



**Universidad Autónoma de Sinaloa**

Facultad de Ciencias Químico Biológicas



*Doctorado en Ciencias Biomédicas*

**“Identificación de polimorfismos y su relación con la expresión de los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146a-5p y 148b-3p en cáncer de próstata”**

**TESIS**

Que presenta

**M.C. Fernando Antonio Bergez Hernández**

Como requisito para obtener el grado de

**DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

Directores

**Dra. Eliakym Arámbula Meraz**

**Dra. Noemí García Magallanes**

Culiacán, Sinaloa, México, agosto de 2022



Dirección General de Bibliotecas  
Ciudad Universitaria  
Av. de las Américas y Blvd. Universitarios  
C. P. 80010 Culiacán, Sinaloa, México.  
Tel. (667) 713 78 32 y 712 50 57  
dgbuas@uas.edu.mx

## UAS-Dirección General de Bibliotecas

### Repositorio Institucional Buelna

#### Restricciones de uso

Todo el material contenido en la presente tesis está protegido por la Ley Federal de Derechos de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

Queda prohibido la reproducción parcial o total de esta tesis. El uso de imágenes, tablas, gráficas, texto y demás material que sea objeto de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente correctamente mencionando al o los autores del presente estudio empírico. Cualquier uso distinto, como el lucro, reproducción, edición o modificación sin autorización expresa de quienes gozan de la propiedad intelectual, será perseguido y sancionado por el Instituto Nacional de Derechos de Autor.

Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución-No Comercial  
Compartir Igual, 4.0 Internacional



## DEDICATORIAS

A mi familia, mi madre Elsa Hernández Sandoval, mi padre Antonio Bergez Lizárraga, mi hermana menor Elsa Leticia Bergez Hernández, mi hermana mayor Johanna Elizabeth Bergez Hernández, mi sobrino Jarek Zapata Bergez, mi sobrino Eliam Zapata Bergez y mi cuñado Jonathan Zapata Dehesa. Por ser la columna que me ha sostenido, apoyado e impulsado a lograr mis metas. Por confiar en mí y ver cosas que a veces ni yo veo en mí. Porque fueron los primeros y serán los últimos. Por siempre estar allí.

A mis amigos y compañeros Martín de Jesús Irigoyen Arredondo y Alejandra Paola Martínez Camberos, por ser mi fuente de apoyo durante estos años, por haber estado en diversas etapas de mi vida, por vivir incontables procesos conmigo, por comprenderme y tranquilizarme durante los días de angustia, por hacerme sonreír y por enseñarme que tres es mejor que uno. Por quedarse.

A quien se lo piense, a quien lo busque, a quien lo desee, a quien le cueste, a quien no pueda, a quien no soporte, a quien se quiera rendir, a quien se rindió... Lo lograrás, aquí o en otro lugar.

## AGRADECIMIENTOS

A mis Directoras de tesis, la Dra. Eliakym Arámbula Meraz y la Dra. Noemí García Magallanes por su apoyo, comprensión, paciencia y accesibilidad brindada en la realización de este trabajo. También gracias, por los consejos y lecciones que me ayudaron a crecer como persona y profesionista en esta etapa importante de mi vida.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas. A mis revisores de tesis y a cada Maestro del cuerpo docente. A los Coordinadores que estuvieron durante este trayecto y con quien finalizo, el Dr. Héctor Samuel López Moreno, por su apoyo incondicional y guía durante este proceso.

Agradezco ampliamente el apoyo académico de mi alma mater la Universidad Politécnica de Sinaloa por brindarme los recursos necesarios para culminar el proyecto durante el periodo de 2018 a 2022.

A la empresa CTR y al proyecto “Semilla de la Ciencia”, por su confianza e interés en mi proyecto y por el aporte invaluable de reactivos para la realización de este.

Así mismo reconozco y agradezco la colaboración del Gabinete de Radiología Diagnóstica e Imagen, Álvarez&Arrazola, principalmente al Dr. Marco Álvarez Arrazola, quien fue un mentor, un colaborador y amigo.

A CONACYT por la beca brindada durante mis años de estudio de posgrado.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE CUADROS.....	XII
I. RESUMEN .....	1
II. ABSTRACT .....	2
III. INTRODUCCIÓN .....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
4.1. Cáncer de próstata .....	5
4.1.1. Aspectos moleculares del Cáncer de Próstata .....	8
4.1.2. Estadificación.....	9
4.1.3. Factores de Riesgo.....	9
4.1.4. Clasificación histológica .....	10
4.1.5. Diagnóstico .....	11
4.2. MicroRNAs.....	13
4.2.1. Biogénesis .....	14
4.2.2. Interacción del miRNA con sus genes diana.....	20
4.2.3. Clasificación de miRNAs.....	21
4.2.4. Aplicaciones clínicas de los miRNAs.....	21

4.2.5. Mutaciones relacionadas con la expresión de miRNAs.....	22
4.3. Antecedentes.....	23
4.3.1. miRNA-141-3p.....	23
4.3.2. miR-145-5p.....	25
4.3.3. miR-146a-5p.....	27
4.3.4. miR-148b-3p.....	30
V. JUSTIFICACIÓN.....	33
VI. HIPÓTESIS.....	34
VII. OBJETIVOS.....	35
7.1. Objetivo general.....	35
7.2. Objetivos específicos.....	35
7.2.1. Cuantificar la expresión relativa de los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146a-5p y 148b-3p en tejido de pacientes con y sin CaP.....	35
7.2.2. Identificar polimorfismos en regiones cercanas de los miRNAs.....	35
7.2.3. Relacionar polimorfismos con el perfil de expresión de los miRNAs.	35
7.2.4. Correlacionar los parámetros clinicopatológicos con los patrones de expresión y los polimorfismos.....	35
VIII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36

8.1. Diseño experimental.....	36
8.2. Definición de la población.....	36
8.2.1. Tamaño de la muestra .....	36
8.2.2. Recolección de datos .....	36
8.3. Grupos de estudio .....	37
8.3.1. Criterios de exclusión .....	37
8.3.2. Criterios de eliminación .....	37
8.4. Obtención de la muestra.....	38
8.5. Extracción de ARN.....	38
8.6. Concentración e Integridad de ARN .....	39
8.7. RT-PCR .....	39
8.7.1. Amplificación y cuantificación de ADNc .....	41
8.8. Análisis de expresión génica relativa .....	44
8.9. Extracción de ADN .....	44
8.10. Concentración e integridad del ADN .....	45
8.11. Análisis de polimorfismos en miRNAs .....	46
8.12. Análisis estadístico .....	48
IX. RESULTADOS .....	49

9.1. Características generales de la población .....	49
9.1.1. Edad .....	49
9.1.2. Índice de masa corporal.....	50
9.1.3. Antecedentes heredofamiliares .....	53
9.1.4. Antígeno prostático específico.....	55
9.1.5. Escala de Gleason .....	57
9.2. Análisis de expresión relativa .....	60
9.2.1. Expresión relativa de miRNAs .....	60
9.3. Análisis de correlación .....	62
9.4 Análisis de mutaciones.....	65
9.4.1 miR148b-3p .....	65
9.4.2 Análisis por modelo de herencia.....	67
9.4.3 Frecuencias genóticas y alélicas y su asociación con CaP .....	69
9.4.4 Desequilibrio de ligamiento y análisis por haplotipos .....	71
9.4.5 Relación de las mutaciones con expresión del miR148b-3p.....	74
9.4.6 miR145-5p .....	78
9.4.7 Análisis por modelo de herencia de la mutación rs353291 .....	80



9.4.8 Frecuencias genotípicas y alélicas la mutación rs353291 y su asociación con CaP .....	82
9.4.9 Relación de la mutación rs353291 con la expresión del miR145b-5p ..	84
9.5 Curvas ROC y modelos de regresión logística binaria .....	87
X. DISCUSIÓN .....	90
10.1. Características clínicas de la población .....	91
10.2. Análisis del perfil de expresión relativa de miRNAs .....	93
10.3. Identificación y análisis de mutaciones .....	96
10.3.1. Mutaciones en regiones cercanas al miR145-5p .....	96
10.3.2. Mutaciones en regiones cercanas al miR148b-3p .....	98
10.4. Potencial discriminativo de los miRNAs .....	102
XI. CONCLUSIONES .....	104
11.1. Conclusión general .....	104
11.2 Conclusiones específicas .....	104
XII. LIMITACIONES DEL PROYECTO .....	105
XIII. BIBLIOGRAFÍA .....	106
XIV. ANEXOS .....	122
14.1. Perspectivas .....	122

14.2. Productos.....	122
14.2.1 Artículos publicados.....	122
14.2.2 Participación en congresos.....	123
14.2.3 Cursos tomados.....	124
XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES .....	125

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Anatomía por zonas de una próstata normal.....	7
Figura 2.	Biogénesis de miRNAs. ....	18
Figura 3.	Regulación postranscripcional por miRNAs.....	19
Figura 4.	Figura 4. Relación de los miRNAs con la patogénesis del CaP.....	32
Figura 5.	Análisis del miRNA normalizador mediante RefFinder. ....	43
Figura 6.	Edad de pacientes con y sin cáncer de próstata. ....	51
Figura 7.	IMC de pacientes con y sin cáncer de próstata. ....	52
Figura 8.	Antígeno prostático específico (PSA). ....	56
Figura 9.	Clasificación de pacientes con CaP mediante escala Gleason.....	58
Figura 10.	Análisis de expresión relativa de miRNAs. ....	61
Figura 11.	Análisis de correlación de la expresión génica entre miRNAs.....	63
Figura 12.	Análisis de expresión del miR148b3-p por haplotipos.....	77
Figura 13.	Expresión del miR145-5p por alelos de la mutación rs353291.....	86
Figura 14.	Curva ROC del miR148b-3p. ....	88
Figura 15.	Regulación de la expresión génica del miR148b-3p.....	101

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Primers para PCR y secuenciación de los miR145-5p y miR148b-3p.....	47
Cuadro 2. Relación entre antecedentes heredofamiliares y CaP. ....	54
Cuadro 3. Clasificación de pacientes con CaP mediante grados ISUP. ....	59
Cuadro 4. Correlación entre la expresión de miRNAs y características clínicas. ....	64
Cuadro 6. Mutaciones identificadas para el miR148b-3p. ....	66
Cuadro 7. Modelos de herencia de las mutaciones seleccionadas. ....	68
Cuadro 8. Frecuencias alélicas y genotípicas de mutaciones del miR148b-3p.....	70
Cuadro 9. Desequilibrio de ligamiento de las mutaciones del miR148b-3p.....	72
Cuadro 10. Relación de los haplotipos con la presencia de CaP.....	73
Cuadro 11. Análisis de diferencia de medias de la expresión del miR148b-3p entre los genotipos de las mutaciones en la población de estudio.....	75
Cuadro 12. Análisis de diferencia de medias de la expresión del miR148b-3p entre los alelos de las mutaciones en la población de estudio.....	76
Cuadro 13. Mutaciones identificadas para el miR145-5p. ....	79
Cuadro 14. Modelos de herencia de la mutación rs353291.....	81
Cuadro 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación rs353291.....	83

Cuadro 16. Diferencia de medias de la expresión del miR145-5p entre los genotipos de la mutación rs353291 .....	85
Cuadro 17. Modelos por regresión logística para clasificar pacientes con CaP. ....	89

## I. RESUMEN

El cáncer de próstata (CaP) es la principal causa de muerte por cáncer en varones mexicanos. Esta patología es compleja y heterogénea, por lo que dilucidar los mecanismos moleculares que llevan a su origen y progresión, es imperativo impactando en el desarrollo de nuevos biomarcadores o tratamientos específicos. Se ha observado una expresión diferencial en los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146-5p y 148b-3p en CaP, lo cual podría deberse a mutaciones en regiones cercanas a los miRNAs, sin embargo, los mecanismos moleculares que llevan a la desregulación de estos no han sido dilucidados. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es analizar la expresión de miRNAs y su relación con mutaciones en pacientes con y sin CaP. Se analizaron 71 pacientes, 41 de pacientes con CaP (grupo CAP) y 30 pacientes con patología (grupo BPD). Se observó subexpresión en los miR145-5p y miR148b-3p en pacientes con CaP ( $p = 0.03$  y  $p = 0.001$ , respectivamente). En el miR145-5p no se identificaron mutaciones relacionadas con su expresión. Para el miR148b-3p se identificó un conjunto de mutaciones en la región 54337042/54337043, las cuales fueron agrupadas en la mutación DelsAAG Unidas. El alelo anormal de esta mutación estuvo relacionado con CaP ( $p = 0.017$ ), se observó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión del miR148b-3p entre los pacientes portadores y no portadores del alelo mutado, identificando un mecanismo probablemente implicado en la desregulación del miR148b-3p.

**(Palabras clave:** Cáncer de próstata, microRNAs, expresión génica, mutaciones, regulación génica)

## II. ABSTRACT

Prostate cancer (PCa) is the leading cause of cancer death in Mexican men. This pathology is complex and heterogeneous, so elucidating the molecular mechanisms that lead to its origin and progression is imperative, impacting the development of new biomarkers or specific treatments. A differential expression of miRNAs 141-3p, 145-5p, 146-5p and 148b-3p has been observed in PCa, which could be due to mutations in regions close to the miRNAs, however, the molecular mechanisms that lead to the deregulation of these miRNAs have not been clarified. Therefore, the objective of this work is to analyze the expression of miRNAs and their relationship with mutations in patients with and without PCa. 71 patients were analyzed, 41 patients with PCa (CAP group) and 30 patients with a benign pathology (BPD group). Underexpression was observed in miR145-5p and miR148b-3p in PCa patients ( $p = 0.03$  and  $p = 0.001$ , respectively). In miR145-5p no mutations related to its expression were identified. For miR148b-3p, a set of mutations were identified in the 54337042/54337043 region, which were grouped into the mutation named DelsAAG Unidas. The abnormal allele of this mutation is related to PCa ( $p = 0.017$ ), a statistically significant difference was observed in the expression of miR148b-3p between carriers and non-carriers of the mutated allele, identifying a mechanism likely to be involved in the miR148b-3p deregulation.

**(Keywords:** Prostate cancer, microRNAs, gene expression, mutations, gene regulation)

### III. INTRODUCCIÓN

El CaP es un problema de salud pública a nivel mundial, en México es el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en hombres, representando el 29.9% de los nuevos casos, así mismo, en 2020 se reportaron 7,457 muertes por esta patología (GLOBOCAN, 2020). Múltiples eventos moleculares ocurren en la formación y progresión del CaP, destacando la metilación anormal del ADN, la activación de protooncogenes, la inactivación de mecanismos de reparación del ADN, inactivación de genes supresores de tumores y un incremento en la síntesis y actividad de factores de crecimiento y sus receptores (Rusell y cols., 1998). Los principales factores que pueden incrementar el riesgo de padecer CaP son la edad, siendo el factor de riesgo más importante, ya que es inusual que se presente en hombres menores de 45 años, y es muy frecuente en mayores de 65 años, aumentando en paralelo con la edad. El origen étnico parecer ser importante, ya que el CaP es más frecuente en hombres afrodescendientes, que en los varones caucásico y es menos frecuente en hombres asiáticos o indígenas. También los antecedentes heredofamiliares son importantes, ya que, tener tres familiares directos con CaP equivale a 11 veces el riesgo de desarrollar esta enfermedad (NIH, 2017). Las herramientas utilizadas actualmente para la detección de esta enfermedad tienen una eficacia limitada, por lo que dilucidar los mecanismos moleculares que llevan al origen y progresión del CaP, puede llevar al desarrollo de nuevos biomarcadores y tratamientos específicos (Djavan y Nasu, 2001). Los miRNAs son una clase de pequeños ARNs no codificantes, que se expresan de forma endógena en las células animales y vegetales. Éstos se han sugerido como importantes reguladores de funciones



biológicas (Porkka y cols., 2007). Las alteraciones en la expresión de miRNA pueden afectar procesos celulares importantes como el ciclo celular, proliferación o apoptosis, lo que proporciona una relación directa con el desarrollo y progresión del cáncer (Brase y cols., 2011). Dicha desregulación puede ser causada potencialmente mediante mutaciones en los genes o regiones cercanas a ellos. Las mutaciones en genes que codifican para miRNAs pueden afectar en al menos tres formas posibles a la función de estos: 1) alterando la transcripción del transcrito primario del miRNA, 2) Alterando el procesamiento del primimiRNA y el premiRNA y 3) a través de sus efectos en la modulación de la interacción miRNA-ARNm (Chacon-Cortes y cols., 2015). Se reportado distintos polimorfismos en genes que codifican para miRNAs siendo capaces de modificar su expresión (Chacon-Cortes y cols., 2015; Tian y cols., 2009; Wu y cols., 2008; Taganov y cols., 2006). Estos estudios evidencian que las mutaciones en genes que codifican para miRNAs pueden ser clave en la regulación de su expresión e incidir directamente en distintas patologías como el cáncer.

Diversos estudios han sugerido que los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146-5p y 148b-3p están relacionados con el desarrollo de CaP debido a que se han observado desregulados durante esta enfermedad, difiriendo claramente sus niveles de expresión frente a los pacientes con enfermedades benignas de la próstata (Wen-Xiu y cols., 2019; Sun y cols., 2014; Walter y cols., 2013; Xiao y cols., 2012). Además, se han reportado mutaciones en los genes que codifican para estos miRNAs y en regiones cercanas, siendo una posible explicación en la desregulación de estos (Damodaran y cols., 2020; Chu y cols., 2016; Chen y cols., 2014; Leng y cols., 2011).

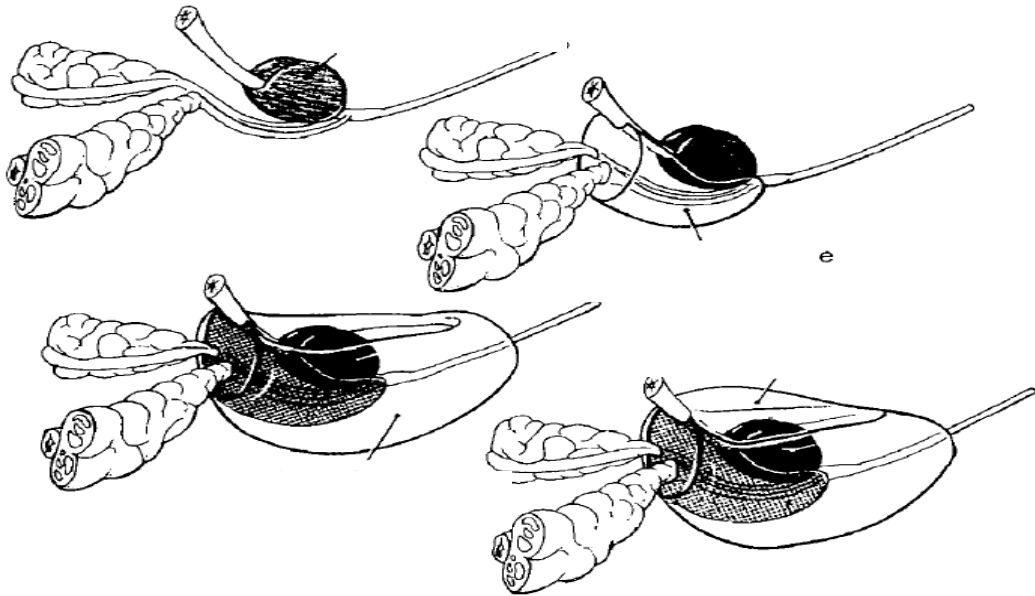
## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Cáncer de próstata

La próstata normal de un adulto está compuesta de una glándula epitelial y un compartimiento de estroma fibromuscular. Ambos compartimentos permanecen con niveles equilibrados de proliferación y muerte celular. La parte glandular de este órgano está compuesta de una gran zona periférica y una pequeña zona central, que juntas constituye aproximadamente el 95% de la glándula. El resto está compuesto de una zona de transición y las glándulas parauretrales. Aunque las zonas periféricas y de transición se pueden distinguir debido a sus relaciones anatómicas y la composición de sus elementos estromales, muestran una estructura acinar similar reflejando el origen común del seno urogenital (figura 1). Las glándulas de la zona central son morfológicamente distintas, posiblemente debido al origen embrionario del conducto mesonéfrico. Entre el 60-70% de los cánceres de próstata ocurren en la zona periférica y entre el 10-20% en la zona de transición. Solo entre el 5-10% de los cánceres se originan de la zona central. La hiperplasia benigna de próstata (HBP) se desarrolla mayormente del estroma periuretral y las glándulas de la zona de transición (Hammerich y cols., 2009).

El CaP es un problema de salud pública a nivel mundial, siendo el segundo cáncer con mayor incidencia en hombres en el mundo (14.1%). En 2020 se reportaron 1,414,259 nuevos casos de CaP a nivel mundial. En México es el cáncer con mayor incidencia y mortalidad en hombres, representando el 29.9% de los nuevos casos, así mismo, en 2020 se reportaron 7,457 muertes por esta patología (GLOBOCAN, 2020). En Sinaloa, los datos no han sido

actualizados desde el 2009, sin embargo, en dicho año la tasa de mortalidad fue de 23.6 por cada 100 mil varones, siendo ésta la sexta más alta de México (INEGI, 2009).



**Figura 1. Anatomía por zonas de una próstata normal.**

La zona anatómica comprende solo entre el 5-10% del tejido glandular de un hombre joven.

La zona central forma parte de la base de la próstata y es atravesado por los conductos eyaculatorios. La próstata está constituida por la zona periférica, particularmente distal al colículo seminal. Tomado de Hammerich y cols., (2009).

#### **4.1.1. Aspectos moleculares del Cáncer de Próstata**

Múltiples eventos moleculares ocurren en la formación y progresión del CaP, destacando: la metilación anormal del ADN, la activación de protooncogenes, la inactivación de mecanismos de reparación del ADN, inactivación de genes supresores de tumores y un incremento en la síntesis y actividad de factores de crecimiento y sus receptores (Rusell y cols., 1998). El desarrollo del CaP desde el punto de vista genético y molecular es un proceso secuencial, acumulativo, no necesariamente ordenado que conduce a que factores familiares, raciales, genotóxicos adquiridos y epigenéticos conformen una enfermedad con pasos bien definidos: Iniciación y progresión.

La iniciación del CaP implica la aparición de un cáncer histológico, no necesariamente evidente o clínico. Como en cualquier cáncer se activan oncogenes y se inactivan genes supresores de tumores. Estos eventos involucran siete factores definidos que en conjunto cumplen con un patrón semejante, los cuales son mutaciones en cromosomas 1 y 8, polimorfismos genéticos en 5 alfa reductasa y receptor de la vitamina D, polimorfismo del receptor androgénico, reactivación de la telomerasa, estrés oxidativo, factor de crecimiento IGF-I. La progresión del cáncer tiene, además, dos factores adicionales definidos, los cuales son: Incremento de expresión de metaloproteinasas e incremento de la expresión del Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). De la aparición de estos factores depende la transformación de ese foco o focos de adenocarcinoma, de una enfermedad histológica a una enfermedad evidente o clínica con capacidad de invasión local. Comprender la dinámica de estos procesos es fundamental para diferenciar aquellos pacientes que obtienen una biopsia

positiva, pero que son candidatos para observación, por presentar una enfermedad cuyo comportamiento predecible es de buen pronóstico (Uribe, 2005).

#### **4.1.2. Estadificación**

En el CaP se describen los siguientes estadios:

Estadio I: El cáncer se encuentra solo en la próstata y se detecta mediante una biopsia con aguja o en una pequeña cantidad de tejido durante una cirugía.

Estadio II: El cáncer está más avanzado que en el estadio I, pero no se diseminó fuera de la próstata. En el estadio IIA, el cáncer se encuentra en más de la mitad de un lóbulo de la próstata. En el estadio IIB, el cáncer se encuentra en lados opuestos de la próstata.

Estadio III: El cáncer se diseminó más allá de la capa externa de la próstata y se puede haber diseminado hasta las vesículas seminales.

Estadio IV: El cáncer se diseminó más allá de las vesículas seminales hasta el tejido o los órganos cercanos, como el recto, la vejiga o la pared pélvica. O se pudo haber diseminado en partes lejanas del cuerpo, que pueden incluir los ganglios linfáticos o los huesos (NIH, 2017).

