

## Papel de los andrógenos en el desarrollo del cáncer de próstata: Un estudio sobre miRNAs

Salido-Guadarrama I., Rangel-Escareño C., García-Tobilla P., Solórzano-Rosales S. Miranda-Ortiz H. y Rodríguez-Dorantes M.

Instituto Nacional de Medicina Genómica, Secretaría de Salud

### RESUMEN

El cáncer de Próstata (CaP) es la segunda causa de muerte debida a neoplasia en países industrializados. En México, ~40% de los hombres entre 60 y 69 años sufren de este padecimiento. A la fecha, el antígeno prostático específico (PSA por sus siglas en inglés) sigue siendo el único marcador molecular empleado como indicador en la identificación y manejo de pacientes con CaP; a pesar de su alta sensibilidad, el PSA presenta una baja especificidad. Estudios recientes han revelado que es posible clasificar diferentes tipos de tumor con base en su perfil particular de microRNAs (miRNAs). El objetivo de este estudio es evaluar la utilidad potencial de miRNAs en orina como posibles indicadores de la enfermedad prostática. Se colectaron 18 muestras de orina provenientes de pacientes con diagnóstico positivo de CaP ó hiperplasia prostática benigna (HPB), obtenidas después de la aplicación de examen digital rectal (DRE). Se realizó la extracción de RNA total. La medición de la expresión simultánea de 373 miRNAs se llevó a cabo por RT-PCR en tiempo real. La cuantificación relativa de miRNAs se determinó mediante el método comparativo de Ct ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ), haciendo uso del software *DataAssist*<sup>TM</sup> v 1.0 y las herramientas del paquete *Bioconductor*. Se realizó una prueba de t de student ajustada para encontrar diferencias significativas en la expresión de miRNAs entre el grupo de CaP y el de HPB. Las diferencias con un valor-p <0.05 se consideraron como estadísticamente significativas. Después de normalizar los datos de Ct, Identificamos un grupo de 21 microRNAs diferencialmente expresados, con un valor-p= 0.05. De este conjunto, *hsa-miR-150* y *hsa-miR-328* se encuentran subexpresados y el resto está sobre-expresado. Un agrupamiento jerárquico no supervisado muestra que el perfil de 21

miRNAs seleccionados permite realizar una separación adecuada entre el grupo de muestras de CaP y el de HPB. Estos resultados, reflejan el potencial uso de miRNAs obtenidos de orina como elementos de una firma molecular particular para CaP.

#### **EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

El cáncer de Próstata (CaP) es el segundo tipo de neoplasia maligna más frecuente entre la población masculina. Las cifras más recientes indican que 782,600 nuevos casos fueron diagnosticados durante 2007 y el número de muertes asociadas a CaP durante ese año se estima en 254,000, lo que convierte al CaP en la sexta causa de muerte por cáncer en hombres, a nivel mundial (Garcia et al., 2007). En México, entre 2006 y 2007, el CaP ocupó el primer lugar en cuanto a mayor número de muertes asociadas a neoplasias malignas (INEGI, 2010). A pesar de los múltiples esfuerzos realizados, aún prevalece la dificultad para diagnosticar el CaP en etapas tempranas, debido a que en muchas alteraciones no relacionadas al cáncer de próstata, por ejemplo, la HPB, se presentan características que guardan gran semejanza con las de las lesiones del CaP (De Marzo et al., 2003). Esto conduce a la necesidad de realizar monitoreos continuamente a lo largo de la vida de los pacientes para evaluar el posible desarrollo de CaP. Con el desarrollo de la tecnología genómica los esfuerzos se han concentrado en el estudio a nivel molecular de factores que están implicados en la iniciación y progresión del cáncer en humanos, incluyendo al CaP.

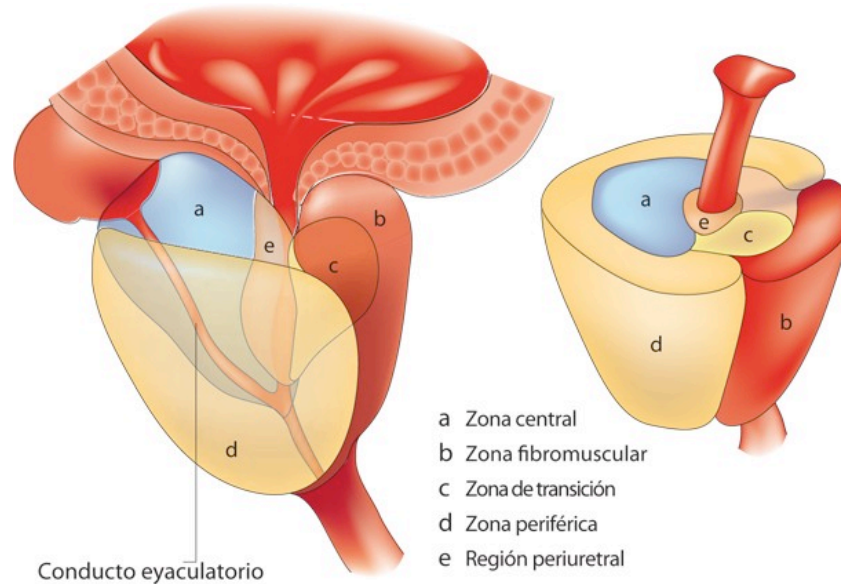
#### **FACTORES DE RIESGO PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

A pesar de la elevada tasa de morbilidad, a la fecha, las causas exactas que llevan al desarrollo de CaP no han sido elucidadas. Tradicionalmente, el CaP se ha asociado a factores como la edad avanzada, la etnicidad y la historia familiar. Sin embargo, se tiene conocimiento de otros factores putativos de riesgo, entre los que se encuentran la dieta, el tabaquismo, el sedentarismo y la obesidad. Aunque cambios en el estilo de vida y prevención de la exposición a contaminantes químicos parecen ayudar a disminuir la incidencia de la enfermedad, su papel en la etiología del CaP no se ha establecido claramente (Schulz et al., 2003).

**HISTOLOGÍA Y PATOLOGÍA DE LA PRÓSTATA**

La próstata es un órgano pequeño de aproximadamente 20g. y con una longitud aproximada de 3cm. Produce el líquido prostático, elemento importante que proporciona soporte nutricional al semen. Anatómicamente, se distinguen 3 zonas: la zona central, cruzada por los conductos eyaculadores, que supone un 25% de la glándula; la zona transicional, que rodea a la uretra posterior con un 5% del volumen glandular, es en esta zona donde la HPB ocurre casi de manera exclusiva; y la zona Periférica que ocupa un 70% del volumen glandular. En la zona periférica se desarrollan el 68% de los casos de cáncer. La zona Periférica es accesible al tacto rectal (Joshua et al., 2008).

