions were conducted in duplicate using

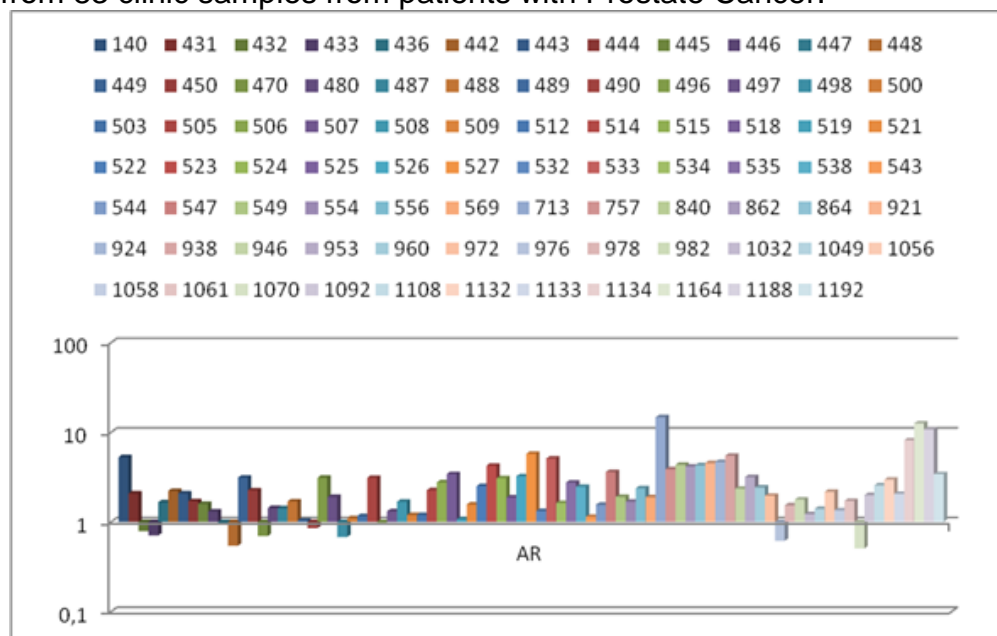
b-2 microglobulin (B2M) as an endogenous control for mRNA analysis and RNU-43 and RNU-48 as endogenous control for miRNA analysis.

Thirty six percent (36%) of the samples corresponding to patients that presented biochemical recurrence of PSA, of these samples 88% presented over-expression of AR (figure 1), and 66% percent presented under-expression of mir34a and 80% presented over-expression of mir9.

MicroRNA-34 mediates AR-dependent p53-induced apoptosis in prostate cancer cells and its under-expression in samples with biochemical recurrence, is possible related with lost in this apoptotic pathway leading to the tumor progression. Deregulation of miR-9 expression has profound effects on pathology including cancer, and several lines of evidence have indicated that can function as a tumor suppressor, that can influence cell growth and the cell cycle.

In conclusion, Androgen receptor (AR) is expressed in all stages of prostate cancer progression, including in castration-resistant tumors. Eliminating AR function continues to represent a focus of therapeutic investigation, but AR regulatory mechanisms remain poorly understood. In this way, it is very important elucidated miRNAs that influenced the level of AR in human prostate cancer tissue.

Figure 1. Normalization expression level (Logarithmic Ratio) of Androgen Receptor gene from 83 clinic samples from patients with Prostate Cancer.



Fuente: Autores
Anexo B. Display options