#### **4.1.3. Factores de Riesgo**

A pesar de la elevada tasa de morbilidad, las causas que llevan al desarrollo de CaP no han sido bien dilucidadas. Por lo general, se han asociado a factores como la edad avanzada, etnicidad e historia familiar. Sin embargo, se tiene conocimiento de otros factores putativos de riesgo, entre los que se están la dieta, tabaquismo, sedentarismo y obesidad. Realizar

cambios en el estilo de vida y evitar la exposición a contaminantes parece disminuir la frecuencia en que se presenta la enfermedad, sin embargo, no se ha establecido de qué manera influyen estos factores en la patología (Schulz y cols., 2003).

Los principales factores que pueden incrementar el riesgo de padecer CaP son:

Edad: Es el factor de riesgo más importante, ya que es inusual que se presente en hombres menores de 45 años, y es muy frecuente en mayores de 65 años, aumentando en paralelo con la edad.

Origen étnico: El CaP es más frecuente en hombres de raza negra, que en los de raza blanca y es menos frecuente en hombres asiáticos o indígenas.

Antecedentes familiares: La hipótesis de Knudson postula que se necesitan 2 eventos negativos independientes para inactivar un gen dado. En este tipo de cáncer, tener tres familiares directos con CaP equivale a 11 veces el riesgo de desarrollar esta enfermedad (NIH, 2017; Carter y cols., 1993).

#### **4.1.4. Clasificación histológica**

Más del 95% de los cánceres primarios de próstata son adenocarcinomas. Los adenocarcinomas prostáticos son frecuentemente multifocales y heterogéneos en patrones de diferenciación. Un número de tumores raros se engloban entre el porcentaje restante de casos. Estos incluyen los tumores de células pequeñas, carcinoma acinar intralobular, carcinoma ductal, carcinoma de células claras y carcinoma mucinoso. La neoplasia intraepitelial prostática (NIP) se presenta comúnmente en asociación con adenocarcinoma

prostático. Éste se subdivide en bajo y alto grado. La forma de alto grado podría ser un precursor para adenocarcinoma (NIH, 2017). La NIP es un estado precanceroso del proceso de proliferación celular localizado en los ductos y acinos del epitelio glandular prostático, con cambios citológicos anticipatorios del cáncer como agrandamiento nuclear y nucleolar; es de predominancia en la zona periférica, igual que en el cáncer, pero que a diferencia de este posee una membrana basal y una línea de células basales adelgazada pero íntegra. Está claro que solo se reporta en biopsias el NIP de alto grado. Hasta un 2% de los focos de NIP pueden mostrar alteración de la capa de célula basales y disrupción de la membrana basal que son cambios histológicos muy cercanos al cáncer. El NIP tiene otras características semejantes al adenocarcinoma: multifocalidad, heterocigocidad genética y aneuploidía. El NIP precede al adenocarcinoma en unos cinco años e implica un riesgo para el paciente que lo porta de unas 15 veces de padecer en el futuro un tumor (Uribe, 2005).

#### **4.1.5. Diagnóstico**

Múltiples biomarcadores han sido analizados a lo largo del tiempo con el fin de identificar alguno que sea realmente confiable para la detección y pronóstico de CaP. Por ejemplo, la determinación del antígeno prostático específico (PSA) en circulación puede ser usado con precaución para el tamizaje de la enfermedad y el monitoreo de la respuesta al tratamiento. Este marcador no es específico para malignidad y pueden elevarse después de la manipulación de la próstata por examen digital y debido a otras patologías como la prostatitis e hiperplasia benigna de próstata, incluso se ha observado que los hombres obesos tienen menores concentraciones séricas de PSA que los individuos con normopeso, debido a



un mayor volumen plasmático dificultando el diagnóstico precoz del CaP en estos pacientes (Daniyal y cols., 2014; López-Fontana y cols., 2009). El análisis de PSA es una herramienta utilizada para la detección de CaP mediante el cual generalmente se considera como riesgo de padecer esta patología a un varón con un PSA mayor o igual a 4 µg/L. – pesar de no ser un biomarcador específico para distinguir entre varones con y sin CaP, se ha observado que el PSA es un buen marcador para el seguimiento de CaP debido a que aumenta en sangre conforme se desarrolla el tumor (Pezaro y cols., 2014; Stamey y cols, 1994). Recientemente se ha evaluado al gen del cáncer de próstata 3 (PCA3). Este es un gen que se sobreexpresa específicamente en CaP. En 2003, Hessels demostró la potencial utilidad clínica para PCA3 en orina. Este gen ha sido superior al PSA, logrando una especificidad del 72% y una sensibilidad del 58%. Por lo que se le ha sugerido como una posible prueba que pueda mejorar la exactitud en la detección del CaP, especialmente en la zona gris de detección dado por PSA (Saavedra-Briones y cols., 2010; Hessels y cols., 2003).

El diagnóstico de CaP está basado en un examen digital rectal y una biopsia (Daniyal y cols., 2014). Las muestras de biopsia se clasifican de forma histopatológica mediante el sistema de Gleason, el cual es el factor pronóstico más fuerte para la progresión del paciente. El sistema Gleason describe la apariencia histopatológica de las células de CaP mediante microscopía. Este sistema es definido por una escala del 1 al 5. Un CaP bien diferenciado (Gleason 1 o 2) se caracteriza por una proliferación de estructuras microacinares limitadas por células luminales prostáticas sin una membrana basal acompañándolas. Al menos algunas células neoplásicas contienen nucléolos prominentes. El valor 5 en la escala de

Gleason es el más alto e incluye un patrón sólido con necrosis central o infiltrado de células individuales.

Como el CaP usualmente es heterogéneo con dos o más grados en un determinado cáncer, se incluyen dos clasificaciones o grados en el sistema, uno primario (el más prevalente) y uno secundario (el segundo más prevalente). El grado primario y el secundario se suman para llegar al puntaje de Gleason. En consecuencia, las posibilidades de puntaje de Gleason están entre 2 (1+1) hasta 10 (5+5). Un cáncer con Gleason de 2 a 6 se considera de escasa agresividad, crecimiento lento y por lo tanto de mejor pronóstico, un cáncer con Gleason 7 es un cáncer con agresividad intermedia y un cáncer con Gleason 8 a 10 se considera de alta agresividad y con peor pronóstico (Hammerich y cols., 2009).

Claramente, los biomarcadores actuales para la detección de esta enfermedad tienen una eficacia limitada. Debido a ello las herramientas de biología molecular y la ingeniería genética actuales han ampliado las perspectivas con respecto al descubrimiento de nuevos biomarcadores genéticos, como la expresión de miRNAs específicos para la detección de patologías (Djavan y Nasu, 2001).

#### **4.2. MicroRNAs**

Los miRNAs son una clase de pequeños ARNs no codificantes, que se expresan de forma endógena en las células animales y vegetales. Regulan la expresión de genes codificantes de proteínas a nivel pos-transcripcional, ya sea mediante la activación de la degradación o la prevención de la traducción de los ARNm diana (Porkka y cols., 2007).

Éstos se han sugerido como importantes reguladores de funciones biológicas. Las alteraciones en la expresión de miRNA pueden afectar procesos celulares importantes como el ciclo celular, proliferación o apoptosis, lo que proporciona una relación directa con el desarrollo y progresión del cáncer (Brase y cols., 2011).

#### **4.2.1. Biogénesis**

Las secuencias de los miRNAs están distribuidas a través de todo el genoma, localizándose en regiones exónicas e intrónicas, así como en regiones intergénicas (Altuvia y cols., 2005). La biogénesis de los miRNAs empieza con su transcripción por la ARN polimerasa II, algunos otros miRNAs son transcritos por la ARN polimerasa III (Lee y cols., 2004; Borchert y cols., 2006), resultando en un transcrito primario llamado pri-miRNA que contiene una estructura de tallo de aproximadamente 33 pares de bases, un bucle terminal y dos secuencias flanqueantes monocatenarias de cientos de bases o incluso varias kilobases. En general, los pri-miRNAs presentan una caperuza (“cap”) en la región 5’ terminal y una cola de adeninas en la región 3’ terminal (Lee y cols., 2004; Cai y cols., 2004). Después de la transcripción, la ARNasa III Drosha procesa el pri-miRNA cortándolo aproximadamente a unos 11 nucleótidos de la zona de unión entre las regiones de ssARN y dsARN (Unión de SD) (Blaszczyk y cols., 2001). Durante la biogénesis, Drosha debe crear dos complejos diferentes para facilitar el corte del pri-miRNA. Uno de ellos está compuesto por las helicasas de ARN, p68 y p72, y las ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas (hnRPs). El otro complejo, conocido como microprocesador, está compuesto por Drosha y la proteína de la región crítica 8 del síndrome DiGeorge (DGCR8), una proteína que se une a un ARN de

doble cadena y estabiliza a Drosha a través de interacciones con su dominio C terminal (Han y cols., 2004; Han y cols., 2009). Además, DGCR8 dirige el corte de la unión de SD, por parte de Drosha (Han y cols.; 2006). La digestión de Drosha puede ocurrir junto con la transcripción o antes del empalme (Morlando y cols., 2008), y el producto de esta digestión es una molécula de ARN intermediaria conocida como pre-miRNA, el cual tiene aproximadamente 22 nucleótidos en el tallo y 48 nucleótidos en el bucle terminal (Romero-Cordoba y cols., 2014).

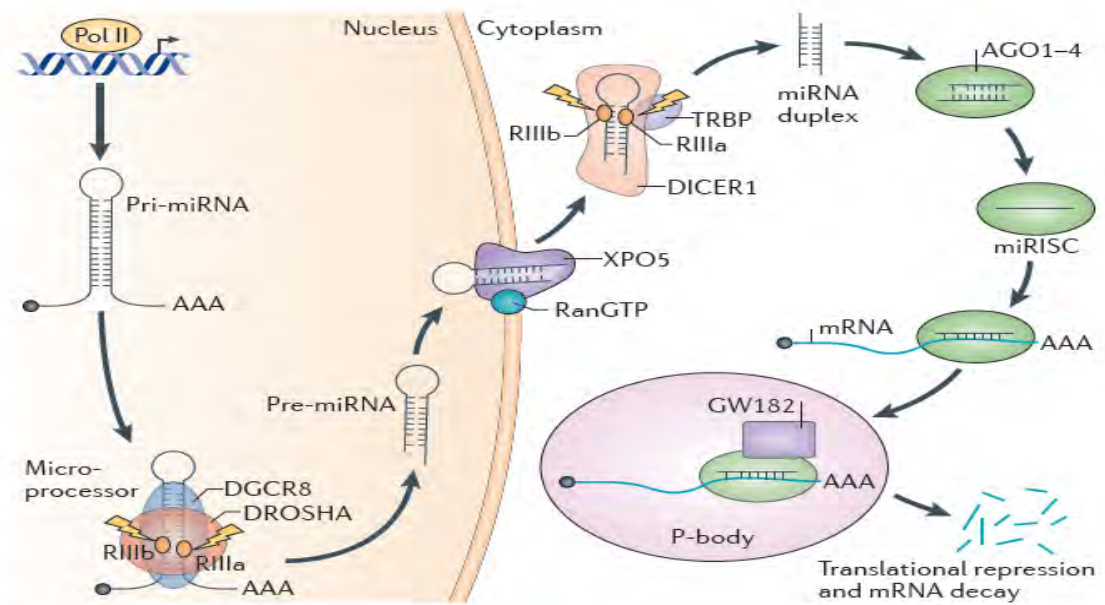
Alternativamente, pueden ocurrir algunas otras rutas de biogénesis durante el empalme del ARNm, dando lugar a “mirtrones”. Los mirtrones son intrones del ARNm empalmados, que constituyen pre-miRNAs funcionales, en este proceso no interviene Drosha (Berezikov y cols., 2007). Después de la generación del pre-miRNA, la Exportina 5 transporta los pre-miRNAs al citoplasma con un proceso dependiente de GTP (Yi y cols., 2003). La exportina también protege a los pre-miRNAs contra la degradación por nucleasas (Zeng y Cullen., 2004). Una vez en el citoplasma, la ARNasa III Dicer, digiere el pre-miRNA y lo convierte en un miRNA maduro de doble cadena de aproximadamente 22 nucleótidos (Gregory y cols., 2005; Feng y cols., 2012). En este proceso, Dicer se asocia con otras proteínas como TRBP y la quinasa PACT para incrementar su estabilidad y actividad de procesamiento. Dicer es una proteína esencial en la maduración del miRNA y su regulación negativa decrece los niveles del miRNA maduro (Romero Cordoba y cols., 2014).

Después de la generación del miRNA bicatenario, las cadenas se desenrollan en un proceso dependiente de ATP. Una cadena (cadena guía) es conducida por el complejo RISC,

formado por la asociación de Dicer, la proteína TAR de unión a ARN (TRBP), la proteína cinasa de activación-R (PACT), por lo general la proteína Argonata 2 (Ago2) (Chendrimada y cols., 2005; Maniataki y Mourelatos, 2005) y Gw182 que promueve la estabilidad de Argonata. El complejo resultante entre el miRNA maduro y RISC se denomina miRISC. En mamíferos la elección de la cadena guía es dictada por la estabilidad termodinámica, la cadena menos estable en la región 5' tiene más probabilidad de ser incorporada a RISC; la otra cadena (miRNA-cadena pasajera) es excluida y generalmente degradada. Sin embargo, la cadena pasajera también puede ser incorporada en el complejo RISC. Por ello, una secuencia de miRNA puede producir dos miRNAs maduros diferentes, cada uno teniendo diferentes dianas, y, por tanto, diferentes funciones biológicas (figura 2) (Romero-Cordoba y cols., 2014).

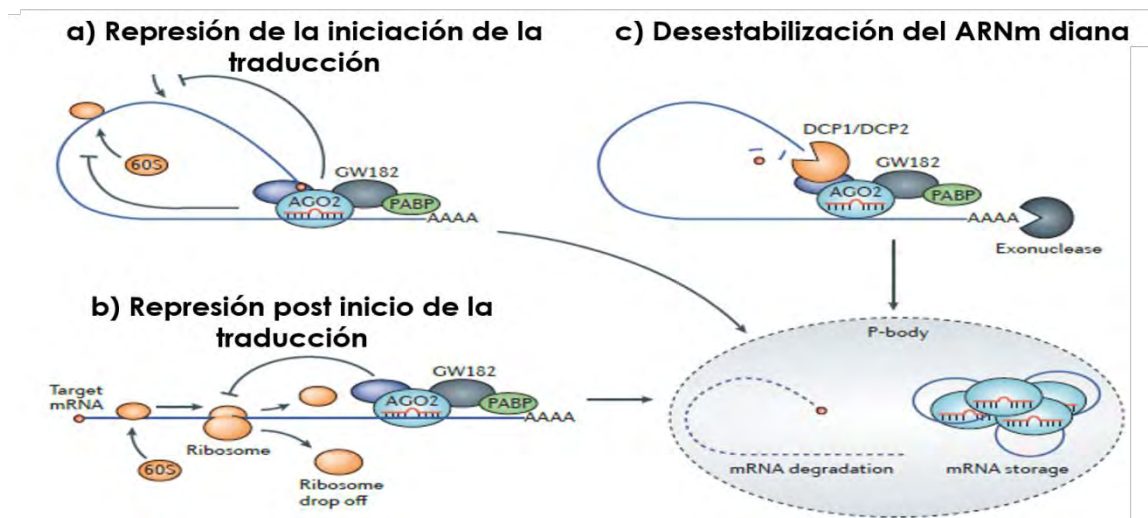
Finalmente, el complejo miRISC funciona como un guía para el reconocimiento de los ARNm dianas, basado en reglas de complementariedad, para regular negativamente los ARNm. Durante este proceso, Ago2, una proteína con actividad de nucleasa de ARN, junto con GW182, interactúa con la proteína citoplasmática de unión a poli-A PABP y las deadenilasas PAN2-PAN3 e ICCR4-NOT, las cuales juegan un papel central en el silenciamiento del ARNm mediado por miRNA. Hay al menos tres mecanismos posibles por los cuales el miRNA media la represión de la expresión génica: 1) Hibridación con el ARNm diana y degradación, 2) Inhibición de la traducción durante las fases de iniciación o elongación y 3) degradación del ARNm por su reclutamiento a cuerpos P, los cuales son regiones con altas tasas de degradación del ARNm vía deadenilación; aunque también se ha

identificado que en los cuerpos-P el ARNm puede ser almacenado y posteriormente liberado para su traducción (figura 3) (Romero-Cordoba y cols., 2014; Lugo-Trampe y Trujillo-Murillo, 2009).



**Figura 2. Biogénesis de miRNAs.**

La producción de miRNAs se inicia en el núcleo con la polimerización de la horquilla primaria de miRNA (pri-miRNA) por la ARN polimerasa II ó III, seguido por la disociación y la digestión de la pri-miRNA por el complejo microprocesador (Drosha-DGCR8). La transcripción resultante es el pre-miRNA, que se exporta al citoplasma por Exportina-5-Ran GTP. Una vez en el citoplasma las proteínas Dicer, TRBP y Paz escinden la horquilla de pre-miRNA produciendo un miRNA dúplex maduro. Después, una de las cadenas se une al complejo RISC y, finalmente, este guía al miRNA a su ARNm diana para silenciarlo por la degradación directa o por la represión de la traducción. Tomado de Lin y Gregory, (2015).



**Figura 3. Regulación postranscripcional por miRNAs.**

El complejo de silenciamiento mediado por miRNA (miRISCs) inhibe la iniciación de la traducción afectando el reconocimiento de la caperuza por el factor de iniciación de la traducción 4F (eIF4F), el reclutamiento de la subunidad ribosomal pequeña 40s y/o inhibiendo la incorporación de la subunidad 60s y así la formación del complejo ribosomal 80S. b) Represión post inicio de la traducción. El miRISC puede inhibir la elongación de los ribosomas, causando que se desprendan del ARNm y facilitando la degradación del péptido recién sintetizado. C) Desestabilizando el ARNm diana. La unión de miRISCs al ARNm diana puede reclutar enzimas que quitan la caperuza lo que lleva a la desestabilización del ARNm. Todos estos mecanismos convergen en la degradación y/o almacenamiento del ARNm en los cuerpos P. Modificado de Li y Ran, (2014).



#### 4.2.2. Interacción del miRNA con sus genes diana

Se ha demostrado que un solo miRNA puede tener el control de la expresión de más de un ARNm y que cada ARNm puede ser regulado por múltiples miRNAs. La región 5' del miRNA usualmente contribuye más a la especificidad y actividad de unión a sus ARNm diana. Las interacciones entre el miRNA y el ARNm por lo general están restringidas a la secuencia llamada "semilla" cerca del extremo terminal 5' del miRNA. La secuencia de ~6 a ~8 nucleótidos llamada "semilla" está altamente conservada entre las especies por lo que un leve cambio en la secuencia podría alterar el espectro de posibles uniones. También se ha sugerido que la localización de la horquilla central en el dúplex miRNA:ARNm podría jugar un papel clave, afectando la eficiencia de la regulación del gen mediada por miRNAs. La mayoría de los programas actuales consideran la complementariedad de secuencia miRNA-ARNm y la termodinámica del híbrido miRNA-ARNm, otros consideran la conservación de secuencias blanco entre las especies y algunos más toman en cuenta la estructura secundaria del ARNm y los cambios después de la formación del híbrido miRNA-ARNm (Cai y cols., 2009; Lugo-Trampe y Trujillo-Murillo, 2009).

Los miRNAs controlan la expresión de sus dianas por apareamiento de bases a motivos de secuencia en el UTR 3' del ARNm con una complementariedad perfecta o casi perfecta. Análisis de sitios de unión al miRNA han indicado que los genes con los sitios UTR 3' más largos usualmente tienen una mayor densidad de sitios de unión a miRNAs y están implicados en la modulación del desarrollo, mientras que los genes con los UTRs 3' más cortos usualmente tienen menos densidad de sitios de unión a miRNA y tienden a estar

envueltos en procesos celulares básicos. Estos hechos enfatizan la importancia del UTR 3' en la interacción con los miRNAs (Cai y cols., 2009).

#### **4.2.3. Clasificación de miRNAs**

Se pueden distinguir dos tipos de miRNAs de acuerdo con su participación en la regulación de genes implicados en cáncer: Los miRNAs oncogénicos (oncomiRNAs) y los supresores de tumor (anti-oncomiRNAs).

Los oncomiRNAs, son miRNAs que promueven el desarrollo de tumores, regulando e inhibiendo genes supresores de tumor o controlando los genes que intervienen en la diferenciación celular o apoptosis (Esquela y Slack, 2006).

Los anti-oncomiRNAs pueden inhibir la tumorigénesis por represión de oncogenes. Estos miRNAs presentan actividad que previene la proliferación celular y promueve la apoptosis. La expresión de algunos anti-oncomiRNAs está disminuida en algunos cánceres, promoviendo así la expresión de oncogenes (Das y Pillai, 2015).

#### **4.2.4. Aplicaciones clínicas de los miRNAs**

Los miRNAs poseen las propiedades ideales de un biomarcador. En primer lugar, su expresión se haya frecuentemente desregulada en la mayoría de las enfermedades humanas. En segundo lugar, numerosos trabajos muestran que los miRNAs pueden ser utilizados para la estratificación, seguimiento, pronóstico e incluso terapéutica del cáncer (Haldrup y cols., 2014; Selth y cols., 2014; Brase y cols., 2010). En tercer lugar, estas moléculas circulan en el plasma, suero y orina lo que permitiría monitorizar sus niveles en sangre, de manera poco

invasiva para el paciente y con bajos costes para el sistema de salud. En cuarto lugar, los niveles de estos se mantienen estables por periodos de tiempo considerables ya que tienen una alta resistencia al ambiente extracelular, esto es debido a que los miRNAs forman complejos con proteínas o están embebidos en exosomas, haciéndolos resistentes a la acción de ribonucleasas, cambios en el pH y temperatura. En quinto lugar, la cuantificación de miRNAs es un método estandarizado y de fácil implementación en el laboratorio de biología molecular. Finalmente, recientemente comenzaron a publicarse estudios que demuestran robustas correlaciones entre los niveles de miRNAs con la clínica del paciente (estratificación, pronóstico, respuesta terapéutica) para diversas enfermedades, evidenciando así el importante valor clínico de los miRNAs (Medina-Villaamil y cols., 2014).

#### **4.2.5. Mutaciones relacionadas con la expresión de miRNAs.**

Las mutaciones en genes que codifican para miRNAs pueden afectar en al menos tres formas posibles a la función de estos: 1) alterando la transcripción del transcrito primario del miRNA, 2) Alterando el procesamiento del pri-miRNA y el pre-miRNA y 3) a través de sus efectos en la modulación de la interacción miRNA-ARNm (Chacon-Cortes y cols., 2015).

Se reportado distintos polimorfismos en genes que codifican para miRNAs siendo capaces de modificar su expresión. Por ejemplo, el rs2910146 es un polimorfismo en el miRNA-146<sup>a</sup>, evitando que este lleve a cabo su función de ser un mediador del factor de transcripción proapoptótico el factor nuclear  $\kappa$ B (Taganov y cols., 2006). SNPs en regiones específicas del pri-let-7e y el pri-miR-16 llevan a disminución en los niveles de miRNAs maduros en ambos casos (Wu y cols., 2008). El polimorfismo rs11614913 en el pre-miR-

196a-2 contribuye al riesgo de desarrollar cáncer de mama, pulmón y gástrico., afectando posiblemente tanto en la maduración del miRNA con en su especificidad en los ARNm diana (Tian y cols., 2009). Así mismo, también se ha reportado que existen mutaciones en regiones cercanas a la secuencia del miRNA que pueden ser parte de los mecanismos de regulación, en el caso del miR145-5p se ha reportado que una mutación río abajo a aproximadamente 450 pb del miRNA, se ha relacionado con cáncer de mama y los autores sugieren que podría ser un potencial regulador de este miRNA (Chacon-Cortes y cols., 2015). Estos estudios sugieren que las mutaciones en genes que codifican para miRNAs pueden ser clave en la regulación de su expresión e incidir directamente en distintas patologías, así mismo, en su capacidad para interactuar con diferentes ARNm.