Histológicamente, la próstata consiste de dos tipos celulares principales: el estroma y el epitelio. El estroma está compuesto de células de músculo liso, fibroblastos y células endoteliales. Por otra parte, 4 subtipos celulares componen el epitelio: epitelio basal, epitelio secretor, células neuroendocrinas y células madre (De Marzo et al., 2003). La etiología del CaP es multifactorial y compleja e involucra múltiples alteraciones a nivel molecular. Esta situación se complica aún más, ya que existen condiciones patológicas como las prostatitis, la HPB y la neoplasia intraepitelial prostática (NIP); en las que se observa una alteración del tamaño y la histología de la próstata. Aunque se piensa que las lesiones que caracterizan a la NIP son precursoras del CaP, no hay evidencia concluyente al respecto. Por otra parte la HPB es un padecimiento que afecta a más del 50% de los hombres mayores de 60 años y su prevalencia aumenta con la edad hasta afectar a casi la totalidad de los hombres mayores de 80 años (Oelke and Gravias, 2010; Roehrborn, 2005). La patogénesis del CaP involucra una interacción entre factores ambientales y genéticos. Se estima que estos últimos contribuyen en un 42% al riesgo del desarrollo y progreso de la enfermedad (Rubin and De Marzo, 2004). Aún más, los estudios más recientes indican que los andrógenos tienen un papel importante en el establecimiento de la enfermedad. Variaciones de genes que participan en la biosíntesis y metabolismo de estos andrógenos han sido asociadas con el desarrollo y progreso del CaP. El CaP cursa por diferentes estadios desde andrógeno dependiente a andrógeno independiente o refractaria a terapia hormonal, siendo esta última fase la más agresiva y de mal pronóstico para el paciente (Pienta and Bradley, 2006)



**Figura 1. Esquema de las zonas de la próstata y su predisposición a enfermedades.** La mayoría de las lesiones de cáncer ocurren en la zona periférica de la glándula, pocas ocurren en la zona de transición y casi ninguna en la zona central. La mayoría de las lesiones de HPB tienen lugar en la zona de transición. Los carcinomas en la zona central no están asociados con la NIP, mientras que los que ocurren en la zona periférica guardan una relación con las NIP de alto grado. Adaptado de Inflammation in prostate carcinogenesis (De Marzo et al., 2007).

#### BIOMARCADORES MOLECULARES PARA CÁNCER DE PRÓSTATA

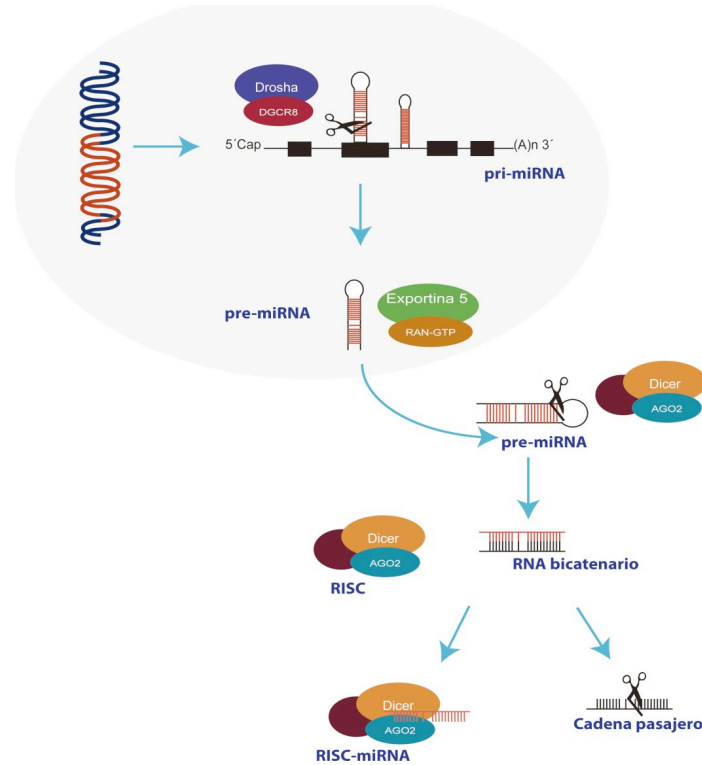
La identificación de marcadores moleculares asociados al CaP, constituyen un aporte científico que ha mejorado la capacidad para detectar individuos en riesgo de padecer CaP. El marcador más utilizado actualmente para el diagnóstico de CaP es el antígeno prostático específico (PSA). El PSA es una glicoproteína que se produce en el epitelio de la próstata de manera exclusiva y está presente en pequeñas cantidades en el suero de varones sanos y se acumula con la edad. Sin embargo, el intervalo de normalidad depende de variables poblacionales o raciales (Reynolds et al., 2007). A pesar de su alta sensibilidad, la prueba de niveles en suero de PSA carece de especificidad ya que no permite establecer una diferencia confiable entre la HPB, el CaP de tipo agresivo y el no agresivo (You et al., 2010). A nivel genético, el *PCA3* ha

tenido un papel significativo como marcador de diagnóstico no invasivo en orina. El *PCA3* es un mRNA específico de próstata, probablemente no codificante, cuya expresión se encuentra anormalmente elevada en CaP, en comparación con tejido adyacente no-neoplásico (Bussemakers et al., 1999). Otro marcador que ha sido reportado como altamente sobre-expresado en tejido de CaP es el gen que codifica para la proteína alfa metil CoA racemasa (*AMACR*) (Rubin et al., 2002). En un estudio reciente realizado con la finalidad de encontrar genes con expresión elevada en un conjunto muestras de CaP se identificó a un gen de fusión presente en el 80% de los casos de CaP y ausente en tejido prostático benigno. Esta fusión involucra al gen de respuesta temprana *EGR*, miembro de la familia de genes de factores de transcripción *ETS*, que se une a la región 5' no traducida (UTR por su siglas en inglés) del gen *TMPRSS2*. Este último codifica para una serina proteasa que responde a la señalización por andrógenos (Tomlins et al., 2008). A pesar del valor diagnóstico que presentan el mensajero *PCA3*, el gen *AMACR* y el gen de fusión *EGR-TMPRSS2*, no existe a la fecha un marcador histológico o molecular que permita hacer una predicción temprana del CaP con adecuada exactitud, en especial, del fenotipo agresivo del mismo.

#### **BIOGÉNESIS DE MICRORNAs**

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias cortas de RNA no codificantes, de 18 a 22 nucleótidos que se expresan en varios organismos eucariontes (Bushati and Cohen, 2007). Los primeros estudios revelaron que la expresión de los miRNAs *let-7* y *lin-4* influye en el desarrollo y ciclo celular de *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993) y que la pérdida de su función altera su desarrollo normal. Los miRNAs se procesan a partir de un precursor primario (pri-miRNA) que puede estar contenido en diferentes regiones génicas; intrónica, exónica, o en una región no traducida (UTR). La RNA polimerasa II se encarga de la transcripción del pri-miRNA, el cual, al igual que un mRNA, se encuentra poliadenilado y tienen CAP en el extremo 5' (Cai et al., 2004). Cada pri-miRNA puede contener uno o más miRNAs, cada uno dentro de una secuencia de 60 a 80 nucleótidos que se encuentra plegada sobre sí misma para formar una estructura en forma de horquilla, la cual es referida como pre-miRNA. Sin embargo, la mayoría de los pri-miRNAs están organizados en grupos o "clusters" dentro de una misma región cromosómica y presentan patrones de expresión similares, lo que sugiere que su transcripción se realiza en forma de policistrones que están regulados bajo un mismo promotor (Kim, 2005). A continuación, las horquillas de pre-miRNAs son reconocidas y escindidas dentro del

núcleo celular por la acción de un complejo microprocesador que incluye a la enzima Drosha y su elemento asociado DGCR8. Una vez escindido, el pre-miRNA en forma de horquilla, contiene un segmento de dos nucleótidos en el extremo 3' que es característico del corte producido por Drosha. Este rasgo permite al factor nuclear de exportación, conocido como exportina 5, reconocer al pre-miRNA y transportarlo al citoplasma en una manera dependiente de RAN guanosina trifosfato, una proteína nuclear relacionada a *Ras* (Lund et al., 2004). Una vez en el citoplasma, otro complejo que incluye a la RNasa tipo III, Dicer, y a la proteína transactivadora de unión a RNA (TRBP), realizar un segundo corte sobre el pre-miRNA para generar una molécula de RNA de doble cadena de 18 a 24 nucleótidos de longitud, que contiene dos potenciales miRNAs maduros. Este dúplex de RNA se asocia a un complejo proteínico denominado complejo silenciador inducido por RNA (RISC). Una de las dos cadenas de RNA es seleccionada por el RISC para actuar como cadena guía, esta cadena constituye el miRNA maduro (Figura 2). La cadena restante, también denominada cadena "pasajero" es degradada por la acción de la proteína del complejo RISC, Argonauta 2 (Ago 2). Se piensa que el RISC selecciona la cadena con menor estabilidad termodinámica de apareamiento como la cadena guía, al mismo tiempo que degrada a la cadena pasajero, más estable. Sin embargo, Ro y colaboradores muestran evidencia de que ambas cadenas del dúplex de RNA son susceptibles de ser incorporadas al RISC y co-existir en ciertos tejidos, para actuar sobre diferentes poblaciones de mRNAs (Ro et al., 2007).