### **4.3. Antecedentes**

Diversos estudios han sugerido que los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146-5p y 148b-3p están relacionados con el desarrollo de CaP debido a que se han observado desregulados durante esta enfermedad, difiriendo claramente sus niveles de expresión frente a los pacientes con enfermedades benignas de la próstata (Figura 4). Además, se han reportado mutaciones en los genes que codifican para estos miRNAs y en regiones cercanas, siendo una posible explicación en la desregulación de estos.

#### **4.3.1. miRNA-141-3p**

Este miRNA es codificado por un gen localizado en la región cromosómica 12p13.31. Además, forma parte de una familia de miRNAs llamada miR-200, esta familia incluye a los

miRNAs 200<sup>a</sup>, 200b, 200c, 141 y 429. Entre estos, existen dos subfamilias, miR-200bc/429 y miR-200<sup>a</sup>/141, cada una comparte entre miRNAs la misma secuencia de semilla y entre ambas solo difieren en el cuarto nucleótido. Además, estos miRNAs son expresados en clusters, por ejemplo, el miR-141 y 200c forman parte de un cluster en el cromosoma 12, los otros miRNAs forman parte del segundo cluster en el cromosoma 1, ambos clusters son expresados como dos transcritos separados de pri-miRNAs policistrónicos (Gao y cols., 2016). Se ha observado que la sobreexpresión del miR-141 promueve el crecimiento de las células de CaP, sin embargo, los mecanismos por los cuales contribuye al proceso de tumorigénesis aún no se han comprendido completamente. Se ha observado que este miRNA puede hibridar con los transcritos del gen NR0B2, este gen produce la proteína Shp que funciona como regulador. Específicamente en la próstata funciona como un represor para el receptor androgénico, por tanto, cuando este miRNA bloquea la expresión de este represor, el receptor androgénico se sobreexpresa, pudiendo así estar implicado en eventos de tumorigénesis (Xiao y cols., 2012).

En 2014, Osipov y cols., observaron mediante la técnica de qRT-PCR en plasma de pacientes rusos con CaP y sin CaP, que el miR-141 estaba sobreexpresado en los pacientes con la patología. Además, observaron la capacidad de este miRNA de discriminar de forma eficiente pacientes con CaP en una etapa temprana, existiendo incluso una correlación con la escala de Gleason.

Se han realizado muy pocos estudios donde se analicen polimorfismos en este miRNA, para nuestro conocimiento solo existe el trabajo realizado por Leng y cols., en 2011, quienes

analizaron SNPs en un grupo de miRNAs, entre ellos el miR-141 e intentaron asociarlo con cáncer de pulmón. Mediante secuenciación identificaron 6 polimorfismos en este miRNA, entre ellos el rs74057236 que es G/A, el rs7305746 que es un C/G, el rs58463981 que es un C/T y el rs16933011 que es un G/T, sin embargo, no observaron relación con dicho cáncer, de ahí la necesidad de analizarlos en otro tipo de cáncer y una población diferente (Leng y cols., 2011).

#### **4.3.2. miR-145-5p**

El miRNA 145-5p está localizado en la región cromosómica 5q32, cerca del miR-143. Ambos miRNAs se encuentran en un mismo cluster, por ello son expresados coordinadamente en una gran variedad de tejidos y líneas celulares (Wu y cols., 2016; Avgeris y cols., 2013). Generalmente, en cáncer este miRNA ha sido catalogado como un supresor de tumores, estando subexpresado tanto en muestras de pacientes como en líneas celulares de diversos tipos de cánceres, entre ellos, colorectal, de pulmón, mama y próstata (Wen-Xiu y cols., 2019; Wang y cols., 2015) Específicamente en CaP este miRNA se ha observado relacionado con diversos mecanismos que promueven el desarrollo de esta patología, por ejemplo, el grupo de investigación de Wen-Xiu observó que este miRNA tiene dos dianas que regulan de forma directa la invasión y migración celular: SWAP70 y HEF1. El primero es una proteína nuclear cuya sobreexpresión altera la organización de la actina y, por tanto, la morfología de la estructura que esta forma y HEF1 es una proteína citoplasmática que suprime a la Caderina E y promueve la transición epitelio mesenquimal (TEM) en cáncer de próstata (Wen-Xiu y cols., 2019). Más recientemente, se ha confirmado

que la subexpresión de este miRNA lleva a la sobreexpresión de genes asociados a la TEM (Jin y cols., 2020). Diversos estudios han relacionado los niveles de expresión de este miRNA con características propias del CaP, señalándolo como un candidato interesante en la detección y pronóstico de esta enfermedad. Wang y cols., en 2015 observaron que los niveles bajos de expresión de este miRNA están correlacionados con una recaída en cáncer y la muerte. Además, mediante estudios in vivo observaron que la subexpresión del miRNA estuvo correlacionada con el tamaño del tumor, estadio, actividad proliferativa y un mal pronóstico, lo que sugiere que el miRNA puede tener un interesante valor pronóstico para el futuro manejo de pacientes con CaP.

Aunque su papel como supresor de tumores ha sido mencionada por diversos autores, no se han realizado estudios suficientes que evalúen su utilidad clínica. Entre estos destaca el reportado por Avgeris y cols., en 2013, quienes analizaron el perfil de expresión de este miRNA en muestras de tumores de próstata, observando que la subexpresión del miRNA se correlacionaba con altos puntajes de Gleason, estadios avanzados y tumores más grandes, así como con el incremento en los niveles de PSA. Los pacientes con los menores niveles de este miRNA tenían un riesgo mayor de recurrencia. Al analizar la capacidad pronóstica de este miRNA observaron que este era capaz de distinguir pacientes con un alto riesgo de recaída y una pobre expectativa de supervivencia, independientemente del Gleason, estadio, niveles de PSA y edad.

Existen diversos factores que han sido relacionados con la subexpresión de este miRNA, por ejemplo, los polimorfismos de nucleótidos sencillo (SNP's) han sido sugeridos

como posibles causas en la expresión aberrante de miRNAs. Específicamente en este miRNA se han reportado polimorfismos asociados con distintas patologías, por ejemplo, los SNP rs353291, rs353293 y rs353292, se han relacionado con cáncer de mama, vejiga y colorectal (Wu y cols., 2016; Yuan y cols., 2016; Chacon-Cortes y cols., 2015). En CaP destaca el polimorfismo rs4705342 el cual provoca un cambio de timina por citocina, en la región promotora del miR-143, el cual es cotranscrito con el miR-145, por tanto, utilizan la misma región promotora. En población asiática se ha observado que los varones con los genotipos TC/CC tienen significativamente menor riesgo de tener CaP que aquellos con el genotipo TT. Los análisis de funcionalidad mostraron que el alelo T incrementa la afinidad de unión a proteínas y, por tanto, reduce la actividad del promotor, provocando una menor transcripción de este miRNA supresor de tumores (Chu y cols., 2016). En años más recientes se ha estudiado este polimorfismo en población europea donde se ha observado que a diferencia de la población asiática, el alelo C parece ser un factor de riesgo en varones serbios (Kotarac y cols., 2019).

Estos resultados evidencian la importancia de analizar mutaciones con el fin de identificar su implicación en la regulación de este miRNA y en la susceptibilidad en CaP.

#### **4.3.3. miR-146a-5p**

El miR-146<sup>a</sup> está localizado en la región 5q33.3. Este miRNA ha sido reportado como un supresor de tumores por diferentes autores, encontrándose subexpresado en diferentes tipos de cáncer, entre ellos CaP (Damodaran y cols., 2020; Sun y cols., 2014).



Específicamente en CaP se ha reportado que este miRNA es considerado como un modulador de la señal anticancerígena, observándose comúnmente subexpresado en pacientes con CaP (Huang y cols., 2017). Se han realizado estudios en líneas celulares y tejido con el fin de analizar el papel de este miRNA en CaP y se ha observado que este miRNA puede funcionar como un supresor de tumores al regular la expresión de Rac1, una proteína asociada a la metástasis de tumores (Sun y cols., 2014). En 2005, el grupo de Simon y cols., observó que este factor de transcripción podría promover la expresión de c-Fos, el cual a su vez ha sido reportado implicado en CaP debido a su capacidad de promover la expresión de las metaloproteinasas MMP-1 y MMP-9 (Wu y cols., 2015).

En población asiática se ha medido la expresión de este miRNA en suero de pacientes con CaP y se ha observado que los niveles de expresión de estuvieron relacionados de forma significativa con el estadio clínico, la presencia o ausencia de metástasis en hueso y con el PSA (Liu y cols., 2019). En años más recientes, el grupo de investigación de Fredsøe y cols., estudiaron 92 miRNAs en plasma de pacientes europeos con CaP comparados con pacientes con enfermedades benignas de la próstata y observaron que entre los cinco miRNAs con mayor desregulación se encontraba el miR146a-5p observándose subexpresado en pacientes con CaP. (Fredsøe y cols., 2020)

Diversos estudios han reportado polimorfismos que podrían ser potenciales reguladores de la expresión de este miRNA, sin embargo, el principal polimorfismo reportado en él es el rs2910164, el cual está localizado en el cromosoma 5q33 en la región de semilla del premiR-146a (Damodaran y cols., 2020). Este polimorfismo es un cambio de

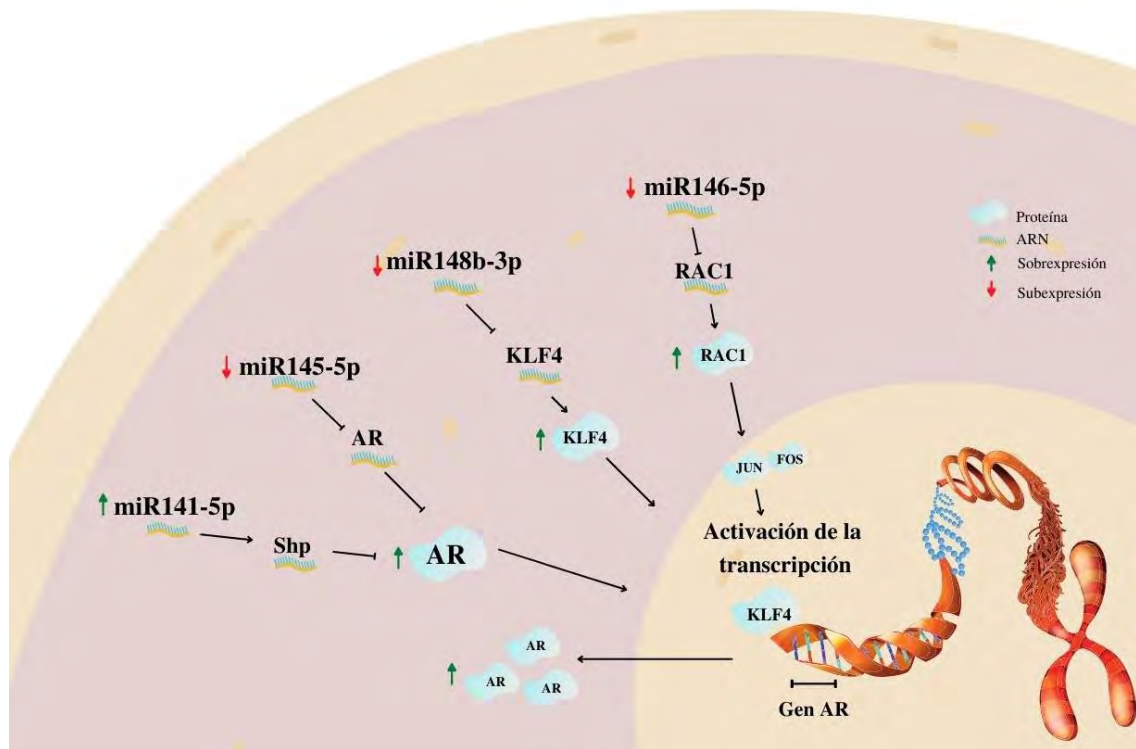
guanina por citocina, en 2010 el grupo de investigación de Xu y cols., observó que los individuos con el genotipo CC tenían un menor riesgo de CaP comparado con aquellos con genotipos GG/GC. Además, observaron que el cambio de G por C resulta en una expresión reducida de este miRNA en tejidos de CaP, por lo que sugirieron que este alelo puede ser una variante protectora. Sin embargo, el grupo de investigación sugirió que más estudios en diferentes grupos étnicos son necesarios para confirmar la relación de este SNP, la expresión del miRNA y CaP (Xu y cols., 2010). En 2014, el grupo de investigación de Chen y cols., analizó el papel pronóstico del SNP rs2910164 del miR-146<sup>a</sup> en población asiática, sin embargo, no observaron relación con recurrencia bioquímica, edad o estado patológico, aunque sí observaron una relación entre este SNP y la presencia de CaP (Chen y cols., 2014). En población europea también se ha analizado este miRNA, por ejemplo, el grupo de Nikolić y cols., realizado con varones de Serbia no encontró una relación entre este polimorfismo rs2910164 y un mayor riesgo a tener CaP. A pesar de ello, mencionan que sus resultados sugieren un papel de este polimorfismo y del miR-146<sup>a</sup> en la progresión de CaP, ya que observaron que ser heterocigoto se relacionaba con una mayor agresividad. Este grupo sugiere que la diferencias entre sus resultados y los observados en población China, podría deberse a las diferencias étnica que son claramente reflejadas en las frecuencias alélicas de polimorfismos. Con el fin de esclarecer un poco más, las diferencias entre los resultados observados entre población asiática y europea, se han realizado metanálisis de los diferentes estudios sobre el miRNA y este polimorfismo y se ha llegado a la misma conclusión, que el miRNA y su polimorfismo se asocian significativamente a CaP en pacientes asiáticos,

sugiriendo que los diferentes resultados observados en los distintos estudios en tejidos y líneas celulares puede reflejar los distintos papeles de este miRNA en diversos tipos de cáncer. Además, específicamente el genotipo CC está asociado con una disminución en la predisposición de CaP, siendo el mismo genotipo el que tuvo un mayor porcentaje de pacientes con un Gleason menor a 7, sugiriendo que este polimorfismo podría estar relacionado con el pronóstico de esta enfermedad.

#### **4.3.4. miR-148b-3p**

El miRNA 148 está localizado en la región cromosómica 12q13.13 y tiene un tamaño de 22 pb (Chen y cols., 2014). Existen estudios sobre la expresión de este miRNA en cáncer de próstata, sin embargo, hay diferentes conclusiones en cuanto su función como miRNA supresor u oncomiRNA. Este miRNA ha sido observado sobreexpresado en CaP, tanto en etapas tempranas como en una etapa metastásica (Watahiki y cols., 2011). El grupo de investigación de Walter y cols., en 2013 también observó que este miRNA se sobreexpresaba en tejido de tumores de la próstata, sin embargo, al analizar tumores de alto grado (mayor a 6 en la escala de Gleason) observaron estos existía subexpresión del miRNA (Walter y cols., 2013). Por otro lado, en población asiática se ha observado que este miRNA puede controlar la expresión de un factor de transcripción llamado KLF4, el cual regula la expresión de otros genes y es observado sobreexpresado en diferentes tejidos tumorales. Este grupo de investigación observó que el miRNA estuvo subexpresado en tejido tumoral y aquellos con los niveles más bajos estaban relacionados con un mal pronóstico, sugiriendo que el miRNA tiene la función de supresor de tumores, además, en sus experimentos in vitro observaron

que este puede inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis (Feng y cols., 2019). Al observar estos resultados surge la necesidad de conocer el comportamiento de este miRNA en distintas poblaciones. En cuanto a la regulación de este miRNA mediante polimorfismos de nucleótidos sencillo, el grupo de investigación de Chen y cols., en 2014 observó que el polimorfismo rs11170877 (A>G) específicamente el alelo G y el rs12231393 (T>C) específicamente el alelo C, estuvieron asociados como un factor protector para cáncer gástrico en pacientes chinos. El rs11170877 está localizado en el exón de COPZ1, este gen es el que contiene u hospeda al miR-148b. Estos dos polimorfismos forman un haplotipo debido al fenómeno de desequilibrio de ligamiento, este haplotipo mostró una asociación significativa con este cáncer (Chen y cols., 2014). A pesar de los interesantes resultados obtenidos con el polimorfismo rs11170877 en este tipo de cáncer, existen muy pocos estudios relacionando este SNP con otros tipos de cáncer e incluso en otro tipo de poblaciones.



**Figura 4. Relación de los miRNAs con la patogénesis del CaP.**

Los miRNAs 141-5p, 145-5p y 148b-3p, convergen en CaP, por su relación con la expresión del AR por medio de intermediarios como la proteína represora Shp, el factor de transcripción KLF4 o de forma directa. En el caso del miR46a-5p, este puede promover la expresión del factor de transcripción RAC1 el cual lleva a la activación de genes implicado en el desarrollo y progresión de CaP.

## V. JUSTIFICACIÓN

El Cáncer de próstata (CaP) es la principal causa de muerte por cáncer en varones mexicanos, convirtiéndose en un problema de salud pública que necesita atenderse. Existen diferentes mecanismos moleculares que son afectados durante la progresión de esta patología, entre ellos se han observado desregulaciones en la expresión génica de miRNAs. Estos ARNs pequeños no codificantes son capaces de regular la expresión de diferentes genes como los supresores de tumores y los protooncogenes, por lo que su desregulación podría impactar directamente en el desarrollo de patologías como el CaP. Específicamente los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146a-5p y 148b-3p han sido observados frecuentemente con una expresión diferencial en CaP, sin embargo, los mecanismos que llevan a dicha desregulación no han sido dilucidados en esta patología. Uno de los mecanismos más frecuentes de variación en nuestros genes y sus productos, son las mutaciones, pudiendo llevar a una sobreexpresión o subexpresión génica. Por estos motivos, resulta de gran importancia el análisis de la expresión de estos miRNAs y la identificación de mutaciones en regiones cercanas a ellos, con el fin de conocer sus mecanismos de regulación génica en CaP, sentando una base sólida del comportamiento de estas moléculas en el tejido prostático y para su posible uso como marcadores moleculares para varones mexicanos con CaP.

## **VI. HIPÓTESIS**

Los polimorfismos en regiones cercanas a los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146a-5p y 148b-3p están relacionados con su expresión diferencial en cáncer de próstata.

## **VII. OBJETIVOS**

### **7.1. Objetivo general**

Identificar polimorfismos y su relación con la expresión de los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146a-5p y 148b-3p en cáncer de próstata.

### **7.2. Objetivos específicos**

7.2.1. Cuantificar la expresión relativa de los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146a-5p y 148b-3p en tejido de pacientes con y sin CaP.

7.2.2. Identificar polimorfismos en regiones cercanas de los miRNAs.

7.2.3. Relacionar polimorfismos con el perfil de expresión de los miRNAs.

7.2.4. Correlacionar los parámetros clinicopatológicos con los patrones de expresión y los polimorfismos.



## VIII. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.1. Diseño experimental

Se realizó un estudio observacional, descriptivo, comparativo y transversal. El estudio biológico fue llevado a cabo *in vitro* donde se cuantificó la expresión y se identificaron polimorfismos en regiones cercanas de los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146<sup>a</sup>-5p y 148b-3p en tejido prostático de la población de estudio.

### 8.2. Definición de la población

Pacientes de sexo masculino mayores de 18 años que se atendían en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS Mazatlán) y/o en Álvarez & Arrazola Radiólogos, remitidos por el médico especialista para la obtención de biopsias por diagnóstico presuntivo de CaP.

#### 8.2.1. Tamaño de la muestra

Se capturaron muestras de tejido prostático de pacientes masculinos con diagnóstico presuntivo de CaP que acudan al IMSS Mazatlán y/o en Álvarez & Arrazola Radiólogos durante el período de febrero de 2018 a diciembre de 2021 y que aceptaron participar en el proyecto presentando la firma en su carta de consentimiento informado.

#### 8.2.2. Recolección de datos

La recolección de los datos se realizó mediante la aplicación de cuestionario directo a los pacientes.

### **8.3. Grupos de estudio**

En el estudio se incluyeron todos los pacientes varones mayores de 18 años que aceptaron participar en el estudio, estos fueron clasificados en dos grupos de estudio que se describen a continuación.

**Grupo CAP. Pacientes con cáncer de próstata.** Varones mayores de 18 años con diagnóstico de CaP confirmado por estudios histopatológicos que se atendían en el IMSS Culiacán y/o en Álvarez & Arrazola Radiólogos y que presentaron su firma voluntaria en la carta de consentimiento informado.

**Grupo BPD. Pacientes con patología benigna de la próstata.** Varones mayores de 18 años con patología benigna de la próstata y diagnóstico negativo de CaP confirmado por estudios histopatológicos y se atendían en el IMSS Culiacán y/o en Álvarez & Arrazola Radiólogos y que presentaron su firma voluntaria en la carta de consentimiento informado.

#### **8.3.1. Criterios de exclusión**

Varones con diagnóstico de CaP que estaban bajo tratamiento de quimioterapia o radioterapia.

#### **8.3.2. Criterios de eliminación**

Muestras no aptas para el estudio.

#### **8.4. Obtención de la muestra**

Teniendo el diagnóstico presuntivo de CaP y aceptada la participación en el proyecto, se procedió a la obtención de la muestra. La muestra de tejido prostático fue obtenida mediante una biopsia transrectal guiada por ultrasonido realizada por un médico especialista. Una vez obtenida la muestra, esta fue almacenada inmediatamente en Qiazol a  $-20^{\circ}\text{C}$  para su posterior análisis.

#### **8.5. Extracción de ARN**

A partir de la muestra de tejido prostático se procedió a la extracción de miRNAs utilizando el kit comercial de miRNeasy (Qiagen) (Masayuki Kano et al., 2010). La metodología realizar un homogenizado del tejido y el Qiazol mediante un homogeneizador biológico, después se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de cloroformo y se homogenizó de forma inmediata durante 15 segundos. Se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugó a 12.000 x g durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Después de la centrifugación, la muestra se separó en tres fases: la fase acuosa superior se transfirió a un tubo nuevo de recolección y se añadieron 675  $\mu\text{l}$  de etanol al 100% homogenizándolo por pipeteo. Se transfirieron 700  $\mu\text{L}$  del homogenizado a una columna Rnasy minElute que contiene una membrana de sílice y se centrifugó a 8,000 g durante 15 segundos. Se desechó el líquido y se lavó la columna con 700  $\mu\text{L}$  de buffer RWT, se centrifugó a 8000x g durante 15 segundos, el líquido residual y se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de buffer RPE para lavar por segunda vez, a continuación se centrifugó a 8000x g durante 15 segundos y se desechó el líquido residual, posteriormente se colocó la columna en un tubo de 2 mL, se añadieron 500  $\mu\text{L}$  de alcohol al 80% para eliminar las

impurezas, se centrifugó a máxima velocidad durante 5 minutos para secar la membrana y se desechó el filtrado. Para finalizar, la columna se colocó en un tubo eppendorf nuevo con capacidad de 1.5 mL, se agregaron 14  $\mu$ L de agua libre de ARNasas y se centrifugó a máxima velocidad durante 1 minuto.

## 8.6. Concentración e Integridad de ARN

La integridad y concentración de ARN se evaluó por espectrofotometría utilizando una longitud de onda de 260 y 280nm.

Cálculos:

- Concentración:  $(DO_{260}) (F.D.) (F.C.) = \mu\text{g de ARN/mL}$
- F.D. = Factor de dilución
- F.C. = Factor de conversión, equivalente a 1 unidad de  $DO_{260\text{nm}} = 40 \mu\text{g/mL}$  de ARN de cadena sencilla
- Pureza:  $DO_{260}/DO_{280}$ :  $>1.9$  grado de pureza adecuado.

Se obtuvieron alícuotas de ARN con un alto grado de pureza con valores por encima de 1.9. La integridad y concentración se verificó en geles de agarosa al 1.5% con 0.5  $\mu\text{g}$  de ARN.