**Figura 2. Biogénesis de miRNAs.** Un transcrito primario denominado pri-miRNA es generado por la RNA polimerasa II. El pri-miRNA es reconocido y procesado por el complejo de la RNAasa tipo III Drosha y su cofactor DGCR8, lo que da lugar a un precursor denominado pre-miRNA, que es exportado al citoplasma por el factor exportina-5. Finalmente, el miRNA maduro es producido por la acción de la RNAasa tipo III Dicer; y es posteriormente integrado al complejo RISC para ejercer su acción.

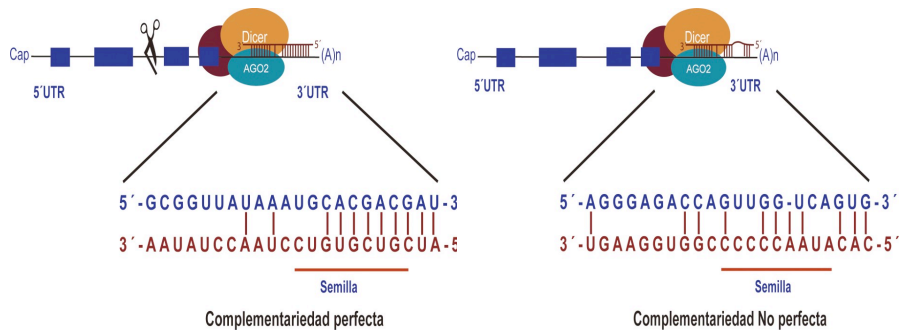
### MECANISMO DE ACCIÓN DE MICRORNAs

De manera general, los miRNAs establecen un apareamiento de bases con una secuencia de 6 a 8 nucleótidos que se localiza en la región 3'UTR del mRNA, denominada secuencia semilla (Brennecke et al., 2005; Rajewsky and Socci, 2004). El apareamiento del miRNA con su mRNA blanco conduce a la degradación de este último o a la represión de su traducción. El grado de complementariedad entre el miRNA y su mRNA blanco determina el mecanismo de regulación. Si la

## 192 Papel de los andrógenos en el desarrollo de cancer de próstata

complementariedad exhibida es perfecta, el miRNA induce la escisión del mRNA por acción del RISC. Usualmente, la escisión ocurre dentro de la región de complementariedad miRNA–mRNA y requiere de la participación de Ago2 (Liu et al., 2004). De manera alternativa, si la complementariedad es imperfecta, el RISC actúa silenciando ó bloqueando la traducción del mRNA, este último es el mecanismo que ocurre con mayor frecuencia en mamíferos (Figura 3). Este bloqueo no está del todo elucidado y parece llevarse a cabo durante la traducción, ya sea al inicio ó durante la etapa de elongación. Se ha demostrado que existe una represión del mecanismo de reconocimiento del CAP 5', en el que el miRNA impide la unión del factor de inicio de la traducción el F4F. La represión de la traducción mediada por miRNAs, también puede ocurrir al inhibirse el ensamblaje de la subunidad ribosomal 60S al complejo de iniciación de la traducción (Filipowicz et al., 2008). Aquellos mRNAs que han sido silenciados por los mecanismos mencionados son secuestrados dentro de un tipo de estructuras de procesamiento citoplasmáticas, denominadas cuerpos P, en donde son almacenados y, finalmente, degradados por acción de proteínas que también se encuentran dentro de los cuerpos P, tales como las enzimas que degradan el CAP 5'; Dcp1/Dcp2 y la exonucleasa 3'→5' Xrn1; y las que eliminan progresivamente la poliadenialción en 3' como el complejo Ccr4p/Pop2p/Not. De hecho, todo el conjunto del RISC se encuentra también dentro de estos cuerpos P, por lo que este también puede ensamblar la maquinaria que conlleva al decaimiento de los mRNA (Liu et al., 2005; Parker and Sheth, 2007). De manera interesante, la versatilidad en el modo de acción de los miRNAs no se limita a inhibir la expresión génica de ciertos productos biológicamente funcionales. También se ha demostrado que, de manera opuesta, su presencia y asociación a otros factores, p.ej. la proteína relacionada al síndrome del X frágil, puede inducir e incrementar la traducción del transcrito sobre el que ejercen su efecto, más que impedirlo (Vasudevan et al., 2007).





**Figura 3. Mecanismo de acción de miRNAs.** El complejo miRNA-RISC dirige la acción de represión de la traducción del transcrito blanco. Si la complementariedad es perfecta entre el miRNA y la región semilla del transcrito, este último es degradado. Si es incompleta, se produce un bloqueo de la traducción.

#### PAPEL DE LOS MICRORNAs EN LA APARICIÓN Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER

El crecimiento celular durante el desarrollo animal depende de señales moleculares que coordinan cuidadosamente los procesos de proliferación, de muerte celular y la velocidad a la cual estos se llevan a cabo. Sin embargo, el cáncer se caracteriza por un crecimiento celular en el cual la identidad de las células se ha perdido, existe proliferación extensa y alteración del proceso de muerte celular. Interesantemente, las primeras pistas de la asociación entre los miRNAs y la presencia de un fenotipo cancerígeno en humanos provinieron de los estudios mencionados en *C. elegans*. La demostración de que la pérdida de funcionalidad de *lin-4* resulta en anomalías de la diferenciación celular específicas del nemátodo (Wightman et al., 1993), condujo a establecer una analogía con los procesos de formación de tumores en los que existe una falla en la ejecución del programa de diferenciación celular. Posteriormente, estudios realizados en *Drosophila* mostraron que el miRNA *bantam* estimula la proliferación celular y al mismo tiempo, previene la apoptosis (Brennecke et al., 2003), lo que sugiere que los homólogos putativos de *bantam* en vertebrados podrían actuar como oncogenes.

El vínculo más directo entre la función de miRNAs y el cáncer en humanos fue quizá demostrado en el estudio realizado por Calin y

colaboradores en el 2002. En dicho estudio se observó que *miR-15a* y *miR-16-1* se encuentran codificados en la región cromosómica 13q14, que frecuentemente se encuentra deletada en pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL). Por consiguiente, *miR-15a* y *miR-16-1* se encuentran ausentes o sub-expresados en tejidos de pacientes con B-CLL (Calin et al., 2002). Más aun, posteriormente se reportó que ambos miRNAs tenían como blanco de acción la región 3' UTR del transcrito del gen *BCL2*, el cual resulta ser un potente inhibidor de la apoptosis (Cimmino et al., 2005). Lo anterior sugiere contundentemente una actividad supresora de tumores para estos dos miRNAs. Posteriormente, se demostró la expresión de una firma molecular específica de 13 miRNAs, que incluye a *miR-15a* y *miR-16-1*, asociada a la aparición y progreso de la B-CLL (Calin et al., 2005).