## 8.7. RT-PCR

Para la obtención de ADNc, se utilizó el kit TaqMan Advanced miRNA cDNA Synthesis, el cual consta de en cuatro pasos de la siguiente manera:

### 1) Reacción de poliadenilación

Primeramente, se preparó un mix de reacción donde para un volumen final de 5  $\mu\text{L}$  se adicionaron 0.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10x Poly(A), 0.5  $\mu\text{L}$  de ATP, 0.3  $\mu\text{L}$  de enzima Poly A, a esta reacción se le agregaron 2  $\mu\text{L}$  de ARN de miRNAs, se procedió a dar vórtex brevemente. El termociclador T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler de BIO-RAD se programó de la siguiente manera: 45 minutos a 37°C y 10 minutos a 65°C. Se procedió inmediatamente a la siguiente reacción.

### 2) Reacción de Ligación

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 15  $\mu\text{L}$ : 3  $\mu\text{L}$  de buffer 5x DNA ligasa, 4.5  $\mu\text{L}$  de 50% PEG 8000, 0.6  $\mu\text{L}$  25x ligation adaptor, 1.5  $\mu\text{L}$  RNA ligasa, 0.4  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas, se adicionó la mezcla de reacción obtenida en la poliadenilación y se dio vórtex brevemente. Posteriormente se incubó a 16 °C durante 60 minutos en un termociclador T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler de BIO-RAD. Se procedió inmediatamente después con la reacción de transcripción reversa.

### 3) Reacción de transcripción reversa (RT)

Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 30  $\mu\text{L}$ : 6  $\mu\text{L}$  de buffer 5x RT, 1.2  $\mu\text{L}$  de dNTP mix (25 mM), 1.5  $\mu\text{L}$  de 20x Universal RT primer, 3  $\mu\text{L}$  de 10x RT enzyme mix y 3.3  $\mu\text{L}$  de agua libre de ARNasas. Se mezcló por pipeteo, posteriormente se adicionó esta mezcla de reacción con la reacción obtenida de la reacción de ligación y se dio vórtex brevemente. El termociclador T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler de BIO-

RAD se programó de la siguiente manera: 15 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. Se procedió con la siguiente reacción.

#### 4) Reacción miR-Amp

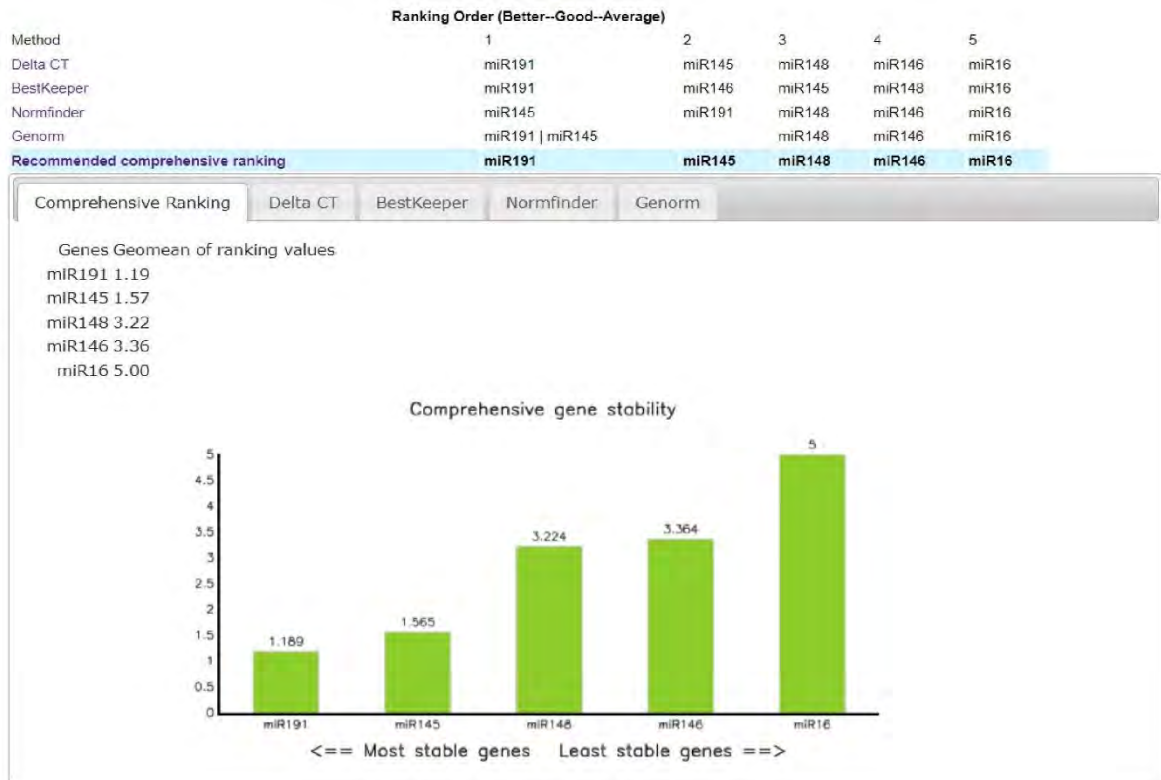
Se preparó la siguiente mezcla de reacción para un volumen final de 50 µL: 25 µL de 2x miR-Amp master mix, 2.5 µL de 20x miR-Amp primer mix y 17.5 µL de agua libre de ARNasas y se agregaron 5 µL del producto de reacción RT. Se dio vórtex brevemente. El termociclador T100™ Thermal Cycler de BIO-RAD se programó de la siguiente manera: 5 minutos a 95 °C por 1 ciclo, 3 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C por 14 ciclos y 10 minutos a 99°C por 1 ciclo. Se procedió a la qPCR.

### **8.7.1. Amplificación y cuantificación de ADNc**

La amplificación y cuantificación de los miRNAs, se realizó mediante PCR en Tiempo Real, utilizando sondas TaqMan® de Applied Biosystems® en un Termociclador StepOnePlus del mismo productor. Las condiciones de la mezcla de reacción y las condiciones de PCR tiempo real se estandarizaron a partir de las condiciones indicadas por el fabricante.

Con el fin de identificar al miRNA más adecuado para ser utilizado como normalizador, se utilizó la herramienta bioinformática RefFinder la cual integra a la mayoría de los algoritmos (geNorm, Normfinder, BestKeeper y el método comparativo Delta-Cq) utilizados actualmente para comparar y seleccionar al mejor gen de referencia. Basado en la selección del mejor gen de referencia que hace cada algoritmo, este asigna un valor apropiado a cada

gen individual y calcula la media geométrica de dichos valores para obtener un resultado final (Xie y cols., 2012). En la figura 5 se observa que al evaluar a los miRNAs miR16-5p, miR145-5p, miR146-5p, miR148b-3p y miR191-5p, este último fue el miRNA más estable y el mejor candidato para ser utilizado como normalizador.



**Figura 5. Análisis del miRNA normalizador mediante RefFinder.**

Se evaluó a los miRNAs 16-5p, 145-5p, 146-5p, 148b-3p y 191-5p mediante la herramienta bioinformática RefFinder y se observó que el miRNA más estable y por tanto el mejor normalizador fue el miR191-5p.



## 8.8. Análisis de expresión génica relativa

Para obtener la expresión relativa de miRNAs se usó el método propuesto por Taylor y cols., en 2019, basado en el método del  $\Delta\Delta Cq$  (Livak y Schmittgen, 2001). Posteriormente los resultados de expresión relativa normalizada son transformados mediante logaritmo para ser utilizados en análisis cuantitativos.

A continuación, se muestran los pasos del método de Taylor y cols:

- $Cq \text{ promedio} = \text{Promedio de los } Cq \text{ de las muestras control}$
- $\Delta Cq = Cq \text{ promedio} - Cq \text{ de cada muestra problema y control}$
- $RQ = 2^{\Delta Cq}$
- $\text{Expresión normalizada por muestra} = RQ \text{ gen problema} / RQ \text{ gen normalizador}$
- $\text{Log}_2 (\text{Expresión normalizada por muestra})$

## 8.9. Extracción de ADN

A partir de los restos de trizol obtenidos de la extracción de ARN se realizó extracción de ADN. Se agregaron 0.2 ml de cloroformo por cada 0.75 ml de trizol LS utilizado en la lisis y se incubaron durante 2-3 minutos. Se centrifugó a 12,000 xg a 4°C durante 15 minutos. Se descartó la fase acuosa. Se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de etanol al 100% por cada 750  $\mu\text{L}$  de trizol LS utilizado en la lisis, se homogeneizó la mezcla invirtiendo el tubo varias veces. Las muestras fueron incubadas a temperatura ambiente durante 3 minutos y se centrifugaron a 2000 xg durante 5 minutos. Se removió el sobrenadante fenol-etanol. El lavado del ADN se

realizó resuspendiendo el pellet en 1 ml de citrato de sodio al 0.1 M en etanol al 10%, pH 8.5, por cada 750  $\mu$ L de trizol LS utilizado. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente, mezclando de manera ocasional por inversión suave. Posteriormente se centrifugó la mezcla a 2000 xg durante 5 minutos a una temperatura de 4°C, el sobrenadante obtenido fue descartado por pipeteo. Se repitieron los pasos anteriores 2 veces. El pellet obtenido se resuspendió en 2 ml de etanol al 75% mezclándolo por inversión e incubándose durante 15 minutos a temperatura ambiente. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla durante 5 minutos a 2000 xg a una temperatura de 4 °C. Con una pipeta se retiró el sobrenadante, con cuidado de no arrastrar el pellet. La pastilla se dejó secar hasta que no hubiera restos de humedad, colocando una gasa sobre la tapadera abierta del tubo. Una vez que el pellet estuvo completamente seco, se procedió a resuspender la pastilla en 300  $\mu$ L de agua inyectable. El ADN se almacenó a -20°C hasta su análisis molecular.

### **8.10. Concentración e integridad del ADN**

La integridad y concentración de ADN se evaluó utilizando un Nanodrop para longitud de onda de 260 y 280nm.

Cálculos:

- Concentración:  $(DO_{260}) (F.D.) (F.C.) = \text{ng de ADN}/\mu\text{l}$
- F.D. = Factor de dilución
- F.C. = Factor de conversión, equivalente 1 unidad de  $DO_{260\text{nm}} = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$  de ADN de cadena sencilla

- Pureza: DO260/DO280: >1.8 grado de pureza adecuado

Se obtuvieron alícuotas de ADN genómico con un alto grado de pureza con valores por encima de 1.8. La integridad y concentración se verificó en geles de agarosa al 1.5% con 0.5 µg de ADN.

### **8.11. Análisis de polimorfismos en miRNAs**

Se realizó el diseño de primers para la amplificación y secuenciación de los miRNAs utilizando la herramienta CLC sequence viewer y Primer-BLAST de NCBI. Se consideró una región de aproximadamente 1000 pares de bases que abarca la secuencia del gen de cada miRNA seleccionado (Cuadro 1). Posteriormente se enviaron alícuotas de ADN selladas de 10 µL para ser secuenciadas por la empresa coreana MACROGEN mediante secuenciación por electroforesis capilar. Una vez obtenidos los datos se procedió a realizar la limpieza de los electroferogramas y la identificación de mutaciones mediante las herramientas Chromas V2.6.6, SnackVar v2.4.3 y NovoSNP v3.0.1.

**Cuadro 1. Primers para PCR y secuenciación de los miR145-5p y miR148b-3p.**

<b>Gen</b>	<b>Secuencia de primers (5'-3')</b>	<b>Tm (°C)</b>	<b>Tamaño del producto (pb)</b>
miR148b-3p	F: CAGGCTTTAGAAGCCCCTGA	59.38	986
	G: GCGCTTAAATGCCGCTTCA	59.86	
miR145-5p	F: TCTCCAGTAGGTCGTGGACT	59.30	1000
	R: CACAAGAGGGCGTTCTGAGT	59.97	

T<sub>m</sub>, temperatura de fusión.

## 8.12. Análisis estadístico

Una vez recolectada la información se procedió a su captura y se verificó la calidad de esta. Los datos se organizaron en cuadros y figuras. Medidas de tendencia central (media, mediana, moda), medidas de dispersión (desviación estándar) e intervalos de confianza, fueron estimados para las variables cuantitativas. Para las variables cualitativas se estimaron las frecuencias y porcentajes, así como los respectivos intervalos de confianza. Para identificar diferencias entre medias de las distintas variables cuantitativas en pacientes con y sin CaP, se realizó el estadístico t-Student y U de Mann-Whitney, para variables paramétricas y no paramétricas, respectivamente. Con el fin de buscar relación entre variables cualitativas se utilizó la prueba Chi-cuadrado. Para los análisis de correlación se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson y la prueba de Spearman, para variables paramétricas y no paramétricas respectivamente. Todos los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico IBM SPSS v.20. Para determinar si la distribución de los genotipos de cada mutación se encuentra en equilibrio Hardy-Weinberg (EHW) se empleó el software SNPStats, así mismo, las frecuencias haplotípicas y análisis de ligamiento se calcularon utilizando el mismo software (disponible en línea: <https://www.snpstats.net/start.htm>). Un valor p menor a 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## **IX. RESULTADOS**

### **9.1. Características generales de la población**

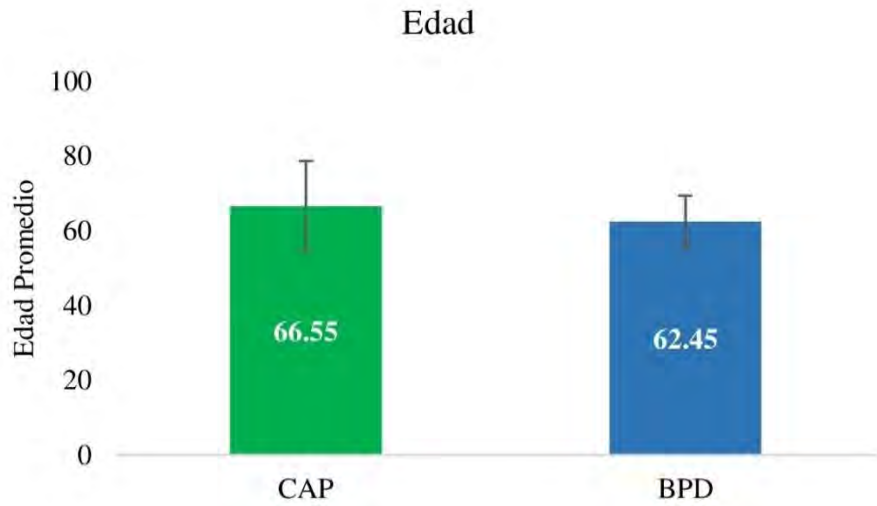
En este estudio se incluyó un total de 71 pacientes del sexo masculino mayores de 18 años que se atendieron en la clínica privada Álvarez & Arrazola Radiólogos de Mazatlán, Sinaloa, que aceptaron participar en el estudio cumpliendo los criterios de inclusión previamente establecidos en el proyecto. Del total de la población de estudio, 41 pacientes (grupo CAP) fueron diagnosticados con adenocarcinoma de próstata mediante un análisis histopatológico, el resto de los pacientes se consideraron como grupo control (BPD) los cuales fueron diagnosticados con hiperplasia benigna de próstata (n= 7), prostatitis (n=18), con la combinación de hiperplasia y prostatitis (n=4) y un paciente fue diagnosticado con neoplasia intraepitelial (n=1). A partir de la información proporcionada por la clínica privada y cuestionarios realizados a los pacientes de forma directa, se conformó una base de datos que comprende la información clinicopatológica, obteniendo los siguientes resultados.

#### **9.1.1. Edad**

La edad media de los pacientes con cáncer CaP fue de 66.55 años  $\pm$  12.13 con una edad mínima de 23 años y una edad máxima de 83 años. En cuanto al grupo BPD su edad media fue de 62.45  $\pm$  6.94 con una edad mínima de 50 años y una edad máxima de 77 años. Al realizar una prueba de comparación de medias mediante el estadístico U- de Mann Whitney se determinó que existía una diferencia estadísticamente significativa entre los grupos de estudio (p=0.008) (Figura 6).

### **9.1.2. Índice de masa corporal**

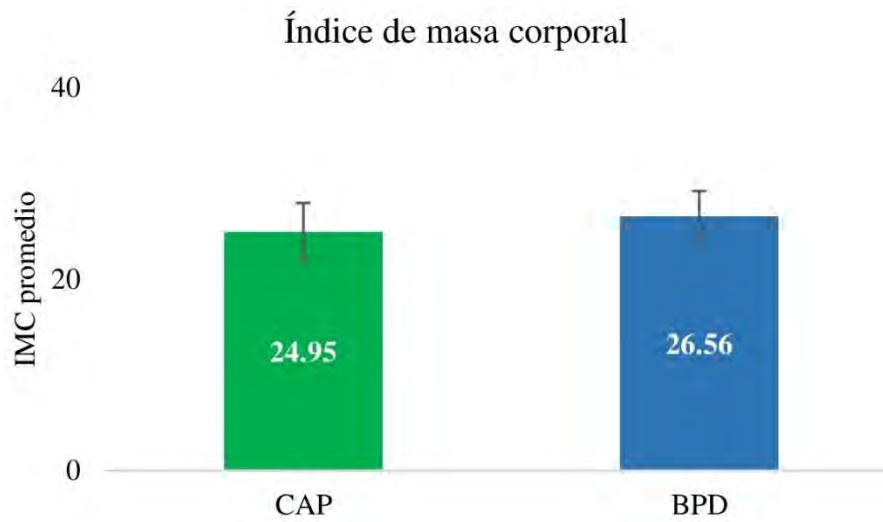
Al evaluar el índice de masa corporal (IMC) de los pacientes se obtuvo que en promedio el grupo CAP tuvo  $24.94 \pm 3.01$  con un máximo de 31.10 y un mínimo de 21.20. En el caso del grupo BPD, estos tuvieron una media de  $26.56 \pm 2.65$  con un máximo de 30.04 y un mínimo de 24.22 (Figura 7). Al comparar las medias de ambos grupos mediante el estadístico U de Mann-Whitney se observó que no existe diferencia significativa entre las medias de ambos grupos ( $p=0.399$ ).



**Figura 6. Edad de pacientes con y sin cáncer de próstata.**

Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la edad promedio del grupo CAP y el grupo BPD. Prueba U de Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95% ( $p=0.008$ ).





**Figura 7. IMC de pacientes con y sin cáncer de próstata.**

Se identificó que no existe diferencia entre el IMC promedio del grupo CAP y el grupo BPD. Prueba U de Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95% ( $p=0.399$ ).

### **9.1.3. Antecedentes heredofamiliares**

Al analizar los antecedentes heredofamiliares de nuestros pacientes con registro de antecedente hereditario de cáncer, se observó que el 14.63% de los pacientes del CAP tuvo al menos un familiar con CaP. En los pacientes BPD se observó que el 23.33% de los pacientes tuvo al menos un familiar con CaP. En el caso del grupo CAP solo uno de los pacientes tuvo dos familiares con esta patología (padre y abuelo, mientras que en el grupo BPD, un paciente manifestó tener tres hermanos con esta patología. Con el fin de relacionar los antecedentes con el padecimiento de CaP se realizó una prueba Chi<sup>2</sup>, mediante la cual se observó que no existía una relación significativa en nuestra muestra de estudio (Cuadro 2).

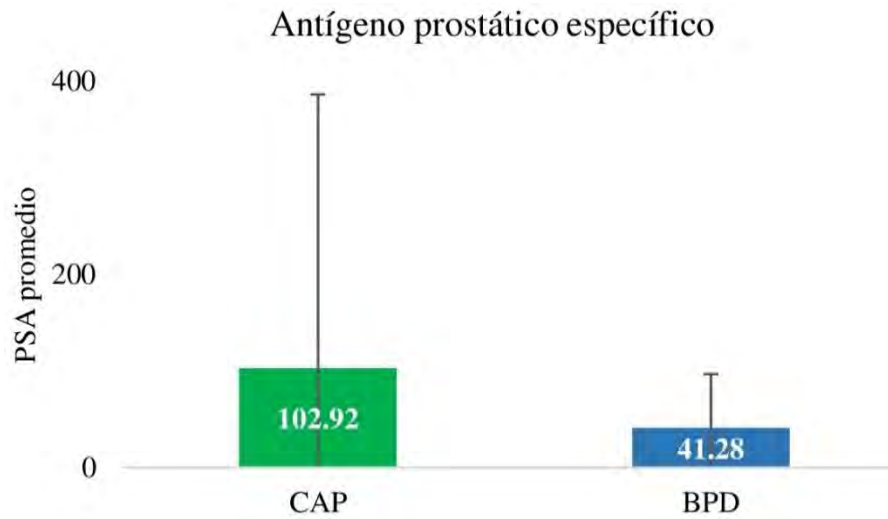
**Cuadro 2. Relación entre antecedentes heredofamiliares y CaP.**

<b>Antecedentes de cáncer de próstata</b>	<b>CAP</b>		<b>BPD</b>		<b><i>p</i></b>
	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	
Sí	6	14.63	7	23.33	0.35
No	35	85.37	23	76.67	

Prueba Chi<sup>2</sup> con un intervalo de confianza del 95%.

#### **9.1.4. Antígeno prostático específico**

El grupo de pacientes con cáncer tuvo una media de  $102.92 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 283.56 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , con un mínimo de  $2.11 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  y un máximo de  $1000 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . En el caso del grupo BPD se observó un promedio de  $41.28 \mu\text{g}/\mu\text{L} \pm 55.73 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ , con un mínimo de  $5.13 \mu\text{g}/\mu\text{L}$  y un máximo de  $149.00 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Al comparar las medias de ambos grupos mediante el estadístico U de Mann-Whitney se observó que no existe diferencia significativa entre ambos grupos ( $p=0.945$ ) (Figura 8).



**Figura 8. Antígeno prostático específico (PSA).**

Se identificó que no existe diferencia entre el PSA promedio del grupo CAP y el grupo BPD.

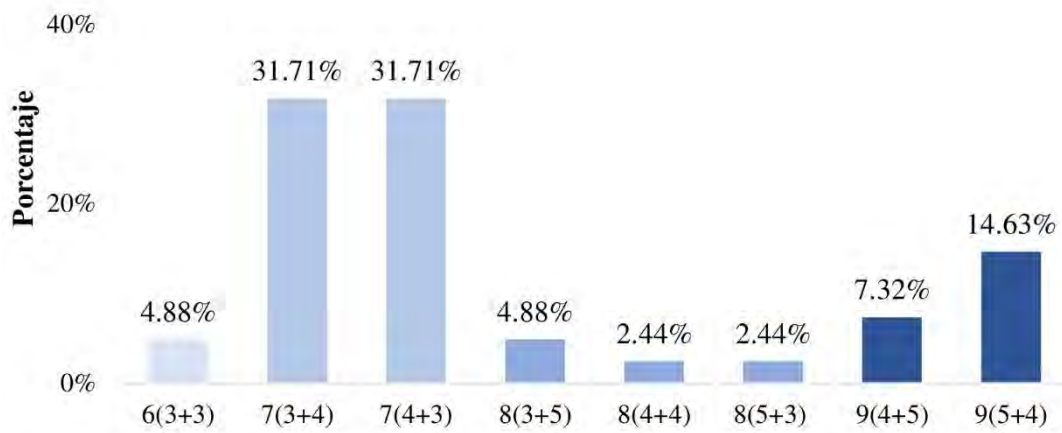
Prueba U de Mann-Whitney con un intervalo de confianza del 95% ( $p=0.945$ ).

### **9.1.5. Escala de Gleason**

Al clasificar a los pacientes con cáncer en las diferentes categorías de Gleason se observó que el 4.88% tuvo un Gleason de 6, el 63.41% tuvo un Gleason en la escala de 7, el 9.76% de los pacientes tuvieron un Gleason de 8 y la categoría más alta que obtuvimos fue Gleason 9 en el 21.95% de la población de estudio, en la Figura 9 se observan las subcategorías en cada escala.

De acuerdo con la clasificación ISUP mediante la escala de Gleason, se identificó que los mayores porcentajes se observaron en las categorías 2 y 3 con un 31.71% cada uno (Cuadro 3) y el menor porcentaje se observó en los pacientes con la categoría 1.