Más de la mitad de los miRNAs se encuentran localizados en regiones del genoma humano susceptibles de sufrir amplificaciones, deleciones o rearrreglos en tumores malignos, lo que refuerza las hipótesis acerca del importante papel de los miRNAs en la patogénesis del cáncer (Calin et al., 2004). Por otra parte, estudios subsecuentes han mostrado que los perfiles de expresión de los miRNAs proporcionan información importante acerca del estado de diferenciación y el linaje celular en diferentes tipos de tumores. Estos perfiles de expresión de miRNAs, también permiten la clasificación del tejido de origen de tumores pobremente diferenciados con mayor exactitud de la que permite el análisis de expresión de mRNAs de las mismas muestras (Lu et al., 2005). Con base en esta información, podría decirse que la historia del desarrollo de un tumor está reflejada en su patrón de expresión de miRNAs particular. En el estudio mencionado, también se muestra que más de la mitad de los miRNAs examinados se encuentran expresados a un nivel inferior en tumores, en comparación con tejidos sanos del mismo tipo e independientemente del tipo celular, lo que refleja el papel de los miRNAs en la diferenciación celular terminal y que la diferenciación incompleta en células cancerosas está fuertemente asociada a su disminuída expresión.

#### **MICRORNAS CON ACTIVIDAD ONCOGÉNICA**

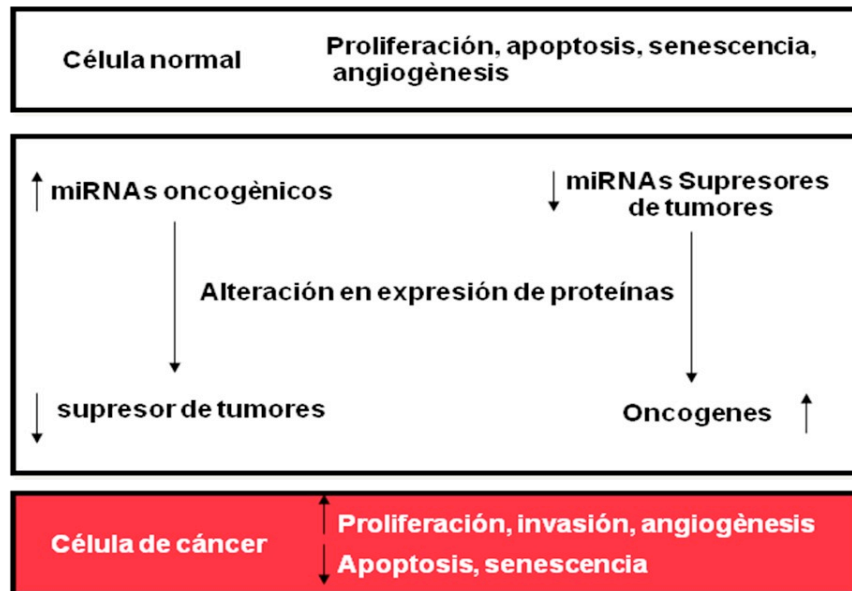
Aquellos miRNAs que contribuyen a la proliferación celular y la actividad anti-apoptótica se dice que son promotores de la actividad oncogénica y, por lo tanto, están sobre-expresados en células tumorales. Uno de los ejemplos más conocidos de un miRNA con actividad oncogénica es *miR-21*, el cual se encuentra sobre-expresado en una gran variedad de tumores, incluyendo al cáncer de mama, el hepatocelular y el

colorectal. Dos de los blancos identificados para *miR-21* son los genes *PTEN* y *PDCDA* con actividad supresora de tumores y que están implicados en procesos invasivos y metastásicos (Asangani et al., 2008; Meng et al., 2007; Zhu et al., 2008). Otro, es el ejemplo de un locus con propiedades de oncogén. Se trata del grupo ó cluster *mir-17-92*, que codifica a siete miRNAs, que se encuentra localizado en un intrón dentro de la región del cromosoma humano 13q31.3 y frecuentemente está amplificado en diversos tipos de linfomas y tumores sólidos (Hayashita et al., 2005). En general, la información acerca de los miRNAs oncogénicos indica que su papel principal consiste en regular negativamente a genes supresores de tumores que al estar disminuídos favorecen los procesos invasivos y de metástasis en el cáncer.

#### **MICRORNAS CON ACTIVIDAD SUPRESORA DE TUMORES**

Aquellos miRNAs que presentan actividad que previene la proliferación celular y promueve la apoptosis se pueden categorizar como supresores de tumores. Por lo general, la expresión de estos miRNAs se encuentra disminuída en células cancerosas, en comparación con las de tejido sano. Además de los ya mencionados *miR-15a* y *miR-16-1*, existen otros ejemplos de este tipo de miRNAs. La familia *let-7* consiste en un grupo altamente conservado en muchas especies, incluyendo a *C. elegans*, *Drosophila*, y vertebrados. Dentro de esta familia, *let-7* es un miRNA que ejerce una regulación negativa sobre tres genes *RAS*, oncogenes conocidos en humanos. La expresión de *let-7* se encuentra significativamente disminuida en tejidos de tumor pulmonar y la expresión de la proteína *RAS* incrementada, en relación al tejido de normal (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2005). Se han reportado otros blancos de *let-7*, como el transcrito del gen *HMG2* que tiene un conocido papel oncogénico en una gran variedad de tumores. Éste es un ejemplo en el que la supresión de un oncogén por la acción de un miRNA se ve superada en células tumorales por una sobre-expresión del gen *HMG2*, con una translocación que elimina la región 3'UTR complementaria de *let-7*, lo que impide que este último ejerza su acción de regulación negativa (Lee and Dutta, 2007). Los miRNAs, en teoría, pueden actuar sobre más de un mRNA; por lo tanto, un mismo miRNA podría tener acciones potenciales como un oncogén, si su blanco es el transcrito de un gen supresor de tumor o como un supresor de tumores, si su blanco es el transcrito de un oncogén. Aunque se ha encontrado que la expresión diferencial de muchos miRNAs en células cancerosas es significativa, a la fecha no se conoce con exactitud su función ni la totalidad de sus blancos moleculares. En la figura 2 se presenta un

196 Papel de los andrógenos en el desarrollo de cancer de próstata  
 esquema que muestra de manera general la asociación entre la expresión de miRNAs y su alteración en cáncer.



**Figura 4. Alteración de miRNAs y sus consecuencias sobre la carcinogénesis.** La acción de un miRNA puede considerarse oncogénica, si sus blancos son transcritos que codifican para supresores de tumores. Si, por el contrario, sus blancos son transcritos de oncogenes, se considera como un miRNA con acción de supresor de tumor.

#### EXPRESIÓN ABERRANTE DE MICRORNAs EN CaP

La progresión del CaP es un proceso que implica múltiples alteraciones moleculares, muchas de las cuales se reflejan en cambios de la expresión genética de las células tumorales. Debido al papel regulatorio de los miRNA en la expresión de diversos genes y a su especificidad tisular, es evidente que la identificación de miRNAs relacionados al CaP podría aportar información valiosa sobre las alteraciones moleculares asociadas a la patogénesis del CaP. Recientemente, se ha reportado la expresión de miRNAs en muestras clínicas de CaP. En un trabajo sobre el perfil de expresión de 228 miRNAs en 56 muestras de CaP y 7 de tejido prostático normal, se logró identificar la expresión diferencial significativa de 42 miRNAs. De los miRNAs identificados, 39 (87%) se encontraban sobre-expresados y 6

(13%) estaban sub-expresados, en las muestras de CaP (Volinia et al., 2006). Alternativamente, en otro estudio, analizaron el perfil de expresión para 319 miRNAs en 9 muestras de CaP y 4 de HPB y lograron detectar 50 miRNAs expresados diferencialmente. De estos, 36 (72%) mostraron estar sub-expresado en muestras de CaP, mientras que 14 (28%) se encontraban sobre-expresadas en las mismas muestras (Porkka et al., 2007). Entre estos dos estudios existen discrepancias que pueden ser atribuibles en gran medida a las diferentes metodologías aplicadas, lo que indica que el análisis del perfil de expresión de miRNAs en muestras clínicas de CaP no es un asunto trivial. Reportes más recientes, han mostrado que la expresión de miRNAs se encuentra regulada a la baja de manera significativa en tejidos de CaP con respecto a tejido protático benigno (Ambs et al., 2008; Tong et al., 2009), datos que coinciden con los reportados en el trabajo de Porkka et al. de 2007. Interesantemente, dicho trabajo mostró que es posible separar a las muestras de HPB de las de CaP, con base en su perfil de expresión de miRNAs particular. Más aún, las muestras de carcinomas fueron clasificadas de acuerdo a su dependencia androgénica. Teniendo cuatro de los cinco carcinomas sin tratamiento hormonal agrupados en un subgrupo; mientras que los cuatro refractarios a terapia hormonal, se localizaron dentro un subgrupo propio (Para mayor detalle ver tabla 1). Ésto muestra que la expresión de los miRNAs en un tejido tumoral pueden proporcionar información valiosa que permita su clasificación y que puede ser aprovechada en el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico de tipos de cáncer que actualmente carecen de marcadores moleculares exactos, como en el caso del CaP.

**TABLA 1.** miRNA que tienen expresión alterada en muestras clínicas de CaP con respecto a controles de tejido normal. \*\*Expresión idéntica entre dos ó más estudios; \*discrepancia en el resultado de expresión entre dos o más estudios.

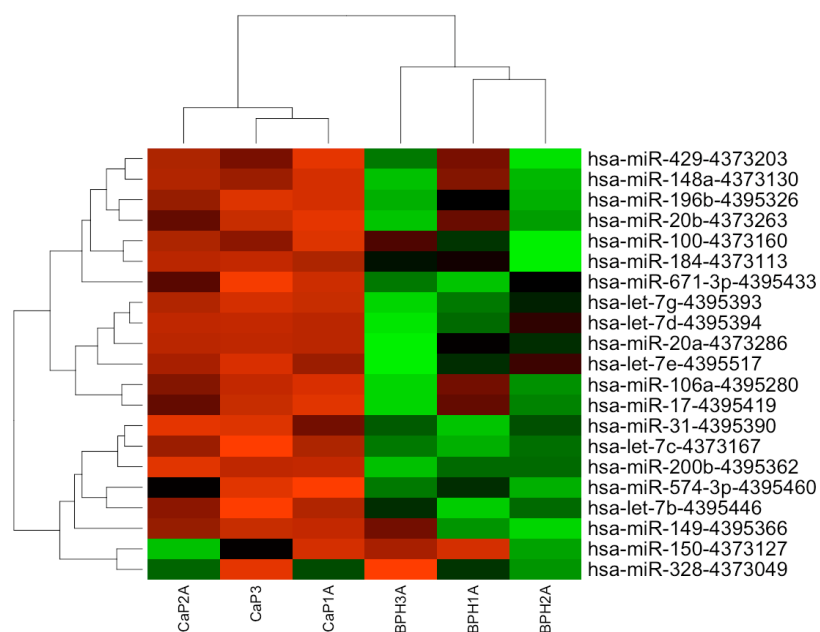
(Volinia et al., 2006)		(Porkka et al., 2007)				(Tong et al., 2009)	(Ambs et al., 2008)	
Sobre-expresados	Sub-expresados	Sobre-expresados	Sub-expresados		Sub-expresados	Sobre-expresados	Sub-expresados	
(39 miRNA)	(6 miRNA)	(14 miRNA)	(36 miRNA)		(5 miRNA)	(20 miRNA)	(20 miRNA)	
<b>En todos los carcinomas</b>								
<i>let-7d*</i>	<i>miR-106a</i>	<i>let-7a**</i>	<i>miR-202</i>	<i>let-7a**</i>	<i>miR-143</i>	<i>miR-23b**</i>	<i>miR-182</i>	<i>miR-494</i>
<i>let-7i **</i>	<i>miR-124a</i>	<i>miR-24</i>	<i>miR-210</i>	<i>let-7b</i>	<i>miR-145</i>	<i>miR-100</i>	<i>miR-31</i>	<i>miR-490</i>
<i>miR-16*</i>	<i>miR-135</i>	<i>miR-29<sup>a</sup></i>	<i>miR-296</i>	<i>let-7c</i>	<i>miR-195*</i>	<i>miR-145**</i>	<i>miR-26a-1/2</i>	<i>miR-133a-1</i>
<i>miR-17-5p</i>	<i>miR-146</i>	<i>miR-128<sup>a</sup></i>	<i>miR-320</i>	<i>let-7d*</i>	<i>miR-199a</i>	<i>miR-221**</i>	<i>miR-200c</i>	<i>miR-1-2</i>
<i>miR-20a</i>	<i>miR-148</i>	<i>miR-149</i>	<i>miR-370</i>	<i>let-7g</i>	<i>miR-221</i>	<i>miR-222**</i>	<i>miR-375</i>	<i>miR-218-2</i>
<i>miR-21</i>	<i>miR-181b</i>	<i>miR-218</i>	<i>miR-373</i>	<i>miR-16*</i>	<i>miR-222</i>		<i>miR-196a-1/2</i>	<i>miR-220</i>
<i>miR-25**</i>	<i>miR-184**</i>		<i>miR-498</i>	<i>miR-23a</i>	<i>miR-497</i>		<i>miR-370</i>	<i>miR-128a</i>
<i>miR-26a*</i>	<i>miR-187</i>		<i>miR-503</i>	<i>miR-23b</i>			<i>miR-425</i>	<i>miR-221</i>
<i>miR-27a*</i>	<i>miR-191</i>			<i>miR-26a*</i>			<i>miR-194-1/2</i>	<i>miR-499</i>
<i>miR-29a*</i>	<i>miR-195*</i>			<i>miR-92*</i>			<i>miR-181a-1/2</i>	<i>miR-329</i>
<i>miR-29b*</i>	<i>miR-196</i>			<i>miR-99</i>			<i>miR-34b</i>	<i>miR-340</i>
<i>miR-30c*</i>	<i>miR-197</i>			<i>miR-103</i>			<i>let-7i**</i>	<i>miR-345</i>
<i>miR-32</i>	<i>miR-198**</i>			<i>miR-125a</i>			<i>miR-188</i>	<i>miR-410</i>
<i>miR-34a</i>	<i>miR-199</i>			<i>miR-125b</i>			<i>miR-25**</i>	<i>miR-126</i>
<i>miR-92*</i>	<i>miR-203</i>		<b>En carcinomas refractarios a terapia hormonal</b>				<i>miR-106b</i>	<i>miR-205</i>
<i>miR-93**</i>	<i>miR-206</i>		<i>miR-184**</i>	<i>let-7f</i>	<i>miR-30a_5p</i>		<i>miR-449</i>	<i>miR-7-1/2</i>
<i>miR-95</i>	<i>miR-214</i>		<i>miR-198**</i>	<i>miR-19b</i>	<i>miR-30b</i>		<i>miR-99b</i>	<i>miR-145**</i>
<i>miR-101</i>	<i>miR-223</i>		<i>miR-302c</i>	<i>miR-22</i>	<i>miR-30c</i>		<i>miR-93**</i>	<i>miR-34a</i>
			<i>miR-345</i>	<i>miR-26b</i>	<i>miR-100</i>		<i>miR-92-1/2</i>	<i>miR-487</i>
			<i>miR-491</i>	<i>miR-27a</i>	<i>miR-141</i>		<i>miR-125a</i>	<i>let-7b</i>
			<i>miR-513</i>	<i>miR-27b</i>	<i>miR-148a</i>			
				<i>miR-29a</i>	<i>miR-205</i>			
				<i>miR-29b</i>				