### Escala de Gleason



**Figura 9. Clasificación de pacientes con CaP mediante escala Gleason.**

Se presenta el porcentaje de pacientes con CaP que se clasificaron en los siguientes rangos de la escala de Gleason: 6(3+3), 7(3+4), 7(4+3), 8(3+5), 8(4+4), 8(5+3), 9(4+5), 9(5+4).

**Cuadro 3. Clasificación de pacientes con CaP mediante grados ISUP.**

<b>Grado ISUP</b>	<b>Gleason</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
1	≤6	2	4.88%
2	7 (3+4)	13	31.71%
3	7 (4+3)	13	31.71%
4	8	4	9.76%
5	>8	9	21.95%



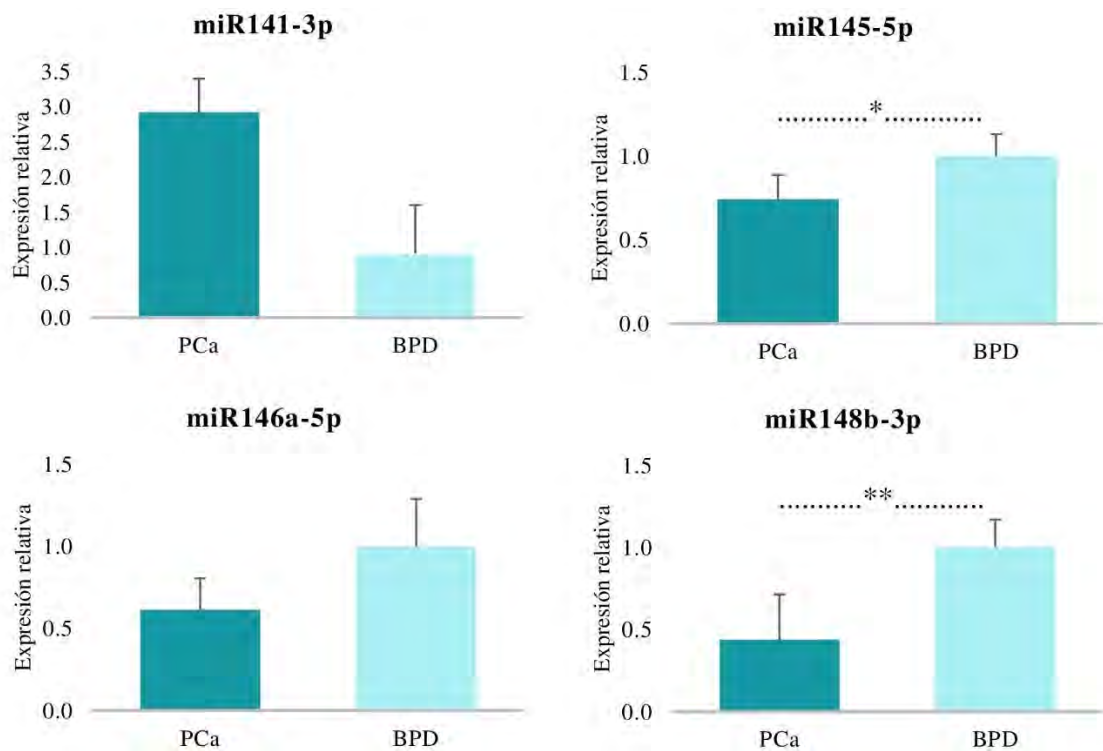
## **9.2. Análisis de expresión relativa**

A continuación, se presentan los resultados del análisis de selección del miRNA normalizador y de expresión relativa mediante el método comparativo de Cq (Taylor y cols., 2019). Así mismo, se presentan los análisis de correlación entre las características clinicopatológicas con la expresión de los miRNAs de estudio.

### **9.2.1. Expresión relativa de miRNAs**

Se cuantificó la expresión relativa de los miRNAs 141-3p, 145-5p, 146-5p y 148b-3p en el total de las muestras obtenidas, dichos resultados se representan en la Figura 10.

El miR141-3p se observó expresado  $2.92 \pm 0.48$  veces más el grupo CAP comparado contra el grupo BPD, sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.074$ ). Al analizar los niveles de expresión del miRNA 145-5p se observó que este se expresaba  $0.71 \pm 0.15$  veces menos en el grupo CAP que en el grupo BPD, observándose una diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.033$ ). En el caso del miR146-5p se observó una subexpresión con un factor de cambio de  $0.61 \pm 0.19$  en los pacientes con CaP, sin embargo, no se observó una diferencia significativa frente al grupo control ( $p=0.051$ ). El miR148b-3p se observó subexpresado en los pacientes con cáncer con un factor de cambio de  $0.44 \pm 0.28$ , existiendo una diferencia estadísticamente significativa al compararlo con el grupo BPD ( $p=0.001$ ).

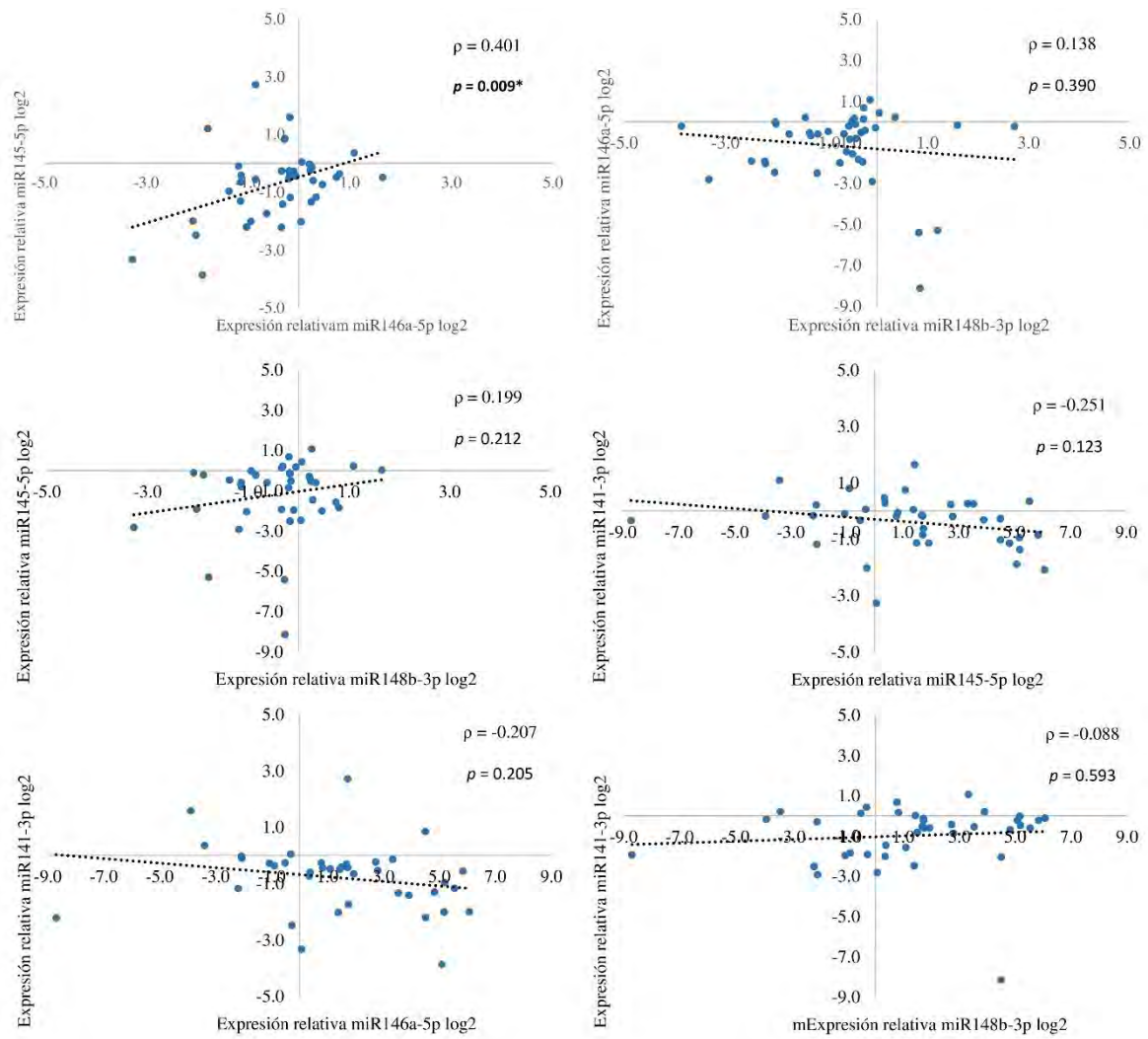


**Figura 10. Análisis de expresión relativa de miRNAs.**

Se observó que existe diferencia significativa en la expresión relativa de los miRNAs 145-5p y 148b-3p entre pacientes con y sin CaP ( $p = 0.03$  y  $p = 0.001$ , respectivamente). En el caso de los miRNAs 141-3p y 146<sup>a</sup>-5p se observaron diferencias significativas ( $p = 0.074$  y  $p = 0.051$ , respectivamente). Prueba T de Student con un intervalo de confianza del 95%.

### **9.3. Análisis de correlación**

Se realizaron análisis de correlación entre la expresión relativa de los miRNAs y variables clínicas. Se observó una correlación entre el miR145-5p y el miR146a-5p, siendo estadísticamente significativa con un coeficiente de correlación de 0.401 ( $p = 0.009$ ) (figura 11). Además, se realizaron correlaciones con las características descriptivas de la población (PSA, peso, edad e IMC), sin embargo, no se observó una correlación estadísticamente significativamente con la expresión de los miRNAs (Cuadro 4).



**Figura 11. Análisis de correlación de la expresión génica entre miRNAs.**

Se observó una correlación estadísticamente significativa entre la expresión del miR145-5p y el miR146a-5p ( $p = 0.009$ ). No se observaron correlaciones entre los demás miRNAs.

Prueba de correlación de Pearson con un intervalo de confianza del 95%.

**Cuadro 4. Correlación entre la expresión de miRNAs y características clínicas.**

		miR141-3p	miR145-5p	miR146a-5p	miR148b-3p
PSA	Coefficiente de correlación	0.008	-0.067	-0.078	0.353
	<i>p</i>	0.970	0.754	0.718	0.091
Peso	Coefficiente de correlación	-0.131	-0.069	0.464	-0.038
	<i>p</i>	0.641	0.800	0.070	0.889
Edad	Coefficiente de correlación	-0.069	-0.120	0.135	0.094
	<i>p</i>	0.690	0.471	0.419	0.574
IMC	Coefficiente de correlación	0.223	-0.066	0.488	-0.006
	<i>p</i>	0.443	0.817	0.065	0.982

PSA, Antígeno prostático específico, IMC, Índice de masa corporal.

## 9.4 Análisis de mutaciones

### 9.4.1 miR148b-3p

Se identificaron un total de dieciocho mutaciones en la secuencia analizada para el miR148b-3p. Se observaron distintos tipos de mutaciones, las cuales fueron variaciones de nucleótido sencillo (SNVs), deleciones (Del), una inserción (Ins) y una duplicación (Dup). De las mutaciones observadas doce ya habían sido registradas y seis de ellas no cuentan con registro previo. En la posición 54337042/54337043 se presentaron cuatro deleciones distintas, dos de ellas con registro previo (rs1465330647 y rs1187801243) y otras dos deleciones que no han sido registradas en alguna base de datos. La mutación rs1465330647 es la deleción de AAAGAA, la mutación rs1187801243 es la pérdida de AAGAA, y las otras dos mutaciones sin registro comprenden la deleción de AAAGA en un caso y de AAGAAG en el otro caso, al ser muy similares entre ellas y tener una baja frecuencia por separado, se les agrupó en una sola variable llamada “DelsAAG Unidas”. Con el fin de analizar la relación de estas mutaciones con la expresión del miR148b-3p, se procedió a seleccionar aquellas con la mayor frecuencia del alelo mutado, seleccionando las siguientes: DupCT (rs59761210), SNV G/T (rs1381668656), SNV A/C (NA), DelG (rs368666376), SNV G/C (rs56818309) y DelsAAG Unidas (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Mutaciones identificadas para el miR148b-3p.**

<b>Mutación</b>	<b>Posición</b>	<b>ID</b>	<b>Frecuencia alelo mutado</b>
SNV G/T	54336876	NA	0.01
SNV G/A	54337007	NA	0.01
DupCT	54337015	rs59761210	0.15*
SNV C/G	54337017	rs555306172	0.01
SNV G/T	54337018	rs1381668656	0.11*
SNV A/C	54337021	NA	0.10*
SNV A/C	54337042	rs1953883052	0.02
SNV A/C	54337043	rs918405335	0.01
DelAAAGA	54337042	NA	0.01
DelAAAGAA	54337042	rs1465330647	0.08
DelAAGAA	54337043	rs1187801243	0.02
DelAAGAAG	54337043	NA	0.09
DelG	54337045	rs368666376	0.12*
InsA	54337045	NA	0.01
SNV G/A	54337045	rs879146327	0.01
SNV A/C	54337046	rs1048873442	0.01
SNV A/C	54337047	rs1481050082	0.02
SNV G/C	54336970	rs56818309	0.27*
DelsAAG Unidas	54337042/54337043	NA	0.21*

\*Mutaciones seleccionadas por la frecuencia del alelo mutado. SNV, variaciones de nucleótido sencillo. Dup, duplicación. Del, delección. Ins, Inserción. n = 71.

#### 9.4.2 Análisis por modelo de herencia

Posteriormente se realizó un análisis de los posibles modelos de herencia de estas seis mutaciones de acuerdo con la variable de respuesta que agrupa a los pacientes en CAP y BPD, mediante el software SNPStat.net (Cuadro 7). De las seis mutaciones solamente DelsAAG Unidas fue significativa para los modelos codominante ( $p = 0.03$ , AIC = 95.4), dominante ( $p = 0.01$ , AIC = 94.7) y sobredominante ( $p = 0.02$ , AIC = 94.9). Con el fin de realizar análisis posteriores mediante genotipos y alelos, se seleccionó el modelo de herencia de acuerdo con el menor valor del criterio de información de Akaike (AIC) obtenido, para la mutación rs59761210 se seleccionó el modelo dominante, para la mutación rs368666376 el modelo recesivo, para la mutación rs56818309 el modelo sobredominante y para la mutación DelsAAG Unidas el modelo dominante. En el caso de las mutaciones rs1381668656 y SNV A/C no se obtuvo el análisis por diferentes modelos de herencia debido a que en los grupos de estudio no se observó el genotipo homocigoto mutado, de ahí que se seleccionó el modelo de herencia codominante.



**Cuadro 7. Modelos de herencia de las mutaciones seleccionadas.**

<b>Mutación</b>	<b>Modelos de herencia</b>	<b><i>p</i></b>	<b>AIC</b>
dupCT rs59761210	Codominante	0.75	102.10
	Dominante	0.44	100.10 <sup>†</sup>
	Recesivo	0.75	100.60
	Sobredominante	0.51	100.30
	Aditivo	0.48	100.20
SNP G/T rs1381668656	-	-	-
DelG rs368666376	Codominante	0.42	101.00
	Dominante	0.70	100.60
	Recesivo	0.19	99 <sup>†</sup>
	Sobredominante	0.96	100.70
	Aditivo	0.51	100.30
SNV G/C rs56818309	Codominante	0.49	101.30
	Dominante	0.29	99.60
	Recesivo	0.75	100.60
	Sobredominante	0.23	99.30 <sup>†</sup>
	Aditivo	0.42	100.10
SNV A/C 54337021	-	-	-
DelsAAG Unidas	Codominante	0.03*	95.40
	Dominante	0.01*	94.70 <sup>†</sup>
	Recesivo	0.39	100
	Sobredominante	0.02*	94.90
	Aditivo	0.05	96.90

AIC, criterio de información de Akaike. \*Estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ . †Modelo seleccionado por el menor valor de AIC.

### 9.4.3 Frecuencias genotípicas y alélicas y su asociación con CaP

Se realizó el cálculo de frecuencias genotípicas y alélicas para cada una de las mutaciones seleccionadas y se asociaron tanto genotipos como alelos a la presencia de CaP. Las frecuencias alélicas y genotípicas de las mutaciones rs59761210, rs1381668656, rs368666376, rs56818309 y SNV A/C se encuentran en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0.052$ ,  $p = 0.59$ ,  $p = 0.98$ ,  $p = 0.36$ ,  $p = 0.44$ , respectivamente), en el caso de la mutación DelsAAG Unidas esta no se observó en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p = 0.001$ ). La mutación DelsAAG Unidas está relacionada de forma significativa con la presencia de CaP ( $p = 0.014$ ), donde en un modelo dominante, es decir, tanto los homocigotos mutados como los heterocigotos, están relacionados con la patología, a diferencia de los homocigotos normales. Así mismo, el análisis por alelos mostró que los pacientes que son portadores de la mutación DelsAAG Unidas tienen 4.16 ( $p = 0.017$ ) veces más probabilidad de desarrollar CaP, las demás mutaciones no se observaron relacionadas con la patología (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Frecuencias alélicas y genotípicas de mutaciones del miR148b-3p.**

Mutación	Modelo de herencia	Genotipo	grupo BPD	grupo CAP	RM (95% IC)	p
dupCT rs59761210	Dominante	CT/CT	21 (70%)	32 (78%)		
		CT/CTCT	7 (23%)	7 (17%)	0.66 (0.22-1.92)	0.44
		CTCT/CTCT	2 (7%)	2 (5%)		
		CTCT	0.18	0.13	0.66 (0.22-1.92)	0.44
SNP G/T rs1381668656	Codominante	G/G	22 (73%)	33 (81%)		
		G/T	8 (27%)	8 (19%)	0.67 (0.22-2.04)	0.48
		T/T	-	-		
		T	0.13	0.10	0.72 (0.33-1.56)	0.41
DelG rs368666376	Recesivo	G/G	22 (74%)	33 (80%)		
		G/G <sup>-</sup>	7 (23%)	8 (20%)	0.00 (0.00-NA)	0.19
		G <sup>-</sup> /G <sup>-</sup>	1 (3%)	0 (0%)		
		G <sup>-</sup>	0.13	0.10	0.41 (0.31-0.55)	0.24
SNV G/C rs56818309	Sobredominante	G/G	13 (44%)	23 (56%)		
		G/C	16 (53%)	16 (39%)	0.56 (0.22-1.45)	0.23
		C/C	1 (3%)	2 (5%)		
		C	0.30	0.24	0.56 (0.22-1.45)	0.23
SNV A/C 54337021	Codominante	A/A	23 (77%)	36 (88%)		
		A/C	7 (23%)	5 (12%)	0.46 (0.13-1.61)	0.22
		C/C	-	-		
		C	0.12	0.06	0.49 (0.15-1.63)	0.24
DelsAAG Unidas	Dominante	AAG/AAG	26 (87%)	25 (61%)		
		AAG/AAG <sup>-</sup>	1 (3%)	9 (22%)	4.16 (1.22-14.17)	<b>0.014*</b>
		AAG <sup>-</sup> /AAG <sup>-</sup>	3 (10%)	7 (17%)		
		AAG <sup>-</sup>	0.12	0.28	4.16 (1.22-14.17)	<b>0.017*</b>

RM, Razón de momios. \*Estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ .

#### **9.4.4 Desequilibrio de ligamiento y análisis por haplotipos**

Se realizó análisis de desequilibrio de ligamiento con el fin de identificar posibles haplotipos, donde se identificó el conjunto de mutaciones de rs368666376, rs56818309 y DelsAAG Unidas se encuentran en desequilibrio de ligamiento (Cuadro 9). Del conjunto de mutaciones se obtuvieron tres haplotipos (haplotipos I, II, III), siendo el haplotipo I con los alelos normales. Se realizó un análisis en el que se relacionó a cada haplotipo con la presencia de CaP, sin embargo, no se observó una asociación estadísticamente significativa (Cuadro 10).

**Cuadro 9. Desequilibrio de ligamiento de las mutaciones del miR148b-3p.**

	dupCT rs59761210	SNV G/T rs1381668656	DelG rs368666376	SNV G/C rs56818309	SNV A/C	DelsAAG Unidas
dupCT rs59761210	.	p = 0.07	p = 0.28	p = 0	p = 0.12	p = 0.13
SNV G/T rs1381668656	.	.	p = 0.13	p = 0	p = 0	p = 0.05
DelG rs368666376	.	.	.	p = 0.04*	p = 0.2	p = 0.03*
SNV G/C rs56818309	.	.	.	.	p = 0	p = 0.01*
SNV A/C	.	.	.	.	.	p = 0.06
DelsAAG Unidas	.	.	.	.	.	.

\*Estadísticamente significativo,  $p < 0.05$

**Cuadro 10. Relación de los haplotipos con la presencia de CaP.**

Haplotipo	DelG rs368666376	SNV G/C rs56818309	DelsAAG Unidas	Frecuencia BPD	Frecuencia CAP	Frecuencia total	RM (95% IC)	<i>p</i>
1	G	G	AAG	0.47	0.40	0.43	1	---
2	G	C	AAG	0.28	0.22	0.25	0.98 (0.29 - 3.30)	0.97
3	G	G	AAG	0.12	0.25	0.20	1.78 (0.64 - 4.95)	0.27

RM, Razón de momios.

#### 9.4.5 Relación de las mutaciones con expresión del miR148b-3p

Se procedió a analizar si existe una diferencia significativa en la expresión génica del miR148b-3p entre los genotipos y alelos de cada mutación. Se observó que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la expresión de los genotipos de la mutación “DelsAAG Unidas” ( $p = 0.004$ ), específicamente entre los genotipos homocigoto normal con una media de expresión de  $-0.35$  y heterocigoto con un promedio de  $-2.10$  ( $p = 0.003$ ). Así mismo se realizó este análisis comparando entre alelos, donde se identificó que los pacientes portadores del alelo mutado de la mutación “DelsAAG Unidas” tuvieron una media de  $-1.53$  y en el caso de los no portadores, una media de  $-0.36$ , existiendo una diferencia estadísticamente significativa ( $p = 0.005$ ). El resto de las mutaciones no se observaron con diferencias significativas en los análisis por genotipos ni por alelos (Cuadro 11).

Con el fin de identificar si existe diferencia significativa en la expresión del miR148b-3p por haplotipos, se realizó un análisis de diferencias de medias, donde se observó que existe diferencia entre la media de expresión de los pacientes portadores del haplotipo 3 ( $\bar{x} = -1.733 \pm 0.480$ ), y los pacientes con las demás combinaciones alélicas ( $\bar{x} = -0.358 \pm 0.178$ ) ( $p = 0.001$ ) (Cuadro 12). Así mismo, se observó que existe diferencia estadísticamente significativa entre la media de expresión de los pacientes portadores del haplotipo 1 y 2 ( $\bar{x} = -0.389 \pm 0.293$ ,  $\bar{x} = -0.347 \pm 0.259$ , respectivamente) frente al haplotipo 3 ( $\bar{x} = -1.733 \pm 0.480$ ) ( $p = 0.025$ ,  $p = 0.014$  respectivamente), donde el haplotipo 3 presenta una mayor subexpresión al compararse con los demás haplotipos (Figura 12).