**PERFILES DE MICRORNAs EN CIRCULACIÓN Y EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

En diversos estudios se ha mostrado que es factible utilizar mRNAs aislados de orina como marcadores de CaP. Particularmente, la determinación del mRNA no codificante *PCA3* ha mostrado una sensibilidad y una especificidad de 0.69 y 0.86, respectivamente (Groskopf et al., 2006). El poder para discriminar entre CaP y otro tipo de neoplasias no malignas como la HPB se incrementa considerablemente con el uso combinado de varios marcadores. En su mayoría, los estudios que asocian a los miRNAs con cáncer han empleado muestras de piezas quirúrgicas, de biopsias, líneas celulares de CaP (Ambs et al., 2008; Lu et al., 2005; Porkka et al., 2007; Tong and Nemunaitis, 2008; Volinia et al., 2006); o han utilizado miRNAs extraídos de tejidos embebidos fijados con formalina y embebidos en parafina (Liu et al., 2009). Por otra parte, existen varios trabajos que describen miRNAs que son específicos para diferentes tipos de cáncer y la relación entre la expresión de miRNAs con el estadio del cáncer (Calin and Croce, 2006; Croce, 2009; Garzon et al., 2006). Estos estudios han demostrado la utilidad de los miRNAs en el diagnóstico y pronóstico de diferentes tipos de cáncer; así como, en la diferenciación entre neoplasias benignas y las de tipo maligno. Se han logrado avances en el desarrollo de métodos para el estudio de miRNAs presentes en tejidos de órganos y en células. Sin embargo, aún se desconoce mucho acerca de su presencia en fluidos; hecho que ha limitado su posible uso diagnóstico. Recientemente, se reportó la elevación significativa de miRNAs en mujeres embarazadas con respecto a las no-embarazadas (Gilad et al., 2008). En otro estudio se demostró la presencia de miRNAs de origen placentario en plasma de la madre (Chim et al., 2008). En adición a estos estudios, se ha demostrado que fluidos como la sangre (Mitchell et al., 2008), la saliva (Park et al., 2009) e incluso la orina (Hanke et al., 2009) contienen miRNAs en cantidad detectable; y que dichas moléculas se encuentran en una forma relativamente estable y protegidas de la degradación. En particular el estudio de Mitchell y colaboradores, determinó que miR-141 podía diferenciar a individuos con CaP de individuos sanos. En otro trabajo de Taylor y Gercel-Taylor, se realizó la extracción de miRNAs a partir de exosomas aislados de muestras séricas de pacientes con cáncer de ovario. La estrategia empleada permitió identificar ocho miRNAs que se encuentran sobre-expresados en cáncer. El trabajo de Hanke, es el único a la fecha que ha reportado la extracción y cuantificación de miRNAs en muestras de orina de pacientes con cáncer de vejiga.

**IDENTIFICACIÓN DE miRNAs ESPECÍFICOS DE CaP EN MUESTRAS DE URINA**

Dada la evidencia anterior, en nuestro grupo se realizó un trabajo en el que se comparó el perfil de expresión de miRNAs en muestras de orina de pacientes con diagnóstico de CaP y pacientes con HPB. De manera general, se logró identificar un grupo de 21 miRNAs que muestran diferencias significativas entre los grupos del estudio. De este conjunto, identificamos sobre-expresión de 19 miRNAs (*miR-196b*, *-574-3p*, *let-7b*, *-7c*, *-7d*, *7e*, *-7g*, *miR-200b*, *-149*, *-20b*, *-17*, *-184*, *-20a*, *-106a*, *-671-3p*, *-148a*, *-429*, *-31*, *-100*); y solo dos mostraron estar sub-expresados (*miR-150*, *-328*).



**Figura 5.** Mapa de calor mostrando el agrupamiento jerárquico no supervisado basado en el grupo de microRNAs que muestran diferencias significativas de expresión entre el grupo de CaP y el de HPB. El nivel de expresión se representa por un código de color. Sub-expresión (verde), sobre-expresión (rojo), sin cambio (negro).

El agrupamiento jerárquico que se representan en el mapa de calor de la figura 7 muestra que este perfil de miRNAs de orina permiten separar a las muestras del grupo de CaP de las del grupo de HPB. Un aspecto interesante a destacar de todos estos estudios, es el hecho de que los patrones de expresión de miRNAs en circulación y en fluidos



como la orina, parecen ser considerablemente distintos de los observados en muestras de tejido y líneas celulares. En nuestro estudio, encontramos mayoritariamente, una expresión incrementada de varios miRNAs en muestras de CaP. En concordancia con nuestros resultados, el estudio de Mitchell et al (2008) y el realizado por Park et al (2009) en saliva también muestran una sobre-expresión de miRNAs. Esta discrepancia entre los patrones de expresión de miRNAs en tejido y en fluidos puede deberse a diversos factores. De manera directa podemos inferir que las diferentes técnicas experimentales y métodos de análisis contribuyen a las diferencias observadas entre los diferentes perfiles. Otra posibilidad, es que la presencia miRNAs en circulación y en fluidos sea producto de procesos como la lisis de las células tumorales. Más aún, recientemente se ha demostrado que los miRNAs son transportados activamente en vesículas de tamaño nanométrico denominadas exosomas y que son secretados en mayor medida por las células de cáncer. Por lo anterior, es posible que los exosomas sean una fuente importante de miRNAs en fluidos (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Es evidente que la falta de concordancia entre los diferentes perfiles de expresión y el hecho de que la información sobre el uso de miRNAs como biomarcadores esté asociada principalmente con estudios en muestras de tejidos sólidos y líneas celulares; representa una limitación para la utilización de miRNAs obtenidos de fluidos en el diagnóstico y pronóstico para diversas patologías como el cáncer. Lo anterior plantea la necesidad de definir una firma molecular que sea representativa del estado de las células de cáncer, en un contexto biológico determinado.