**Cuadro 11. Análisis de diferencia de medias de la expresión del miR148b-3p entre los genotipos de las mutaciones en la población de estudio.**

Mutación	Genotipo	N	Media	Error est.	<i>p</i>
dupCT rs59761210	CT/CT	53	-0.88	0.23	0.17
	CT/CTCT	14	-0.28	0.30	
	CTCT/CTCT	4	0.41	0.71	
SNP G/T rs1381668656	G/G	55	-0.54	0.23	0.69
	G/T	16	-0.73	0.33	
	T/T	0	-	-	
DelG rs368666376	G/G	56	-0.71	0.21	0.90
	G/G <sup>-</sup>	14	-0.66	0.49	
	G <sup>-</sup> /G <sup>-</sup>	1	-	-	
SNV G/C rs56818309	G/G	36	-1.03	0.31	0.18
	G/C	32	-0.34	0.23	
	C/C	3	-0.27	0.29	
SNV A/C 54337021	A/A	59	-0.69	0.21	0.95
	A/C	12	-0.66	0.44	
	C/C	0	-	-	
DelsAAG Unidas	AAG/AAG	51	-0.36	0.19	<b>0.004* (0.03*†)</b>
	AAG/AAG-	10	-2.10	0.75	
	AAG-/AAG-	10	-0.95	0.33	

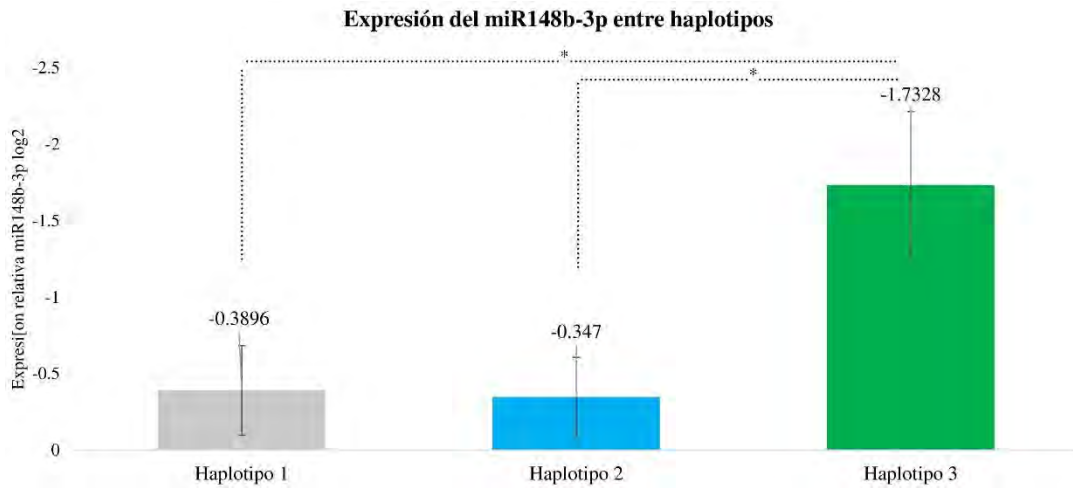
Error est., error estándar. \*Estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ . †Comparaciones múltiples mediante prueba de Tukey, diferencia entre los genotipos homocigoto normal y heterocigoto.



**Cuadro 12. Análisis de diferencia de medias de la expresión del miR148b-3p entre los alelos de las mutaciones en la población de estudio.**

Mutación	Alelo	N	Media	Error est.	<i>p</i>
dupCT rs59761210	Portador	18	-0.13	0.28	0.046
	Normal	53	-0.88	0.23	
SNP G/T rs1381668656	Portador	33	-0.53	0.22	0.53
	Normal	109	-0.73	0.16	
DelG rs368666376	Portador	1	0.03	-	0.65
	Normal	70	-0.70	0.19	
SNV G/C rs56818309	Portador	32	-0.34	0.23	0.09
	Normal	39	-0.98	0.28	
SNV A/C 54337021	Portador	12	-0.66	0.44	0.95
	Normal	130	-0.70	0.14	
DelsAAG Unidas	Portador	20	-1.53	0.42	<b>0.005*</b>
	Normal	51	-0.36	0.19	

Error est., error estándar. \*Estadísticamente significativo,  $p < 0.05$ .



**Figura 12. Análisis de expresión del miR148b3-p por haplotipos.**

Se observa que el miR148b-3p presenta una mayor subexpresión en pacientes portadores del haplotipo 3 en comparación con los portadores del haplotipo 1 y 2 ( $p = 0.025$  y  $p = 0.014$ ). ANOVA con un intervalo de confianza del 95%.

#### **9.4.6 miR145-5p**

El análisis de mutaciones para el miR145-5p solo se realizó en 44 de las 71 muestras de estudio, debido a que las restantes muestras no pudieron ser secuenciadas. De las 44 muestras, 21 fueron del grupo CAP y 23 del grupo BPD. Se realizó el análisis de mutaciones para el miR145-5p donde se identificaron 62 mutaciones, de las cuales 24 ya habían sido reportadas previamente (Cuadro 13). De las 62 mutaciones 59 son variaciones de nucleótido sencillo (SNV), dos deleciones (del) y una duplicación (Dup). La mayoría de las mutaciones tuvieron una frecuencia baja del alelo mutado, por lo tanto, solo se seleccionó la mutación rs353291 que consiste en un SNV de T/C con una frecuencia de 0.18 del alelo mutado en la población total.

**Cuadro 13. Mutaciones identificadas para el miR145-5p.**

Mutación	Posición	ID	Frecuencia alelo mutado
SNV C/G	149430301	NA	0.01
DelA	149430311	rs1759737505	0.02
SNV A/G	149430325	NA	0.01
SNV G/C	149430336	NA	0.01
SNV G/A	149430355	rs73798217	0.01
SNV G/T	149430405	rs879265234	0.01
DupGG	149430408	NA	0.02
SNV A/T	149430415	NA	0.01
SNV T/C	149430423	NA	0.01
SNV A/G	149430430	rs1321606756	0.01
SNV G/C	149430431	rs772887491	0.02
SNV G/T	149430434	NA	0.03
SNV C/G	149430439	NA	0.01
SNV G/C	149430441	NA	0.02
SNV G/C	149430447	rs80026971	0.01
SNV G/A	149430458	rs567660030	0.02
SNV A/G	149430461	rs1580792216	0.03
SNV T/A	149430467	rs1759740002	0.01
SNV T/G	149430474	NA	0.01
SNV C/A	149430513	rs116464056	0.01
SNV G/A	149430517	rs1429482151	0.02
SNV A/G	149430531	NA	0.01
SNV C/G	149430534	rs905744394	0.01
SNV C/G	149430535	rs150222847	0.01
SNV G/A	149430546	NA	0.01
SNV C/T	149430547	rs1223520485	0.01
SNV C/A	149430556	rs1015593434	0.01
SNV A/G	149430567	NA	0.01
SNV G/A	149430568	NA	0.01
SNV G/A	149430587	NA	0.02
SNV G/A	149430589	NA	0.03
SNV G/A	149430608	NA	0.01
SNV C/G	149430617	rs747550484	0.01
SNV G/A	149430630	rs1759745332	0.02
SNV C/G	149430638	rs1294298087	0.02
SNV G/A	149430666	NA	0.01
SNV A/G	149430674	NA	0.03
SNV G/T	149430686	NA	0.03
SNV G/A	149430694	rs758758189	0.03
SNV T/A	149430715	NA	0.02
SNV T/G	149430717	NA	0.03
SNV A/G	149430728	rs1444952352	0.01
SNV A/G	149430736	NA	0.05
SNV T/A	149430768	NA	0.01
SNV A/C	149430777	rs1420371553	0.01
SNV T/C	149430803	NA	0.01
SNV G/A	149430820	NA	0.01
SNV C/G	149430828	NA	0.01
SNV G/A	149430831	NA	0.01
SNV G/A	149430848	NA	0.01
SNV T/G	149430889	NA	0.01
SNV C/T	149430916	NA	0.01
SNV C/G	149430945	NA	0.01
SNV G/T	149430979	NA	0.01
SNV G/T	149430982	NA	0.02
SNV C/A	149431032	NA	0.01
SNV C/A	149431033	rs1227825159	0.01
SNV T/A	149431126	NA	0.01
SNV T/C	149431183	rs353291	0.18*
SNV C/A	149431196	NA	0.02
DelA	149431214	NA	0.02
SNV C/A	149530822	rs926773272	0.01

\*Mutaciones seleccionadas por la frecuencia del alelo mutado. SNV, variaciones de nucleótido sencillo. Dup, duplicación. Del, deleción. Ins, Inserción. n = 44.

#### **9.4.7 Análisis por modelo de herencia de la mutación rs353291**

Con el fin de identificar el modelo de herencia de la mutación rs353291 se realizó el análisis por los cinco modelos de herencia (codominante, dominante, recesivo, sobredominante y aditivo). Ninguno de los modelos fue estadísticamente significativo, de ahí que se procedió a elegir el modelo con menor valor de AIC, siendo el modelo sobredominante (AIC = 62.2) (Cuadro 14).

**Cuadro 14. Modelos de herencia de la mutación rs353291.**

<b>Mutación</b>	<b>Modelo de herencia</b>	<b><i>p</i></b>	<b>AIC</b>
SNV T/C rs353291	Codominante	0.26	64.2
	Dominante	0.23	63.5
	Recesivo	0.6	64.6
	Sobredominante	0.11	62.2 <sup>†</sup>
	Aditivo	0.5	64.4

AIC, criterio de información de Akaike. †Modelo seleccionado por el menor valor de AIC.

#### **9.4.8 Frecuencias genotípicas y alélicas la mutación rs353291 y su asociación con CaP**

La mutación rs353291 mostró una frecuencia del genotipo heterocigoto del 33.3% en el grupo de pacientes con CaP, y de 13% en el grupo BPD. El análisis por genotipos no identificó una relación estadísticamente significativa entre los genotipos y la presencia de CaP. El alelo mutado presenta una frecuencia de 0.21 en el grupo CAP y de 0.15 en el grupo BPD, no se observó una relación significativa del alelo mutado con la patología ( $p = 0.11$ ) (Cuadro 15).

**Cuadro 15. Frecuencias alélicas y genotípicas de la mutación rs353291.**

Mutación	Modelo de herencia	Genotipo	grupo BPD	grupo CAP	RM (95% IC)	<i>p</i>
SNV T/C rs353291	Sobredominante	T/T	18 (78.3%)	13 (61.9%)	3.33 (0.73-15.17)	0.11
		T/C	3 (13%)	7 (33.3%)		
		C/C	2 (8.7%)	1 (4.8%)	3.33 (0.73-15-17)	0.11
		C	0.15	0.21		

RM, Razón de momios.



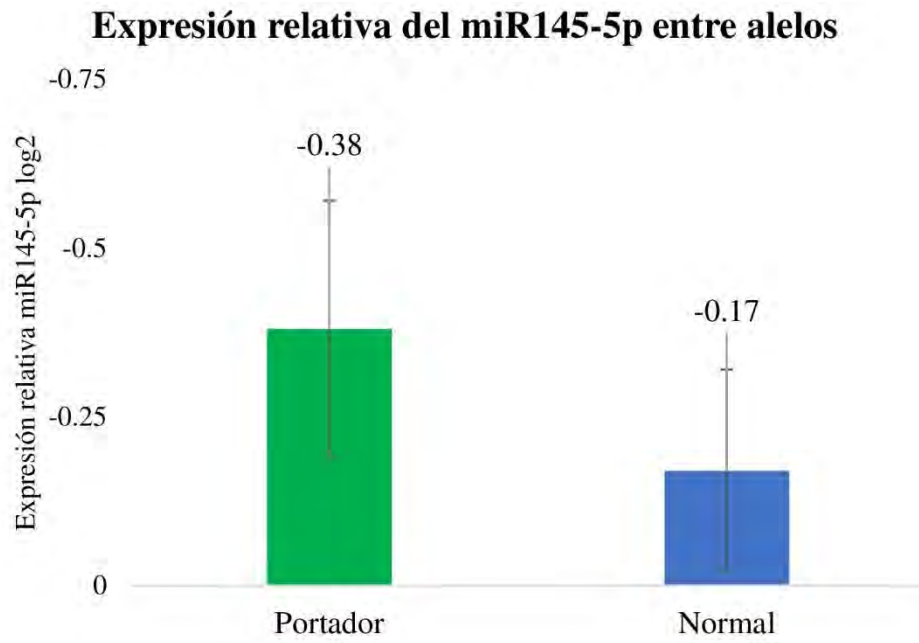
#### **9.4.9 Relación de la mutación rs353291 con la expresión del miR145b-5p**

Con el fin de identificar una relación entre la mutación rs353291 y la expresión del miR145-5p se realizaron análisis de diferencia de medias, entre genotipos y alelos. Se observó que los pacientes con el genotipo heterocigoto tuvieron una media de expresión del miR145-5p de -0.38, sin embargo, no se observó una diferencia estadísticamente significativa frente a los demás genotipos (Cuadro 16). El análisis por alelos presentó una media de expresión de -0.38 en los pacientes portadores del alelo mutado, y una media de expresión de -0.17 en los pacientes no portadores, sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos ( $p = 0.47$ ) (Figura 13).

**Cuadro 16. Diferencia de medias de la expresión del miR145-5p entre los genotipos de la mutación rs353291.**

<b>Mutación</b>	<b>Genotipo</b>	<b>N</b>	<b>Media</b>	<b>Error est.</b>	<b><i>p</i></b>
SNV T/C rs353291	T/T	10	-0.22	0.16	0.31
	T/C	31	-0.38	0.23	
	C/C	3	0.44	0.19	

Error est., error estándar.



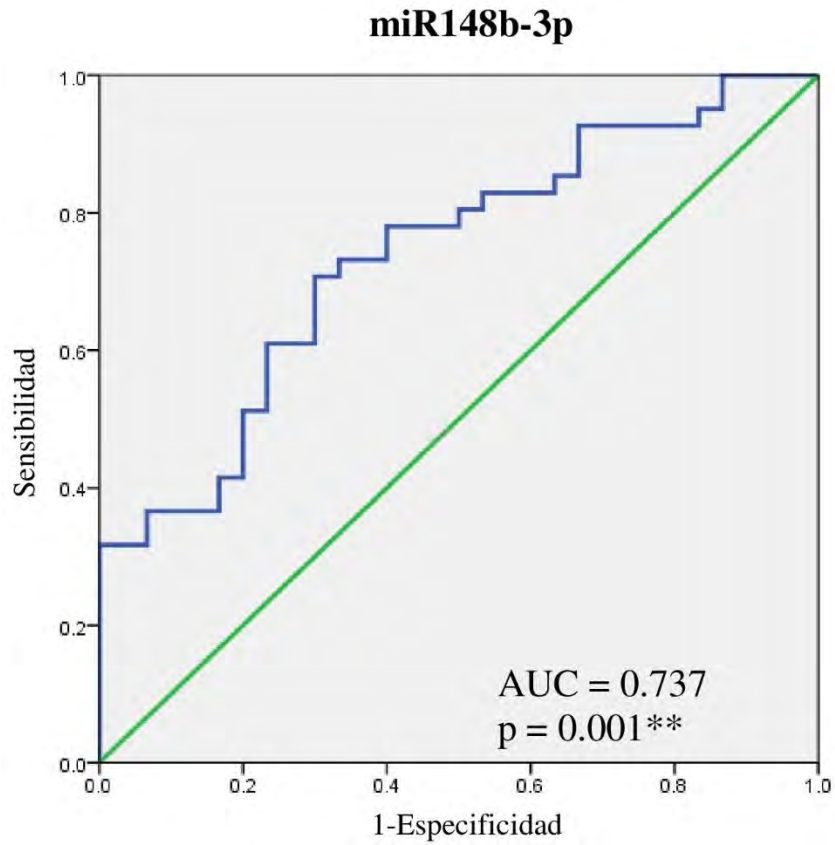
**Figura 13. Expresión del miR145-5p por alelos de la mutación rs353291.**

Los pacientes portadores del alelo mutado presentaron una media de expresión de -0.38, sin embargo, no se observó diferencia estadísticamente significativa frente al grupo no portador ( $p = 0.47$ ). Prueba T de Student con un intervalo de confianza del 95%.

## 9.5 Curvas ROC y modelos de regresión logística binaria

Con el fin de analizar si los datos de expresión tienen un potencial en la detección de pacientes con CaP se procedió a realizar curvas ROC y modelos de regresión logística con las variables de estudio. Se evaluó al PSA, la edad y la expresión relativa de los cuatro miRNAs de estudio. En el caso del PSA y los miRNAs 141-3p, 145-5p y 146a-5p no se observó una capacidad estadísticamente significativa para distinguir entre pacientes con y sin CaP ( $p = 0.945$ ,  $p = 0.086$ ,  $p = 0.068$  y  $p = 0.070$ , respectivamente). Sin embargo, en el caso de la edad y el miR148b-3p, fueron estadísticamente significativos. La curva ROC indica que la edad tiene un poder de discriminación de 69.1% y usando el índice de Youden se identificó el mejor punto de corte, observándose que este era de 71 años, teniendo una sensibilidad del 50% y una especificidad del 93.1%. El miR148b-3p tuvo un AUC de 0.737, siendo estadísticamente significativa ( $p = 0.001$ ), teniendo un poder de discriminación del 73.7% (Figura 14). El mejor punto de corte fue seleccionado mediante el índice de Youden, el cual fue -0.196, obteniendo una sensibilidad del 70.7% y una especificidad del 70%.

Con el fin de combinar y evaluar diversas variables como biomarcadores, se realizaron análisis de regresión logística. Se obtuvieron cuatro modelos, el modelo 1 está compuesto por el miR141-3p, miR145-5p, miR146a-5p, 148b-3p y edad, el modelo 2 está compuesto por miR141-3p, miR145-5p, miR146a-5p, 148b-3p, edad y PSA y el modelo 3 consiste en la combinación del miR148b-3p y la edad. Se observó que los cuatro miRNAs con la combinación de la edad tuvieron la mejor capacidad para distinguir entre pacientes con cáncer de aquellos con enfermedades benignas de la próstata ( $AUC = 0.918$ ) (Cuadro 17).



**Figura 14. Curva ROC del miR148b-3p.**

Se observa que el miRN148b-3p es capaz de discriminar entre pacientes con y sin CaP, con un AUC de 0.737 ( $p = 0.001$ ).

**Cuadro 17. Modelos por regresión logística para clasificar pacientes con CaP.**

Modelo	AUC	Precisión para clasificación	Sensibilidad	Especificidad	VPP	VPN
1	0.918	0.857	0.861	0.861	89.42%	81.95%
2	0.918	0.81	0.823	0.818	85.53%	77.04%
3	0.818	0.762	0.763	0.762	81.39%	70.21%

AUC, Area under the curve; VPP, Valor predictive positivo; VPN, Valor predictive negativo.

## X. DISCUSIÓN

Una de las problemáticas actuales en CaP es poder distinguir entre pacientes con una patología maligna de una benigna. El PSA es el marcador más usado para la detección de CaP debido a que tiene una alta sensibilidad, sin embargo, este es modificado también ante una enfermedad benigna, lo que provoca que tenga una baja especificidad al no tener la capacidad de distinguir entre pacientes con y sin cáncer, llevando a altos porcentajes de biopsias innecesarias, sometiendo al paciente a un procedimiento que puede llevar a sangrado, infecciones e incluso la muerte, además de presentar manifestaciones psicológicas como ansiedad y depresión, por ello el dilucidar los mecanismos moleculares para su desarrollo es imperativo impactando en el desarrollo de nuevos biomarcadores o tratamientos específicos (Byun y cols., 2022; Wu y cols., 2021; Hendriks y cols., 2017; Cary y Cooperberg, 2013; Minervini y cols., 2014). Este estudio pretende identificar microRNAs con una expresión diferencial entre pacientes con y sin CaP, así mismo, busca explicar los posibles mecanismos que están implicados en dicha desregulación en la expresión génica, esto a través de establecer una relación entre la expresión de los miRNAs y mutaciones en regiones cercanas a ellos. El conocer los patrones de expresión y mutaciones en el tejido tumoral genera una base sólida sobre el comportamiento de estas moléculas, atribuyendo su desregulación a eventos de carcinogénesis, de ahí la importancia de iniciar el estudio de biomarcadores directamente en el tejido del órgano afectado.

## 10.1. Características clínicas de la población

Nuestra población de estudio consistió en pacientes con y sin CaP. Todos los pacientes con CaP fueron diagnosticados con adenocarcinoma prostático, lo cual concuerda con la Sociedad Americana del Cáncer, que en 2019 reportó que este es el tipo de CaP más común al momento del diagnóstico. En reportes realizados en población mexicana como el de Gomez-Gerra y cols., 2009 se observó que, en sus pacientes con enfermedades benignas de la próstata, la patología más común fue prostatitis (87%), seguido de hiperplasia benigna (7%), lo cual concuerda con nuestro grupo BPD en los que la patología más común fue prostatitis (60%).

Probablemente el factor de riesgo más importante en CaP es la edad. La Sociedad Americana del Cáncer en 2022 reportó que la media de edad para el diagnóstico de esta patología es de 66 años, lo que concuerda con nuestro grupo de pacientes con CaP quienes tuvieron una media de 66.55 años. En 2011 el grupo de Bechis y cols., reportó un metaanálisis que englobó a más de 13,000 pacientes, quienes tuvieron una media de edad de 66.2 al momento del diagnóstico. Además, nuestros análisis realizados mediante curvas ROC demuestran que la edad tiene un valor discriminativo muy interesante, lo que confirma la consistencia e importancia del factor de riesgo que es la edad.

El análisis de IMC mostró que no existe una relación con la presencia de CaP, lo cual concuerda con lo reportado por el grupo de investigación del Delgado-Balderas y cols., en 2020, quienes observaron una media de 27.02 ( $\pm 4.33$ ) en su grupo de pacientes con CaP y de 27.84 ( $\pm 5.52$ ) en su grupo de enfermedades benignas, sin observarse una diferencia



estadísticamente significativa. Es importante mencionar que la Sociedad Americana del Cáncer reportó en 2020 que la obesidad no es un factor de riesgo que esté relacionado con el desarrollo de esta patología.

El PSA es una proteína liberada por la próstata utilizada para la detección de CaP. Nuestros resultados muestran que no existen una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio, lo cual concuerda con lo reportado por Daniyal y cols., en 2014 quienes observaron que PSA no era específico para malignidad. Además, los análisis mediante curvas ROC mostraron que en nuestros pacientes el PSA no tenía un valor discriminativo estadísticamente significativo, lo que concuerda con los reportado por Gliglio y cols, en 2021 y Yang y cols., en 2022, quienes observaron en sus análisis que PSA no podía distinguir entre pacientes con y sin CaP.

La escala de Gleason es utilizada para conocer el grado de agresividad del tumor. De acuerdo con la escala, un Gleason de 6 o menos es considerado de baja agresividad, un Gleason de 7 es considerado de agresividad intermedia y de 8 en adelante es un tumor de agresividad alta. El 63.41% de nuestros pacientes con CaP se situaba en un Gleason 7, siendo el porcentaje más alto, y el menor porcentaje se situó en Gleason 6 con un 4.88% de los pacientes. Estos resultados son similares a los reportados por Abramovic y cols., en 2022 quienes observaron que el mayor porcentaje de sus pacientes con CaP, el 61.5% se encontraba en Gleason 7. Así mismo, esta enfermedad es silenciosa por lo que al momento del diagnóstico suele encontrarse en un Gleason intermedio-alto, esto concuerda con nuestros resultados donde el 95.12% de nuestros pacientes estaba en un Gleason mayor a 6,

siendo similar a lo reportado por Liang y cols., en 2009 quienes observaron que el 93% de sus pacientes estuvieron en un Gleason mayor a 6.

## **10.2. Análisis del perfil de expresión relativa de miRNAs**

El perfil de expresión génica de miRNAs es una herramienta prometedora para la detección de diversos cánceres, especialmente en CaP, donde la necesidad de nuevos marcadores mínimamente invasivos, sensibles y específicos es fundamental y urgente (Ignatiadis y cols., 2021; Chang y cols., 2021; Suer y cols., 2019; Moya y cols., 2019).

Numerosos estudios han mostrado la utilidad de los miRNAs para la detección y pronóstico de enfermedades (Byun y cols., 2022; Kim y cols., 2021., Giglio y cols., 2021; Lyu y cols., 2019; Suer y cols., 2019; Porzycki y cols., 2018). En diversos estudios, los miRNAs 141-3p (Osipov y cols., 2014; Xiao y cols., 2012), 145-5p (Wen-Xiu y cols., 2019; Wang y cols., 2015), 146a-5p (Fredsoe y cols., 2020; Huang y cols., 2017) and 148b-3p (Tomeva y cols., 2022; Feng y cols., 2019; Walter y cols., 2013) han sido sugeridos como biomarcadores interesantes en cáncer.

Los resultados obtenidos en esta investigación muestran que los miRNAs 145-5p y 148b-3p están diferencialmente expresados entre pacientes con y sin cáncer de próstata, sugiriendo que tienen un papel en el desarrollo de esta patología, así como un potencial para ayudar en la problemática actual que es distinguir entre pacientes con CaP y aquellos con una enfermedad benigna como prostatitis o hiperplasia. En el caso del miR145-5p se observó subexpresado en pacientes con CaP, lo que concuerda con lo reportado por diversos autores

como Karadag y cols., 2021, Liu y cols., 2021 y Kurul y cols., 2019, quienes han observado una subexpresión de este miRNA en tejido tumoral de pacientes con CaP. En el caso del miR148b-3p se observó una subexpresión estadísticamente significativa en los pacientes con CaP, lo cual es muy interesante ya que se han llevado a cabo algunos estudios analizando la expresión del miR148b-3p en cáncer, sin embargo, se han reportado diferentes conclusiones sobre su función como un miRNA supresor de tumores o un oncomiRNA. El grupo de Shan y cols., en 2021 observó que este miRNA estaba sobreexpresado en exosomas producidos por fibroblastos asociados a cáncer. En cáncer de pulmón, se ha observado que su expresión se asocia significativamente con el tamaño del tumor y el estadio tumoral, además, se ha observado que los pacientes con una alta expresión de este miRNA estaban en mejores condiciones de salud comparándolos con aquellos con bajos niveles de expresión del miRNA, por lo que este grupo sugiere que podría ser un interesante marcador pronóstico (Huang y cols., 2019). Existen muy pocos estudios llevados a cabo en CaP sobre el miR148b-3p, pero todos ellos sugieren que es un miRNA involucrado en el desarrollo de esta patología (Tomeva y cols., 2022; Feng y cols., 2019; Walter y cols., 2013).

En el caso de los miRNAs 141-3p y 146a-5p, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos de estudio, sin embargo, el patrón de expresión es similar al reportado previamente, donde el miR141-3p se ha observado sobreexpresado en pacientes con CaP con origen estadounidense e irlandés (Kumar y cols., 2018; Kelly y cols., 2015; Nguyen y cols., 2013) y el miR146a-5p se reporta subexpresado

en plasma y tejido de pacientes con la misma patología en población proveniente de Turquía, Dinamarca y China (Bolayirli y cols., 2022; Fredsøe y cols., 2020; Sun y cols., 2014).

Los análisis de correlación de la expresión de los miRNAs frente a características o variables clínicas (PSA, peso, edad, IMC) no identificaron una correlación entre estos, lo cual es positivo debido a que la expresión de los miRNAs no está siendo modificada por estos factores, sino que su desregulación puede atribuirse de forma más específica a los eventos de carcinogénesis. En el caso de las correlaciones entre miRNAs, se observó solamente una correlación entre el miR145-5p y el miR146a-5p, lo cual es interesante ya ambos genes codificantes de estos miRNAs se encuentran en el cromosoma 5 en regiones cercanas, en el caso del miR145-5p su localización es 5q33.1 y la del miR146a-5p es 5q33.3, esta cercanía puede sugerir que existe algún mecanismo molecular que lleve a que ambos miRNAs tiendan a desregularse. Esta hipótesis concuerda con lo reportado por Wang y cols., en 2008 quienes observaron que la localización 5q32-5q-33 se puede considerar como una región que frecuentemente es perdida o cortada (CDR, por sus siglas en inglés). Además, en 2009 el grupo de Starczynowski y cols., observaron que la pérdida de esta región en 5q disminuía los niveles del miR145-5p y del miR146a-5p, lo que llevaba a la activación y desregulación de cascadas de señalización incidiendo en algunas patologías como la leucemia.

### **10.3. Identificación y análisis de mutaciones**

Los miRNAs miR148b-3p y miR145-5p tuvieron diferencias significativas en la expresión relativa entre los grupos de estudio, por ello, se procedió a realizar el análisis de mutaciones en estos dos miRNAs.

#### **10.3.1. Mutaciones en regiones cercanas al miR145-5p**

En el caso del miR145-5p se identificaron diversas mutaciones, entre ellas, la que presentaba una mayor frecuencia fue la mutación rs353291. Esta mutación se encuentra en una región intrónica del gen CARMN, a 450 pb río abajo del miR145-5p. Según la base de datos de NCBI en la población global este SNV tiene una frecuencia del alelo mutado de C = 0.40 y del alelo normal de T = 0.60. En nuestra población de estudio las frecuencias en población general fueron de C = 0.18 y T = 0.82, las cuales son muy similares a las reportadas en población africana y afroamericanos (C = 0.23 y T = 0.77) y a las reportadas en latinoamericanos (C = 0.30 y T = 0.70). Siendo la población asiática la menos parecida a nuestras frecuencias (C = 0.41 y T = 0.59) (Sherry y cols., 2001).

Nuestros resultados indican que la mutación rs353291 no está relacionada con CaP ni con la subexpresión del miR145-5p. En la actualidad, solamente existe un reporte, donde se analiza la relación de este SNV del miR145-5p con cáncer, el cual es el estudio de Chacon-Cortes y cols., en 2015 en población australiana, quienes observaron que el alelo mutado se relacionaba significativamente con cáncer de mama, además, ellos sugieren que este SNV

podría ser parte de los mecanismos de regulación génica del miR145-5p, sin embargo, es importante mencionar que ellos no analizaron la expresión del miRNA.

Probablemente la causa de la desregulación de este miRNA en CaP no se deba a mutaciones cercanas al miRNA, sino a otro tipo de mecanismos moleculares, como la metilación de ADN. Esto concuerda con algunos estudios previos, por ejemplo, en 2010, el equipo de Zaman y cols., reportó que el promotor de este miRNA estaba hipermetilado en líneas celulares de CaP. Así mismo, algunos estudios han mostrado que la implicación de la metilación en la regulación de la expresión del miR145-5p contribuye al crecimiento del tumor y la respuesta al tratamiento (Bellissimo y cols., 2017; Donzelli y cols., 2015). Además, Xue y cols., en 2015 observaron que el miR145-5p tiene como diana a la metiltransferasa DNMT3b, siendo este uno de sus mecanismos como miRNA supresor de tumores. Además, observaron que DNMT3b lleva a la hipermetilación del promotor del miRNA, existiendo una regulación por retroalimentación entre ambos. Para nuestro conocimiento, el único reporte que analiza la regulación por mecanismos epigenéticos de este miRNA en tejido de pacientes con CaP es el realizado por Suh y cols., en 2011 en población estadounidense, quienes observaron una relación entre la subexpresión de este miRNA con la hipermetilación en su región promotora. Lo anterior sugiere que los mecanismos epigenéticos en la regulación del miR145-5p pueden ser la causa más común en la desregulación de su expresión génica.

### 10.3.2. Mutaciones en regiones cercanas al miR148b-3p

Hasta el momento no se han estudiado los mecanismos que llevan a la desregulación del miR148b-3p en CaP. En nuestro estudio identificamos un conjunto de deleciones con sitio de inicio en chr12:54337042/54337043, las cuales fueron unificadas y llamadas DelsAAG Unidas. Esta mutación estuvo relacionada con la presencia de CaP, así mismo, se relacionó con la subexpresión del miR148b-3p. Estas deleciones se encuentran localizadas en una región particular, específicamente en el primer intrón del gen COPZ1, en la secuencia que comprende chr12:54337020–54337044 existe un conjunto de 25 adeninas en tándem, comportándose como un microsatélite puro o perfecto y como se ha reportado previamente este tipo de sitios repetidos son puntos calientes para mutaciones, ya que son susceptibles a la generación de deleciones e inserciones, siendo altamente polimórficos, teniendo índices de mutación que van de  $10^3$  y  $10^6$  por cada generación de células, esto podría explicar la existencia de las diversas mutaciones en el sitio analizado (Nesta y cols., 2021; Vieira y col., 2016; Gemayel y cols., 2012). Según la base datos de GeneCards (Fishilevich y cols., 2017), esta mutación está en una región que funciona como un potenciador intragénico (ID: GH12J054336) de tipo proximal, el cual podría ser un regulador clave que actúa en cis promoviendo la expresión del miR148b-3p (Peng y Zhang., 2018). Así mismo, de acuerdo con la base de datos de ENSEMBL esta mutación se encuentra dentro de un sitio de unión para los factores de transcripción E2F1, E2F2 y E2F3 (chr:54337040–54337055) (Cunningham y cols., 2022), previamente ya se ha descrito que estos factores de transcripción pueden regular la expresión de otros miRNAs, como los miRNAs 17 y 20,

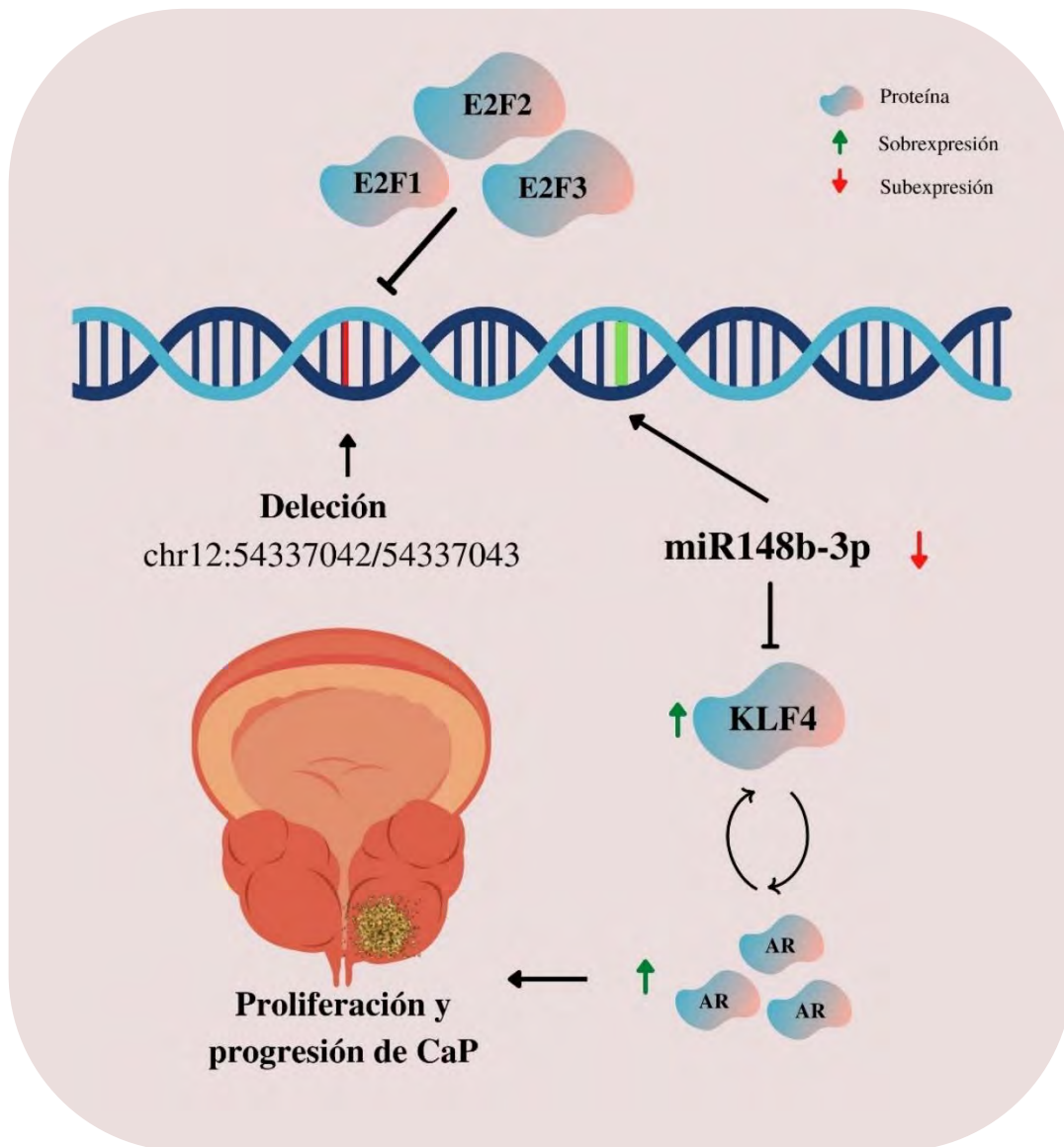
uniéndose a su promotor y promoviendo su expresión (Sylvestre y cols., 2007; Woods y cols., 2007; O'Donnel y cols., 2005). Esto concuerda con lo reportado, ya que aproximadamente el 50% de las variantes o mutaciones que se presentan en regiones de unión de factores de transcripción (RUFT) se localizan en regiones intrónicas (de Santiago y cols., 2017). Previamente se ha reportado en CaP algunas mutaciones en RUFTs que pueden modificar la afinidad de estos y estar implicados en el desarrollo de la patología. Por ejemplo, el grupo de Huang y cols., 2014, reportó que un SNV incrementa la afinidad de unión de HOXB13, resultando en la sobreexpresión de RFX6, llevando a proliferación, migración e invasión de células tumorales de la próstata. Así mismo, el polimorfismo rs7077275 incrementa la unión de CTFC, lo que lleva a la sobreexpresión de CTBP2, disminuyendo la apoptosis e incrementando el crecimiento tumoral en CaP (Zhang y cols., 2019; Huang y cols., 2014). El grupo de Eickhardt y cols., en 2016 reportó que las deleciones son variaciones más disruptivas que los SNVs, llevando a una mayor modificación en la afinidad de los factores de transcripción por la secuencia afectada. Lo anteriormente descrito, indica que la mutación DelsAAG Unidas podría afectar la unión de dichos factores de transcripción y por tanto que no se lleve a cabo o se disminuya la transcripción del miR148b-3p.

Este miRNA participa directamente en mecanismos moleculares relacionados con el desarrollo de CaP. El grupo de investigación de Tomeva y cols., en 2022 observaron que el miR148b-3p estaba subexpresado en tumores que presentan mutaciones en el receptor de andrógenos (AR). El grupo de investigación de Feng y cols., en 2019 observó que este miRNA estaba subexpresado en tejido tumoral de pacientes con CaP, además, observaron



que la región UTR-3' del gen KLF4 contiene el sitio conservado de unión del miR148b-3p, lo que lo convierte en un potencial blanco para la unión de este miRNA, lo cual fue comprobado mediante sus experimentos in vitro (Feng y cols., 2019). KLF4, es un factor de transcripción que puede regular la expresión de diversos genes y que se ha observado sobrexpresado en CaP previamente (Wei y cols., 2018). Este factor de transcripción parece tener una importante implicación en la próstata, ya que el grupo de investigación de Siu y cols., en 2016 observó una relación recíproca entre KLF4 y el receptor de andrógenos (AR), donde AR puede inducir la expresión de este factor de transcripción y a su vez KLF4 puede unirse al promotor del AR generando su transcripción. A su vez, la actividad del AR está alterada comúnmente en CaP lo que promueve la proliferación y progresión de este cáncer (Desai y cols., 2021; Auchus y Sharifi., 2020).

Por lo anterior proponemos que la mutación cercana al miR148b-3p que comprende un conjunto de deleciones en un sitio de unión para factores de transcripción, promueve la subexpresión del miRNA, lo que lleva a que éste no pueda regular la expresión de KLF4, aumentando su expresión y a su vez llevando a que el receptor de andrógenos se sobreexpresé, potenciando la proliferación y progreso del CaP (Figura 15). Así, este estudio se convierte en el primero en proponer una vía de regulación de la expresión del miR148b-3p en CaP.



**Figura 15. Regulación de la expresión génica del miR148b-3p.**

La delección en un sitio cercano al miR148b-3p podría disminuir la afinidad de los factores de transcripción, afectando la transcripción del miRNA y disminuyendo su expresión, culminando en la proliferación y progresión de las células de CaP por medio del AR.

#### **10.4. Potencial discriminativo de los miRNAs**

Al realizar análisis para identificar el valor predictivo de los miRNAs mediante curvas ROC, se observó que el miR148b-3p era el único que de forma individual podía distinguir ambos grupos de estudio, al tener los mayores valores de sensibilidad y especificidad, nuestros resultados muestran que el miR148b3-p tiene un interesante potencial para la detección de CaP.

Al combinar las variables más significativas en un modelo utilizando regresión logística binaria, se obtuvo una alta sensibilidad y especificidad con un AUC de 0.918, este modelo se obtuvo combinando la expresión relativa de los cuatro miRNAs de estudio y la edad de los pacientes. El modelo predictivo más simple y con interesantes valores de especificidad y sensibilidad se obtuvo mediante la combinación de la expresión génica del miR148b-3p y la edad, con un AUC de 0.818, lo que evidencia una alternativa que involucraría un menor costo y tiempo de análisis.

Estos resultados son interesantes ya que al comparar con los valores reportados para PSA y el tacto rectal, que son los dos métodos de detección más utilizados para CaP, vemos que estos tienen un valor discriminativo menor, por ejemplo, en 2013 el grupo de López Chente-Casado y cols, reportó que, en su muestra de 627 pacientes, el tacto rectal tuvo una sensibilidad del 64.8% y una especificidad del 2.7%. En 2007 el grupo de Medrano-Sánchez y cols., observó en 340 pacientes mexicanos que PSA tenía una sensibilidad del 68%. En años más recientes, el grupo de Merriel y cols., reportaron un metanálisis que comprendía

más de 14,000 pacientes, en los que se identificó que el PSA tenía una sensibilidad del 93%, pero una baja especificidad del 20%, resultados muy similares a los obtenidos en el mismo año por el grupo de Jin y cols., en un metanálisis de más de 8000 pacientes, obteniendo una sensibilidad del 92% y una especificidad del 16% para PSA. Los reportes mencionados y nuestros resultados resaltan la importancia de buscar nuevas herramientas para la detección de CaP como los miRNAs y particularmente el miR148b-3p el cual ha evidenciado ser un potencial biomarcador para la detección de CaP.

## **XI. CONCLUSIONES**

### **11.1. Conclusión general**

Las mutaciones en regiones cercanas al gen que codifica para un miRNA pueden estar relacionadas con su expresión y ser parte de los mecanismos de regulación en un evento patogénico como CaP, específicamente la mutación DelsAAG Unidas está relacionada con la subexpresión del miR148b-3p en pacientes con CaP.

### **11.2 Conclusiones específicas**

- Los miRNAs miR148b-3p y miR145-5p están subexpresados en pacientes con CaP.
- Los miRNAs miR141-3p y 146a-5p no se observaron desregulados de manera significativa en la población estudiada.
- El genotipo heterocigoto y el alelo anormal de la mutación DelsAAG Unidas del miR148b-3p están relacionados con la presencia de CaP.
- La mutación DelsAAG Unidas está relacionada con la subexpresión del miR148b-3p en CaP.
- No se identificaron mutaciones relacionadas con la subexpresión del miR145-5p.
- Existe una correlación positiva entre la expresión del miR145-5p y el miR146a-5p.
- No se observaron correlaciones entre las características clínicas de los pacientes y la expresión de los miRNAs, por lo que su desregulación puede atribuirse de forma más específica a los eventos de carcinogénesis.

## **XII. LIMITACIONES DEL PROYECTO**

1. El análisis de mutaciones del miR145-5p se llevó a cabo en 44 de las 71 muestras de estudio.
2. Es importante analizar la expresión y mutaciones en distintas y con un mayor número de población.
3. Con el fin de aplicar estos resultados es importante realizar el análisis de expresión en un fluido corporal.
4. El análisis de mutaciones se limita a una región de 1000 pb aproximadamente.

### XIII. BIBLIOGRAFÍA

Altuvia Y., Landgraf P., Lithwick G., Elefant N., Pfeffer S., Aravin A., Brownstein M. J., Tuschl T., Margalit H. (2005). Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 33, 2697-2706.

American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2016. (2016). *American Cancer Society*.

Avgeris M., Stravodimos K., Fragoulis E. G., Scorilas A. (2013). The loss of the tumour-suppressor miR-145 results in the shorter disease-free survival of prostate cancer patients. *British journal of cancer*, 108(12), 2573–2581.

Auchus R. J., Sharifi N. (2020). Sex Hormones and Prostate Cancer. *Annu Rev Med*, 71, 33-45.

Bellissimo T., Ganci F., Gallo E., Sacconi A., Tito C., De Angelis L., Pulito C., Masciarelli S., Diso D., Anile M. (2017). Thymic epithelial tumors phenotype relies on miR-145-5p epigenetic regulation. *Mol. Cancer*, 16(1), 88.

Blaszczyk J., Tropea J. E., Bubunenko M., Routzahn K. M., Waugh D. S., Court D. L., Ji X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure*, 9, 1225-1236.

Bolayırılı I. M., Önal B., Adıgüzel M., Konukoğlu D., Demirdağ Ç., Kurtuluş E. M., Türegün F. A., Uzun H. (2022). The clinical significance of circulating miR-21, miR-142, miR-143, and miR-146a in patients with prostate cancer. *J Med Biochem*, 41(2), 191-198.

Borchert G. M., Lanier W., Davidson B. L. (2006). RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology*, 13, 1097-1101.

Brase J. C., Johannes M., Schlomm T., Fälth M., Haese A., Steuber T., Beissbarth T., Kuner R., Sültmann H. (2001). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *International Journal of Cancer*, 128, 608-616.

Cai X., Hagedorn C. H., Cullen B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA Journal*, 10, 1957-1966.

Cai Y., Yu X., Hu S., Yu J. (2009). A Brief review on the Mechanisms of miRNA regulation. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 7(4), 147-154.

Carter B., Bova G., Beaty T., Steinberg G., Childs B., Isaacs W., Walsh, P. (1993). Hereditary prostate cancer: epidemiologic and clinical features. *Journal of Urology*, 150, 797-802

Chacon-Cortes D., Smith R. A., Haupt L. M., Lea R. A., Youl P. H., Griffiths L. R. (2015). Genetic association analysis of miRNA SNPs implicates MIR145 in breast cancer susceptibility. *BMC medical genetics*, 16, 107.



Chendrimada T. P., Gregory R. I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shikhattar R. (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436:740-744.

Chen M., Zhou Z. Y., Chen J. G. (2014). Effect of miR-146a polymorphism on biochemical recurrence risk after radical prostatectomy in southern Chinese population. *Genet Mol Res*, 13(4), 10615-10621.

Chen X., Wang G., Lu X. (2014). Polymorphisms and haplotypes of the miR-148/152 family are associated with the risk and clinicopathological features of gastric cancer in a Northern Chinese population. *Mutagenesis*, 29(6), 401-407

Chu H., Zhong D., Tang J. (2016). A functional variant in miR-143 promoter contributes to prostate cancer risk. *Arch Toxicol*, 90(2), 403-414.

Cunningham F., Allen J. E., Allen J., Alvarez-Jarreta J., Amode M. R., Armean I. M., Austine-Orimoloye O., Azov A. G., Barnes I., Bennett R., Berry A., Bhai J., Bignell A., Billis K., Boddu S., Brooks L., Charkhchi M., Cummins C., Da Rin Fioretto L., Davidson C., Dodiya K., Donaldson S., El Houdaigui B., El Naboulsi T., Fatima R., Giron CG, Genez T, Martinez JG, Guijarro-Clarke C, Gymer A, Hardy M, Hollis Z, Hourlier T, Hunt T, Juettemann T, Kaikala V, Kay M, Lavidas I, Le T, Lemos D, Marugán JC, Mohanan S, Mushtaq A, Naven M, Ogeh DN, Parker A, Parton A, Perry M, Piližota I, Prosovetskaia I, Sakthivel MP, Salam AIA, Schmitt BM, Schuilenburg H, Sheppard D, Pérez-Silva JG, Stark W, Steed E, Sutinen K, Sukumaran R, Sumathipala D, Suner MM, Szpak M, Thormann A,

Tricomi FF, Urbina-Gómez D, Veidenberg A, Walsh TA, Walts B, Willhoft N, Winterbottom A, Wass E, Chakiachvili M, Flint B, Frankish A, Giorgetti S, Haggerty L, Hunt SE, Iisley GR, Loveland JE, Martin FJ, Moore B, Mudge JM, Muffato M, Perry E, Ruffier M, Tate J, Thybert D, Trevanion SJ, Dyer S, Harrison PW, Howe KL, Yates AD, Zerbino DR, Flicek P. (2022). Ensembl 2022. *Nucleic Acids Res*, 50(D1), D988-D995.