#### **BLANCOS MOLECULARES DE MICRORNAs ALTERADOS EN CaP**

En años recientes, el descubrimiento de la regulación genética dependiente de miRNAs en eucariontes ha motivado el desarrollo de nuevas estrategias de investigación que permitan elucidar los rasgos importantes de sus funciones biológicas, tanto en el desarrollo celular normal como en el que da lugar a patologías en humanos. Día con día se incrementa el número de miRNAs descubiertos en diferentes tipos de células, y con ello, la evidencia acerca de su papel regulatorio. Las estimaciones actuales predicen que cerca del 30% de los genes humanos se encuentran regulados por algún miRNA (Rajewsky, 2006) y que cada miRNA tiene aproximadamente 200 transcritos blanco, en vertebrados. Más aun, diferentes combinaciones de miRNAs pueden estar expresadas en distintos tipos de células y pueden regular de manera coordinada genes que son específicos de un tipo celular y un tejido en especial (Brennecke et al., 2005; Krek et al., 2005). Existen diversos ejemplos que

## 202 Papel de los andrógenos en el desarrollo de cancer de próstata

se pueden destacar, uno de ellos es el de *miR106b*, que se encuentra sobre-expresado en diferentes tipos de neoplasias malignas. Este miRNA ha sido asociado a diferentes genes que regulan el ciclo celular. Entre sus posibles transcritos blancos, destaca el inhibidor de cinasa dependiente de ciclina *p21/CDKN1A*. Reprimiendo la expresión de la proteína p21, *miR-106b* contribuye a la proliferación celular en cáncer (Ivanovska et al., 2008). Otro ejemplo es *miR-196b*, que en células progenitoras de médula ósea conduce a un incremento de la capacidad de proliferación, supervivencia y pérdida de diferenciación celular; contribuyendo, de esta manera, al desarrollo de leucemia (Coskun et al., 2010). Otro miRNA interesante de nuestro perfil es *miR-150*. Es ampliamente reconocido su papel en la diferenciación de linfocitos. En este contexto, un blanco interesante de *miR-150* es el factor de transcripción c-Myb (Lin et al., 2008). Sin embargo, también se ha identificado a *miR-150* como un promotor de cáncer gástrico, al reprimir la expresión del factor pro-apoptótico EGR2 (Wu et al., 2010). Resulta lógico pensar que *miR-150* es un oncogén en tejido gástrico; no obstante, hemos observado que se encuentra sub-expresado en CaP. De manera semejante, los miRNAs de la familia *let-7* han sido ampliamente reportados como reguladores de oncogenes que participan en vías como *Ras* y *HMGA2* (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2005). Por otra parte, *miR-200b* y *miR-429*, ambos miembros de la familia de miRNAs que incluye además a *miR-200a* y *miR-200c*; han sido identificados como reguladores de los genes *ZEB1* y *ZEB2*, que actúan como represores de la transcripción de caderina-E, promoviendo así, la capacidad de migración e invasividad durante la progresión del CaP (Gregory et al., 2008). Por otra parte, es importante considerar que la regulación de la expresión génica mediada por miRNAs está determinada no únicamente por el nivel de expresión de dichas moléculas, sino por un número de factores que conducen a su acción molecular. Tal es el caso de la alteración en la expresión de la proteína Ago2, cuya cantidad influye sobre la degradación de los transcritos blanco (Brennecke et al., 2005; Krek et al., 2005; Liu et al., 2004). Por consiguiente, una reducción en la expresión de Ago2, ocasionaría a su vez, una disminución en la efectividad de la acción de los miRNAs sobre sus blancos moleculares.

**RETOS Y PERSPECTIVAS SOBRE EL USO DE MICRORNAs EN ORINA COMO MARCADORES DE CaP**

Existe una creciente evidencia a favor del valor que tienen los miRNAs aislados a partir de fluidos biológicos, como biomarcadores para diversas patologías. La identificación de un conjunto de miRNAs en orina, que reflejen los cambios fenotípicos que ocurren en las células prostáticas durante su transformación hacia células de cáncer, representa la posibilidad de desarrollar poderosas herramientas moleculares para predecir con mayor exactitud la evolución de las lesiones prostáticas; con especial énfasis en aquellas que son, potencialmente, precursoras de CaP. No obstante las ventajas que supondría el tener una firma molecular específica para CaP, basada en miRNAs procedentes de orina, aún hay desafíos y preguntas importantes que resolver. Primero, en su gran mayoría, los miRNAs asociados a CaP no han sido caracterizados en cuanto a la regulación que ejercen y los efectos biológicos de dicha regulación. Segundo se desconoce el papel que juegan los miRNAs en la transición del CaP hacia la condición de andrógeno independencencia. Finalmente, la presencia de miRNAs en fluidos y en circulación plantea cuestionamientos relativos a su papel como posibles mensajeros de la comunicación intercelular y a la relevancia que éste tiene en el proceso de metástasis del CaP.

**REFERENCIAS**

1. Ambs,S., Prueitt,R.L., Yi,M., Hudson,R.S., Howe,T.M., Petrocca,F., Wallace,T.A., Liu,C.G., Volinia,S., Calin,G.A., Yfantis,H.G., Stephens,R.M., and Croce,C.M. 2008. Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res.* 68, 6162-6170.
2. Asangani,I.A., Rasheed,S.A., Nikolova,D.A., Leupold,J.H., Colburn,N.H., Post,S., and Allgayer,H. 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdc4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 27, 2128-2136.
3. Brennecke,J., Hipfner,D.R., Stark,A., Russell,R.B., and Cohen,S.M. 2003. bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell* 113, 25-36.

4. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS. Biol.* 3, e85.
5. Bushati, N. and Cohen, S.M. 2007. microRNA functions. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 23, 175-205.
6. Bussemakers, M.J., van, B.A., Verhaegh, G.W., Smit, F.P., Karthaus, H.F., Schalken, J.A., Debruyne, F.M., Ru, N., and Isaacs, W.B. 1999. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 59, 5975-5979.
7. Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 10, 1957-1966.
8. Calin, G.A. and Croce, C.M. 2006. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* 6, 857-866.
9. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., and Croce, C.M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15524-15529.
10. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di, L.G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., and Croce, C.M. 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1793-1801.
11. Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M.L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T.J., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C.M. 2004. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 11755-11760.
12. Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., and Lo, Y.M. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin. Chem.* 54, 482-490.

13. Cimmino,A., Calin,G.A., Fabbri,M., Iorio,M.V., Ferracin,M., Shimizu,M., Wojcik,S.E., Aqeilan,R.I., Zupo,S., Dono,M., Rassenti,L., Alder,H., Volinia,S., Liu,C.G., Kipps,T.J., Negrini,M., and Croce,C.M. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 13944-13949.
14. Coskun,E., von der Heide,E.K., Schlee,C., Kuhn,A., Gokbuget,N., Hoelzer,D., Hofmann,W.K., Thiel,E., and Baldus,C.D. 2010. The role of microRNA-196a and microRNA-196b as ERG regulators in acute myeloid leukemia and acute T-lymphoblastic leukemia. *Leuk. Res.*
15. Croce,C.M. 2009. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 10, 704-714.
16. De Marzo,A.M., Meeker,A.K., Zha,S., Luo,J., Nakayama,M., Platz,E.A., Isaacs,W.B., and Nelson,W.G. 2003. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 62, 55-62.
17. De Marzo,A.M., Platz,E.A., Sutcliffe,S., Xu,J., Gronberg,H., Drake,C.G., Nakai,Y., Isaacs,W.B., and Nelson,W.G. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat. Rev. Cancer* 7, 256-269.
18. DeMarzo,A.M., Nelson,W.G., Isaacs,W.B., and Epstein,J.I. 2003. Pathological and molecular aspects of prostate cancer. *Lancet* 361, 955-964.
19. Filipowicz,W., Bhattacharyya,S.N., and Sonenberg,N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* 9, 102-114.
20. Garcia,M., Jemal,A., Ward,E.M., Center,M.M., Hao,Y., Siegel,R.L., and Thun,M.J. 2007. *Global Cancer Facts & Figures 2007*. American Cancer Society.
21. Garzon,R., Pichiorri,F., Palumbo,T., Iuliano,R., Cimmino,A., Aqeilan,R., Volinia,S., Bhatt,D., Alder,H., Marcucci,G., Calin,G.A., Liu,C.G., Bloomfield,C.D., Andreeff,M., and Croce,C.M. 2006. MicroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 5078-5083.
22. Gilad,S., Meiri,E., Yogev,Y., Benjamin,S., Lebanony,D., Yerushalmi,N., Benjamin,H., Kushnir,M., Cholakh,H., Melamed,N.,

206 Papel de los andrógenos en el desarrollo de cancer de próstata

Bentwich,Z., Hod,M., Goren,Y., and Chajut,A. 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS. One.* 3, e3148.