Damodaran M., Paul S. F. D., Venkatesan V. (2020). Genetic Polymorphisms in miR-146a, miR-196a2 and miR-125a Genes and its Association in Prostate Cancer. *Pathol Oncol Res*, 26(1), 193-200

Daniyal M., Siddiqui A., Akram Z., Asif M., Sabira S., Asmatullah K. (2014). Epidemiology, Etiology, Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer. *Asian Pacific Jorunal of Cancer Prevention*, 15(22), 9575-9578.

Desai K., McManus J. M., Sharifi N. (2021). Hormonal Therapy for Prostate Cancer. *Endocr Rev*, 25, 42(3), 354-373.

de Santiago I., Liu W., Yuan K., O'Reilly M., Chilamakuri C. S., Ponder B. A., Meyer K. B., Markowitz, F. (2017). BaalChIP: Bayesian analysis of allele-specific transcription factor binding in cancer genomes. *Genome. Biol*, 18, 39.

Djavan, B., Nasu, Y. (2001). Prostate Cancer Gene Therapy –What have we learned and where are we going? *Reviews in urology*, 3(4), 179-186.

Donzelli S., Mori F., Bellissimo T., Sacconi A., Casini B., Frixia T., Roscilli G., Aurisicchio L., Facciolo F., Pompili A. (2015). Epigenetic silencing of miR-145-5p contributes to brain metastasis. *Oncotarget*, 6(34), 35183.

Eickhardt E., Damm T., Grove J., Dupont A., Lescai F. (2016). Estimating the functional impact of INDELs in transcription factor binding sites: a genome-wide landscape. *bioRxiv*.

Esquela-Kerscher, A., Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 6, 259-269.

Feng F., Hui L., Aiping C., Qinghua X., Yong Z., Xunbo J., Jianjun H., Feng F., Liu H., Chen A. (2019). miR-148-3p and miR-152-3p synergistically regulate prostate cancer progression via repressing KLF4. *J Cell Biochem*, 120(10), 17228-17239.

Feng Y., Zhang X., Graves P., Zeng Y. (2012). A comprehensive analysis of precursor microRNA cleavage by human Dicer. *RNA*, 18, 2083-2092.

Fishilevich S., Nudel R., Rappaport N., Hadar R., Plaschkes I., Stein T. I., Rosen N., Kohn A., Twik M., Safran M., Lancet D., Cohen D. (2017). GeneHancer: genome-wide integration of enhancers and target genes in GeneCards. *Database*, bax028.

Fredsøe J., Rasmussen A. K. I., Mouritzen P. (2020). Profiling of Circulating microRNAs in Prostate Cancer Reveals Diagnostic Biomarker Potential. *Diagnostics (Basel)*, 10(4), 188.

Gao Y., Bing F., Siqi H., Kai Z., Jing C., Chen L., Rui W., Longbang C. (2016). The Roles of MicroRNA-141 in Human Cancers: From Diagnosis to Treatment. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 38, 427-448.

Gemayel R., Cho J., Boeynaems S., Verstrepen K. J. (2012). Beyond Junk-Variable Tandem repeats as facilitators of rapid evolution of regulatory and coding sequences. *Genes*, 3, 461-480.

GLOBOCAN. (2020). Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2020. International Agency for Research on Cancer, <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>

Gregory R. I., Chendrimada T. P., Cooch N., Shiekhattar R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 631-640.

Haldrup C., Kosaka N., Ochiya T., Borre M., Hoyer S., Orntoft T. F., Sorensen K. D. (2014). Profiling of circulating microRNAs for prostate cancer biomarker discovery. *Drug Delivery and Translational Research*, 4, 19-30.

Han J., Lee Y., Yeom K. H., Kim Y. K., Jin H., Kim V. N. (2004). The Drosha DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*, 18, 3016-3027.

Han J., Lee Y., Yeom K. H., Nam J. W., Heo I., Rhee J. K., Sohn S. Y., Cho Y., Zhang B. T., Kim V. N. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125, 887-901.

Han J., Pedersen J. S., Kwon S. C., Belair C. D., Kim Y. K., Yeom K. H., Yang W. Y., Haussler D., Belloch R., Kim V. N. (2009). Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 136, 75-84.

Huang Q., Whittington T., Gao P., Lindberg J. F., Yang Y., Sun J., Väisänen M. R., Szulkin R., Annala M., Yan J. (2014). A prostate cancer susceptibility allele at 6q22 increases RFX6 expression by modulating HOXB13 chromatin binding. *Nat. Genet*, 46, 126–135.

Huang Y., Tao T., Liu C. (2017). Upregulation of miR-146a by YY1 depletion correlates with delayed progression of prostate cancer. *Int J Oncol*, 50(2), 421-431.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2020). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero). *INEGI*.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Mujeres y hombres en México. (2009). Decimotercera edición. México. *INEGI*.

Jin W., Fei X., Wang X., Song Y., Chen F. (2020). Detection and Prognosis of Prostate Cancer Using Blood-Based Biomarkers. *Mediators of inflammation*, 8730608.

Jin X. F., Wu N., Wang L., Li J. (2013). Circulating microRNAs: a novel class of potential biomarkers for diagnosing and prognosing central nervous system diseases. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 33(5), 601-613.

Kelly B. D., Miller N., Sweeney K. J., Durkan G. C., Rogers E., Walsh K., Kerin M. J. (2015). A Circulating MicroRNA Signature as a Biomarker for Prostate Cancer in a High Risk Group. *J Clin Med*, 4(7), 1369-79.

Kotarac N., Dobrijevic Z., Matijasevic S., Savic-Pavicevic D., Brajuskovic G. (2019). Analysis of association of potentially functional genetic variants within genes encoding miR-34b/c, miR-378 and miR-143/145 with prostate cancer in Serbian population. *EXCLI journal*, 18, 515–529.

Kumar B., Rosenberg A. Z., Choi S. M., Fox-Talbot K., De Marzo A. M., Nonn L., Brennen W. N., Marchionni L., Halushka M. K., Lupold S. E. (2018). Cell-type specific expression of oncogenic and tumor suppressive microRNAs in the human prostate and prostate cancer. *Sci Rep*, 8(1), 7189.

Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K. H., Lee S., Baek S. H., Kim V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymease II. *Embo Journal*, 23, 4051-4060.

Leng S., Bernauer A. M., Zhai R., Tellez C. S., Su L., Burki E. A., Picchi M. A., Stidley C. A., Crowell R. E., Christiani D. C., Belinsky S. A. (2011). Discovery of common SNPs in the miR-205/200 family-regulated epithelial to mesenchymal transition pathway and their association with risk for non-small cell lung cancer. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2(2), 145–155.

Li Z., Ran T. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13, 622–638.

Lin S., Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews*, 15, 321-333.

Liu Y., Gao S., Du Q., Shao M. (2019). miR-146a and miR-152 in prostate cancer and clinicopathological parameters. *J BUON*, 24(4), 1692-1699.

Livak K. J., Shmittgen T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods*, 25(4), 402-408.

López-Fontana C. M., Recalde-Rincón G. M., Messina-Lombino D., Uvilla-Recupero A. L., Pérez-Elizalde R. F., López-Laur J. D. (2009). El índice de masa corporal y la dieta afectan el desarrollo del cáncer de próstata. *Actas Urol Esp*, 33(7), 741-746.

Lugo-Trampe A., Trujillo-Murillo K. C. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina Universitaria*, 11(44), 187-192.

Maniataki E., Mourelatos Z. (2005). A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes & Development*, 19, 2979-2990.

Medina-Villaamil V., Martínez-Breijo S., Portela-Pereira P., Quindós-Varela M., Santamarina-Caínzos I., Antón-Aparicio L.M., Gómez-Veiga F. (2014). MicroARN circulantes en sangre de pacientes con cáncer de próstata. *Actas Urológicas Españolas*, 38 (10), 633-639.

Mendell J. T., Olson E. N. (2012). MicroRNAs in stress signaling and human disease. *Cell*, 148(6), 1172-1187.

Mi Y., Ren K., Zou J. (2018). The Association Between Three Genetic Variants in MicroRNAs (Rs11614913, Rs2910164, Rs3746444) and Prostate Cancer Risk. *Cell Physiol Biochem*, 48(1), 149-157.

Minervini A., Vittori G., Siena G., Carini M. (2014). Morbidity and psychological impact of prostate biopsy: the future calls for a change. *Asian Journal of Andrology*, 16(3), 415-7.

Morlando M., Ballarino M., Gromak N., Pagano F., Bozzoni I., Proudfoot N. J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature Structural & Molecular Biology*, 15:902-909.

National Cancer Institute (NIH). (2017). Prostate Cancer Treatment (PFQ®)-Health Professional Version. Recuperado el 09-10-17.

National Cancer Institute (NIH) (2017). SEER Stat Fact Sheets: Prostate. Recuperado el 05-11-17.

Nesta A. V., Tafur D., Beck C. R. (2021). Hotspots of Human Mutation. *Trends Genet*, 37(8), 717-729.

Nguyen H. C., Xie W., Yang M., Hsieh C. L., Drouin S., Lee G. S., Kantoff P. W. (2013). Expression differences of circulating microRNAs in metastatic castration resistant prostate cancer and low-risk, localized prostate cancer. *Prostate*, 73(4), 346-54.



Nikolić Z. Z., Savić Pavićević D. L., Vukotić V.D., Tomović S. M., Cerović S. J., Filipović N., Romac S. P., Brajušković G. N. (2014). Association between genetic variant in hsa-miR-146a gene and prostate cancer progression: evidence from Serbian population. *Cancer Causes Control*, 25(11), 1571-1575.

Organización mundial de la salud (OMS). (2021). Cáncer. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.

Osipov I. D., Zaporozhchenko I. A., Bondar A. A., Zaripov M. M., Voytsitskiy V. E., Vlassov V. V., Laktionov P. P., Morozkin E. S. (2016). Cell-Free miRNA-141 and miRNA-205 as Prostate Cancer. *Biomarkers Advances in Experimental Medicine and Biology. Adv Exp Med Biol*, 924:9-12.

Peng Y., Zhang Y. (2018). Enhancer and super-enhancer: Positive regulators in gene transcription. *Animal Model Exp Med*, 25, 1(3), 169-179.

Porkka K. P., Pfeiffer M. J., Waltering K. K., Vessella R. L., Tammela T. L. J., Visakorpi, T. (2007). MicroRNA Expression Profiling in Prostate Cancer. *Cancer Research*, 67(13), 6130-6135.

sal Romero-Cordoba S. L., Salido-Guadarrama I., Rodriguez-Dorantes M., Higaldo-Miranda, A. (2014). miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biology & Therapy*, 15, 11, 1444-1455.

Schulz W. A., Burchardt M., Cronauer M. V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*, 9(8), 437-448.

Selth L. A., Roberts M. J., Chow C. W., Marshall V. R., Doi S. A., Vincent A. D., Butler L. M., Lavin M. F., Tilley W. D., Gardiner R. A. (2014). Human seminal fluid as a source of prostate cancer-specific microRNA biomarkers. *Endocr. Relat. Cancer*, 21, L17–L21.

Sherry S. T., Ward M. H., Kholodov M., Baker J., Phan L., Smigielski E. M., Sirotkin K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 1, 29(1), 308-11.

Simon A. R., Severgnini M., Takahashi S., Rozo L., Andrahbi B., Agyeman A., Fanburg B. L. (2005). 5-HT Induction of c-fos Gene Expression Requires Reactive Oxygen Species and Rac1 and Ras GTPases. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 42(3), 263–276.

Siu M. K., Suau F., Chen W. Y., Tsai Y. C., Tsai H. Y., Yeh H. L., Liu Y. N. (2016). KLF4 functions as an activator of the androgen receptor through reciprocal feedback. *Oncogenesis*, 19, 5(12), e282.

Stamey T. A., Ekman P. E., Blankenstein M. A., Cooper E. H., Kontturi M., Lilja H., Oesterling J. E., Stenman U. H., Turkes A. (1994). Tumor markers. Consensus Conference on Diagnosis and Prognostic Parameters in Localized Prostate Cancer. *Scandinavian journal of urology and nephrology*. 1994; 162:73-87.

Suh S. O., Chen Y., Zaman M. S., Hirata H., Yamamura S., Shahryari V., Liu J., Tabatabai Z. L., Kakar S., Deng G., Tanaka Y., Dahiya R. (2011). MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer. *Carcinogenesis*, 32(5), 772-8.

Sun Q., Zhao X., Liu X. (2014). miR-146a functions as a tumor suppressor in prostate cancer by targeting Rac1. *Prostate*, 74(16), 1613-1621.

Sylvestre Y., De Guire V., Querido E. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J Biol Chem*, 282(4), 2135–2143.

Taganov K. D., Boldin M. P., Chang K. J. Baltimore D. (2006) NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103, 12481–12486.

Taylor S. C., Nadeau K., Abbasi M., Lachance C., Nguyen M., Fenrich J. (2019). The Ultimate qPCR Experiment: Producing Publication Quality, Reproducible Data the First Time. *Trends Biotechnol*, 37(7), 761-774.

Tian T., Shu Y., Chen J., Hu Z., Xu L., Jin G., Liang J., Liu P., Zhou X., Miao R., Ma H., Chen Y., Shen H. (2009). A functional genetic variant in microRNA-196a2 is associated with increased susceptibility of lung cancer in Chinese. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18(4), 1183-7.

Uribe J. F. (2005). Cáncer de próstata: ¿Por qué se produce el Cáncer de Próstata? *Urología Colombiana*, 14(21), 19-32.

Vieira M. L., Santini L., Diniz A. L., Munhoz C. F. (2016). Microsatellite markers: what they mean and why they are so useful. *Genet Mol Biol*, 39(3), 312-28.

Walter B. A., Valera V. A., Pinto P. A., Merino M. J. (2013). Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *Journal of Cancer*, 4(5), 350–357.

Wang C., Tao W., Ni S., Chen Q., Zhao Z., Ma L., Fu Y., Jiao Z. (2015). Tumor-suppressive microRNA-145 induces growth arrest by targeting SENP1 in human prostate cancer cells. *Cancer science*, 106(4), 375–382.

Wang J., Bi J., Liu X., Li K., Di J., Wang B. (2012). Has-miR-146a polymorphism (rs2910164) and cancer risk: a meta-analysis of 19 case-control studies. *Mol Biol Rep*, 39(4), 4571-4579.

Watahiki A., Wang Y., Morris J., Dennis K., O'Dwyer H. M., Gleave M., Gout P. W., Wang Y. (2011). MicroRNAs associated with metastatic prostate cancer. *PloS one*, 6(9), e24950.

Wei L. Z., Wang Y. Q., Chang Y. L. (2018). Imbalance of a KLF4-miR-7 auto-regulatory feedback loop promotes prostate cancer cell growth by impairing microRNA processing. *Am J Cancer Res*, 8(2), 226-244.

Wen-Xiu X., Zhen L., Fei D., Dan-Dan W., Xing-Wang L., Tian T., Jian Z., Jin-Hai T. (2019). MiR-145: a potential biomarker of cancer migration and invasion. *Tang Am J Transl Res*, 11(11), 6739-6753.

Woods K., Thomson J. M., Hammond S. M. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem*, 282(4), 2130–2134.

Wu J., Huang Q., Meng D., Huang M., Li C., Qin T. (2016). A Functional rs353293 Polymorphism in the Promoter miR-143/145 Is Associated with a Reduced Risk of Bladder Cancer. *PloS one*, 11(7), e0159115.

Wu J., Ji A., Wang X., Zhu Y., Yu Y., Lin Y., Liu Y., Li S., Liang Z., Xu X., Zheng X., Xie L. (2015). MicroRNA-195-5p, a new regulator of Fra-1, suppresses the migration and invasion of prostate cancer cells. *J Transl Med*, 4, 13, 289.

Wu M., Jolicoeur N., Li Z., Zhang L., Fortin Y., L'Abbe, D., Yu Z. Shen S. H. (2008) Genetic variations of microRNAs in human cancer and their effects on the expression of miRNAs. *Carcinogenesis*, 29, 1710–1716.

Xiao J., Gong A.Y., Eischeid A.N., Chen D., Deng C., Young C. Y., Chen X. M. (2012). miR-141 modulates androgen receptor transcriptional activity in human prostate cancer cells through targeting the small heterodimer partner protein. *Prostate*, 72(14), 1514-22.

Xie F., Xiao P., Chen D., Xu L., Zhang B. (2012). miRDeepFinder: a miRNA analysis tool for deep sequencing of plant small RNAs. *Plant molecular biology*, 80 (1), 75-84.

Xu B., Feng N. H., Li P. C., Tao J., Wu D., Zhang Z. D., Tong N., Wang J. F., Song N. H., Zhang W., Hua L.X., Wu H. F. (2010). A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate*. 2070(5), 467-472.

Xue G., Ren Z., Chen Y., Zhu J., Du Y., Pan D., Li X., Hu B. (2015). A feedback regulation between miR-145 and DNA methyltransferase 3b in prostate cancer cell and their responses to irradiation. *Cancer Lett*, 28, 361(1), 121-7.

Yi R., Qin Y., Macara I. G., Cullen B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*, 17, 3011-3016.

Yuan F., Sun R., Li L., Jin B., Wang Y., Liang Y., Che G., Gao L., Zhang L. (2016). A functional variant rs353292 in the flanking region of miR-143/145 contributes to the risk of colorectal cancer. *Scientific reports*, 6, 30195.

Zaman M. S., Chen Y., Deng G., Shahryari V., Suh S., Saini S., Majid S., Liu J., Khatri G., Tanaka Y. (2010). The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *Br. J. Cancer* ,103(2), 256–264.

Zeng Y., Cullen B. R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Research*, 32, 4776-4785.

Zhao Z., Xiangdong Y., Lei X., Xuexiong L., Yupeng F., Feng L., Li L. (2014). MiR-26a inhibits prostate cancer progression by repression of Wnt5a. *Tumor Biology*, 35(10), 9725-33.

Zhang P., Tillmans L. S., Thibodeau S. N., Wang L. (2019). Single-Nucleotide Polymorphisms Sequencing Identifies Candidate Functional Variants at Prostate Cancer Risk Loci. *Genes*, 10, 547

## XIV. ANEXOS

### 14.1. Perspectivas

- Analizar expresión y mutaciones del miR148b-3p en suero de pacientes con y sin CaP.
- Aumentar el número de pacientes analizados.
- Realizar el artículo sobre mutaciones y su relación con expresión del miR148b-3p.
- Analizar la expresión de KLF4 en suero y tejido de pacientes con CaP.

### 14.2. Productos

#### 14.2.1 Artículos publicados

Como primer autor:

- **Bergez-Hernandez F.**, Arámbula-Meraz E., Alvarez-Arrazola M., Irigoyen-Arredondo M., Luque-Ortega F., Martínez-Camberos A., Cedano-Prieto D., Contreras-Gutierrez J., Martínez-Valenzuela C. (2022). Expression analysis of miRNAs and their potencial roles a biomarkers for prostate cancer detection. *American Journal of Men's Health*. (Aceptado, en proceso de publicación).
- Cedano-Prieto D. M.\*, **Bergez-Hernandez F.\***, Leal-Leon E. A., Garcia-Magallanes N., Luque-Ortega F., Picos-Cardenas V., Guerrero-Arambula E., Gutierrez-Zepeda B., Romo-Martinez E., Arambula-Meraz E. (2022). Altered Expression of Survivin Variants S-2B and S-WT in Breast Cancer Is Related to Adipokine Expression. *J Oncol*, 2022, 7398444.

- Arámbula-Meraz E.\*, **Bergez-Hernández F.\***, Leal-León E., Romo-Martínez E., Picos-Cárdenas V., Luque-Ortega F., Romero-Quintana J., Alvarez-Arrazola M., García-Magallanes N. (2020) Expression of miR-148b-3p is correlated with overexpression of biomarkers in prostate cancer. *Genet Mol Biol*, 43(1), e20180330.

Como co-autor:

- Irigoyen-Arredondo M., Romero-Quintana J, Arámbula-Meraz E, **Bergez-Hernández F.**, Martínez-Camberos A., Álvarez-Arrazola M., García-Magallanes N. (2022). Differential expression of the AR gene is correlated with CAG polymorphic repeats in patients with prostate cancer. (Sometido en revista).
- Reyes-Bastidas M.\*, García-Magallanes N.\*, Leal-León E., **Bergez-Hernández F.**, Martínez-Camberos A., Romo-Martínez E., Fragoza-Sosa O., Osuna-Ramírez I., Luque-Ortega F., Irigoyen-Arredondo M., Beltrán-Ontiveros S., Arámbula-Meraz E. (2022). Overexpression of miRNAs -145-5p, -148b-3p, and -195-5p are associated with Highrisk human papillomaviruses infection in women. (Sometido en revista).

#### 14.2.2 Participación en congresos

- VII Simposio Nacional de Ciencias Farmacéuticas y Biomedicina y V Simposio Nacional de Microbiología Aplicada. Modalidad: Oral online. 1/10/2020.
- 37 Congreso Nacional de Oncología. Modalidad: Cartel. Médica, Yucatán, 6/11/2019.
- 2nd Biotechnonology World Symposium y 11° Encuentro Nacional de Biotecnología. Modalidad: Póster. San José del Cabo, Baja California Sur, 16/10/2018.



- Sexto Encuentro de Jóvenes Investigadores en el Estado de Sinaloa. Modalidad: Póster. Mazatlán, Sinaloa, 12/09/2018

#### 14.2.3 Cursos tomados

- McGraw Hill ¿Cómo publicar tu proyecto de Investigación? Modalidad online, 11/01/2022.
- Herramientas y Aplicaciones en línea. Universidad Autónoma de Occidente. Mazatlán, Sinaloa, 14/06/2021.
- Técnicas de Análisis Instrumental Aplicado a las Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de Occidente. Mazatlán, Sinaloa, 14/06/2021.
- 2do. Curso en línea de Inmunología Básica. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Modalidad online, 01/08/2020.
- Sistemas de Aprendizaje en Línea de Google Classroom y Videoconferencias. Universidad Autónoma de Occidente. Mazatlán, Sinaloa, 06/04/2020.
- Introducción a la Genética Forense. Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid. Modalidad online, 06/04/2020.
- 6to Talle de Bioinformática Mining Microbial and Viral Genomes and Metagenomes fo Biotechnological Applications using IMG. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada, Ensenada, Baja California, 30/09/2019.
- Competencias para el acceso y uso de la información Científica y Tecnológica. Universidad Autónoma de Sinaloa. Culiacán, Sinaloa, 08/01/2019.

## XV. SIGLAS Y ABREVIACIONES

ADN: Ácido desoxiribonucleico

Ago2: Proteína argonauta 2

ARN: Ácido ribonucleico

AUC: Área bajo la curva

BPD: grupo de pacientes con enfermedades benignas de la próstata

CaP: Cáncer de próstata

cap: caperuza

CAP: grupo de pacientes con CaP

Cq: ciclo de cuantificación

Del: Deleción

DGCR8: Proteína de la región crítica 8 del síndrome DiGeorge

dsARN: ARN bicatenario

Dup: Duplicación

EHW: Equilibrio Hardy-Weinberg

eI4F: Factor de iniciación de la traducción 4F

F.C.: Factor de conversión

F.D.: Factor de dilución

GTP: Guanosín trifosfato

hnRPs: Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas

HPB: Hiperplasia benigna de próstata

IMC: Índice de masa corporal

Ins: Inserción

ISUP: International Society of Urological Pathology

miRISC: Complejo de silenciamiento mediado por miRNA

miRNAs: microRNAs

MMP: Metaloproteinasa

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

NIP: Neoplasia intraepitelial prostática

PACT: Proteína cinasa de activación-R

PCA3: Gen del cáncer de próstata 3

PSA: Antígeno prostático específico

RT: Retrotranscripción

SNPs: Polimorfismos de nucleótido sencillo

SNV: Vvariaciones de nucleótido sencillo

ssARN: ARN monocatenario

TEM: Transición epitelio mesenquimal

TRBP: Proteína TAR de unión a ARN

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

VPN: Valor predictivo negativo

VPP: Valor predictivo positivo