23. Gregory,P.A., Bert,A.G., Paterson,E.L., Barry,S.C., Tsykin,A., Farshid,G., Vadas,M.A., Khew-Goodall,Y., and Goodall,G.J. 2008. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* 10, 593-601.

24. Groskopf,J., Aubin,S.M., Deras,I.L., Blase,A., Bodrug,S., Clark,C., Brentano,S., Mathis,J., Pham,J., Meyer,T., Cass,M., Hodge,P., Macairan,M.L., Marks,L.S., and Rittenhouse,H. 2006. APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin. Chem.* 52, 1089-1095.

25. Hanke,M., Hoefig,K., Merz,H., Feller,A.C., Kausch,I., Jocham,D., Warnecke,J.M., and Sczakiel,G. 2009. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol. Oncol.*

26. Hayashita,Y., Osada,H., Tatematsu,Y., Yamada,H., Yanagisawa,K., Tomida,S., Yatabe,Y., Kawahara,K., Sekido,Y., and Takahashi,T. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* 65, 9628-9632.

27. INEGI. Estadísticas a Proposito del dia mundial contra el cancer 2009. 2009. Ref Type: Grant

28. Ivanovska,I., Ball,A.S., Diaz,R.L., Magnus,J.F., Kibukawa,M., Schelter,J.M., Kobayashi,S.V., Lim,L., Burchard,J., Jackson,A.L., Linsley,P.S., and Cleary,M.A. 2008. MicroRNAs in the miR-106b family regulate p21/CDKN1A and promote cell cycle progression. *Mol. Cell Biol.* 28, 2167-2174.

29. Johnson,C.D., Esquela-Kerscher,A., Stefani,G., Byrom,M., Kelnar,K., Ovcharenko,D., Wilson,M., Wang,X., Shelton,J., Shingara,J., Chin,L., Brown,D., and Slack,F.J. 2007. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res.* 67, 7713-7722.

30. Johnson,S.M., Grosshans,H., Shingara,J., Byrom,M., Jarvis,R., Cheng,A., Labourier,E., Reinert,K.L., Brown,D., and Slack,F.J. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 120, 635-647.

31. Joshua, A.M., Evans, A., Van der Kwast, T., Zielenska, M., Meeker, A.K., Chinnaiyan, A., and Squire, J.A. 2008. Prostatic preneoplasia and beyond. *Biochim. Biophys. Acta* 1785, 156-181.
32. Kim, V.N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 376-385.
33. Krek, A., Grun, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., Macmenamin, P., da, P., I, Gunsalus, K.C., Stoffel, M., and Rajewsky, N. 2005. Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495-500.
34. Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843-854.
35. Lee, Y.S. and Dutta, A. 2007. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the *HMGA2* oncogene. *Genes Dev.* 21, 1025-1030.
36. Lin, Y.C., Kuo, M.W., Yu, J., Kuo, H.H., Lin, R.J., Lo, W.L., and Yu, A.L. 2008. c-Myb is an evolutionary conserved miR-150 target and miR-150/c-Myb interaction is important for embryonic development. *Mol. Biol. Evol.* 25, 2189-2198.
37. Liu, A., Tetzlaff, M.T., Vanbelle, P., Elder, D., Feldman, M., Tobias, J.W., Sepulveda, A.R., and Xu, X. 2009. MicroRNA expression profiling outperforms mRNA expression profiling in formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2, 519-527.
38. Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. 2004. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437-1441.
39. Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. 2005. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol.* 7, 719-723.
40. Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., Downing, J.R., Jacks, T., Horvitz, H.R., and Golub, T.R. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834-838.

208 Papel de los andrógenos en el desarrollo de cancer de próstata

41. Lund,E., Guttinger,S., Calado,A., Dahlberg,J.E., and Kutay,U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95-98.
42. Meng,F., Henson,R., Wehbe-Janek,H., Ghoshal,K., Jacob,S.T., and Patel,T. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 133, 647-658.
43. 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., Gentleman,R., Vessella,R.L., Nelson,P.S., Martin,D.B., and Tewari,M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 10513-10518.
44. Oelke,M. and Gravas,S. 2010. Relevance of benign prostatic hyperplasia and associated conditions for urologists, health care systems, and society. *World J. Urol.*
45. Park,N.J., Zhou,H., Elashoff,D., Henson,B.S., Kastratovic,D.A., Abemayor,E., and Wong,D.T. 2009. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin. Cancer Res.* 15, 5473-5477.
46. Parker,R. and Sheth,U. 2007. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol. Cell* 25, 635-646.
47. Pienta,K.J. and Bradley,D. 2006. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin. Cancer Res.* 12, 1665-1671.
48. Porkka,K.P., Pfeiffer,M.J., Waltering,K.K., Vessella,R.L., Tammela,T.L., and Visakorpi,T. 2007. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.* 67, 6130-6135.
49. Rajewsky,N. 2006. microRNA target predictions in animals. *Nat. Genet.* 38 *Suppl*, S8-13.
50. Rajewsky,N. and Succi,N.D. 2004. Computational identification of microRNA targets. *Dev. Biol.* 267, 529-535.
51. Rana,T.M. 2007. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 23-36.



52. Reynolds, M.A., Kastury, K., Groskopf, J., Schalken, J.A., and Rittenhouse, H. 2007. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett.* **249**, 5-13.
53. Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. 2007. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* **35**, 5944-5953.
54. Roehrborn, C.G. 2005. Benign prostatic hyperplasia: an overview. *Rev. Urol.* **7 Suppl 9**, S3-S14.
55. Rubin, M.A. and De Marzo, A.M. 2004. Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod. Pathol.* **17**, 380-388.
56. Rubin, M.A., Zhou, M., Dhanasekaran, S.M., Varambally, S., Barrette, T.R., Sanda, M.G., Pienta, K.J., Ghosh, D., and Chinnaiyan, A.M. 2002. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* **287**, 1662-1670.
57. Schulz, W.A., Burchardt, M., and Cronauer, M.V. 2003. Molecular biology of prostate cancer. *Mol. Hum. Reprod.* **9**, 437-448.
58. Taylor, D.D. and Gercel-Taylor, C. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* **110**, 13-21.
59. Tomlins, S.A., Laxman, B., Varambally, S., Cao, X., Yu, J., Helgeson, B.E., Cao, Q., Prensner, J.R., Rubin, M.A., Shah, R.B., Mehra, R., and Chinnaiyan, A.M. 2008. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia.* **10**, 177-188.
60. Tong, A.W., Fulgham, P., Jay, C., Chen, P., Khalil, I., Liu, S., Senzer, N., Eklund, A.C., Han, J., and Nemunaitis, J. 2009. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther.* **16**, 206-216.
61. Tong, A.W. and Nemunaitis, J. 2008. Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer Gene Ther.* **15**, 341-355.
62. Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* **318**, 1931-1934.

63. Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., and Croce, C.M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *103*, 2257-2261.
64. Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* *75*, 855-862.
65. Wu, Q., Jin, H., Yang, Z., Luo, G., Lu, Y., Li, K., Ren, G., Su, T., Pan, Y., Feng, B., Xue, Z., Wang, X., and Fan, D. 2010. MiR-150 promotes gastric cancer proliferation by negatively regulating the pro-apoptotic gene *EGR2*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *392*, 340-345.
66. You, J., Cozzi, P., Walsh, B., Willcox, M., Kearsley, J., Russell, P., and Li, Y. 2010. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* *73*, 10-22.
67. Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., and Mo, Y.Y. 2008. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res.* *18*, 350-359.