

Determinación de microRNA en orina para la detección de cáncer de próstata en pacientes mexicanos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González

Samuel Ahumada-Tamayo, Dorian Saavedra-Briones, Mauricio Cantellano-Orozco, A Salido-Guadarrama, M Rodríguez-Dorantes, Alejandro Urdiales-Ortiz, Víctor Hernández-Castellanos, Claudio Merayo-Chalico, Gustavo Sánchez-Turati, Zael Santana-Ríos, Santiago Fulda-Graue, Rodrigo Pérez-Becerra, José A Martínez, Gerardo Fernández-Noyola, Erik Muñoz-Ibarra, Alberto Camacho-Castro, Francisco García-Salcido, Gustavo Morales-Montor, Carlos Pacheco-Gahbler



■ RESUMEN

Se han estudiado múltiples marcadores moleculares, en busca de la prueba diagnóstica que aumente la probabilidad de detección de CaP y reduzca el número de biopsias innecesarias. Los microRNA son elementos constitutivos de identificación molecular de HBP y CaP y representan una posible herramienta que contribuya al desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico oportuno y acertado de la enfermedad prostática.

Objetivo: Determinar la asociación de microRNA en orina para el diagnóstico de CaP en pacientes mexicanos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

Métodos: De mayo a julio de 2010 se incluyó a 30 pacientes sometidos a biopsia de próstata, a quienes se les tomó una muestra de orina posterior a masaje

■ ABSTRACT

Multiple molecular markers have been studied in the search for a diagnostic test that will increase the probability of prostate cancer detection and reduce the number of unnecessary biopsies. MicroRNAs are constitutive elements of molecular identification of benign prostatic hyperplasia and prostate cancer and represent a possible tool that could contribute to the development of new opportune and reliable diagnostic strategies for prostate disease.

Objective: To determine the association of microRNA in urine for prostate cancer diagnosis in Mexican patients at Hospital General "Dr. Manuel Gea González".

Methods: Thirty patients that underwent prostate biopsy from May-July 2010 were included in the study. A urine sample was taken from each one after prostate massage

División de Urología, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Tlalpan, México, Distrito Federal.

Correspondencia: Dr. Samuel Ahumada Tamayo. Calzada de Tlalpan 4800. Col. Sección XVI. Delegación Tlalpan. México Distrito Federal. C. P 14080. Teléfono: 55 3953 2506.

Correo electrónico: satmx@hotmail.com

prostático previo a la biopsia. En la muestra se determinó la concentración de microRNA. Se seleccionaron los especímenes que tenían una concentración por arriba de 50 ng/mL de microRNA (18/30 muestras); a estas se les realizó amplificación de microRNA y cuantificación de 373 microRNA con el método PCR en tiempo real.

Resultados: De los 18 pacientes con miRNA mayor de 50 ng/mL, nueve resultaron con biopsias positivas y nueve con biopsias negativas. De los 373 miRNA cuantificados, 50 miRNA mostraron expresión en las 18 réplicas (100%) que se realizaron; sólo 21 de los 50 miRNAs se repitieron en todas las muestras y 19 de éstos sobre-expresados (miR-196b, -574-3p, let-7b, -7c, -7d, 7e, -7g, miR-200b, -149, -20b, -17, -184, -20a, -106a, -671-3p, -148a, -429, -31, -100) y sólo dos sub-expresados (miR-150, -328).

Conclusiones: Se determinó un grupo de 21 miRNAs que mostraron expresión significativa en el grupo de muestras de CaP.

Palabras clave: Cáncer de próstata, antígeno prostático específico, hiperplasia prostática benigna, miRNA, México.

prior to biopsy, determining microRNA concentration from the sample. Samples with concentrations above 50 ng/mL of microRNA (18/30 samples) were selected; from these samples microRNA amplification and microRNA-373 quantification with real time polymerase chain reaction method were carried out.

Results: Of the eighteen patients with microRNA above 50 ng/mL, nine had positive biopsy and nine had negative biopsy. Of the microRNAs-373 quantified, fifty microRNAs showed expression in the eighteen replicas (100%) that were carried out; only twenty-one of the fifty microRNAs were repeated in all samples; nineteen of them were overexpressed (miR-196b, -574-3p, let-7b, -7c, -7d, 7e, -7g, miR-200b, -149, -20b, -17, -184, -20a, -106a, -671-3p, -148a, -429, -31, -100) and only two were underexpressed (miR-150, -328).

Conclusions: A group of 21 microRNAs was determined that showed statistically significant expression in the prostate cancer sample group.

Keywords: Prostate cancer, prostate specific antigen, benign prostatic hyperplasia, miRNA, Mexico.

■ INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata (CaP) ocupa el segundo lugar en frecuencia como neoplasia maligna más entre la población masculina; las cifras más recientes indican que 782 600 nuevos casos fueron diagnosticados durante 2007 y el número de muertes asociadas a CaP durante ese año se estimó en 254 000; lo que convierte al CaP en la sexta causa de muerte por cáncer en hombres a nivel mundial.¹ En la actualidad, las principales pruebas diagnósticas para el CaP son la exploración rectal y la evaluación del antígeno prostático específico (APE); sin embargo, aún prevalece la dificultad para diagnosticar el cáncer de próstata en etapas tempranas, debido a que en muchas alteraciones no relacionadas al cáncer de próstata, como la hiperplasia prostática benigna (HPB), presentan características que guardan gran semejanza con las de las lesiones del CaP.^{2,3} A la fecha, no existen estudios realizados en población mexicana que correlacionen la regulación de genes durante el avance de la enfermedad como una firma molecular que pudiera ser utilizada como marcador para el diagnóstico temprano de CaP. Con el desarrollo de la tecnología genómica, los esfuerzos se han concentrado en el estudio

a nivel molecular de factores que están implicados en la iniciación y progresión del cáncer en humanos. En la actualidad, las causas exactas que llevan al desarrollo de adenocarcinoma prostático no han sido elucidadas; se tiene conocimiento de muchos factores putativos de riesgo entre los que se encuentran los andrógenos, la dieta, el tabaquismo, el sedentarismo, factores sexuales y la obesidad. Aunque los cambios en el estilo de vida y prevención de la exposición a contaminantes químicos parecen ayudar a disminuir la incidencia de la enfermedad, su papel en la etiología del CaP no se ha establecido claramente. La patogénesis del cáncer involucra una interacción entre factores ambientales y genéticos; se piensa que los factores genéticos contribuyen en 42% al riesgo del desarrollo y progreso de la enfermedad.^{4,5} La identificación de marcadores moleculares asociados al CaP constituyen un aporte científico que ha mejorado la capacidad para detectar individuos en riesgo de padecer CaP en nuestros días. El marcador más utilizado para el diagnóstico de CaP es el antígeno prostático específico (APE); una glucoproteína que se produce en el epitelio de la próstata de manera exclusiva, presente en pequeñas cantidades en el suero de varones sanos y que se acumula con la edad. A pesar de su alta sensibilidad,

la prueba de niveles en suero de APE carece de especificidad ya que no permite establecer una diferencia confiable entre la HPB, el CaP de tipo agresivo y el no agresivo.^{6,7} El APE3 es un marcador que ha tenido un papel importante en el diagnóstico no invasivo de CaP en orina; es un miRNA específico de próstata, probablemente no codificante, cuya expresión se encuentra anormalmente elevada en neoplasias prostáticas, en comparación a lo observado en tejidos adyacentes no-neoplásicos.⁸⁻¹¹

Aunque no existe un marcador histológico o molecular que permita hacer una predicción temprana del CaP, se están estudiando los (miRNAs) que son secuencias cortas de RNA no codificantes de 18 a 22 nucleótidos que se expresan y desempeñan un papel en el control de la expresión génica;¹² éstos pueden sufrir amplificaciones, delecciones o reacomodos, vinculados con el cáncer.

El crecimiento celular durante el desarrollo animal depende de señales moleculares que coordinan cuidadosamente los procesos de proliferación y de muerte celular, y la velocidad a la cual éstos se llevan a cabo. Sin embargo, el cáncer se caracteriza por un crecimiento celular en el cual la identidad de las células se ha perdido, existe proliferación extensa y alteración del proceso de muerte celular.

El vínculo más directo entre la función de miRNAs y el cáncer en humanos fue quizás demostrado en el estudio de Calin y colaboradores, donde observó que el miR-15a y miR-16-1 se encuentran codificados en la región cromosómica 13q14, delección cromosómica que frecuentemente se encuentra en pacientes con leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (B-CLL). Lo cual significa que el miR-15a y miR-16-1 se encuentran ausentes o sub-expresados en tejidos de pacientes con B-CLL.¹⁰ Posteriormente se reportó que ambos miRNAs tenían como blanco de acción la región 3'UTR del transcripto del gen BCL2, el cual resulta ser un potente inhibidor de la apoptosis.¹² Lo anterior sugiere contundentemente una actividad supresora de tumores para estos dos miRNAs.

Más de la mitad de los miRNAs se encuentran localizados en regiones del genoma humano susceptibles de sufrir amplificaciones, delecciones o re-arreglos en tumores malignos, lo que refuerza las hipótesis acerca del importante papel de los miRNAs en la patogénesis del cáncer.¹³⁻¹⁵ Con base en esta información, podría decirse que la historia del desarrollo de un tumor está reflejada en su patrón de expresión de miRNAs particular.

La progresión del CaP es un proceso que implica múltiples alteraciones moleculares, muchas de las cuales se reflejan en cambios de la expresión genética de las células. Debido al papel regulatorio de los miRNAs en la expresión de diversos genes y a su especificidad

tisular, es evidente que la identificación de miRNAs relacionados al CaP podría aportar valiosa información sobre las alteraciones moleculares asociadas a la patogénesis del CaP. Recientemente, se han reportado diversos estudios de la expresión de miRNAs en muestras clínicas de CaP. En un trabajo sobre el perfil de expresión de 228 miRNAs en 56 muestras de CaP y siete de tejido prostático normal, se logró identificar la expresión diferencial significativa de 42 miRNAs; 39 (87%) se encontraban sobre-expresados y seis (13%) sub-expresados en las muestras de CaP.¹² Esto muestra que la expresión de los miRNAs en un tejido tumoral pueden proporcionar información valiosa que permita su clasificación y que puede ser aprovechada en el desarrollo de nuevas tecnologías de diagnóstico de tipos de cáncer que actualmente carecen de marcadores moleculares exactos, como en el caso del CaP.

■ OBJETIVO

Determinar la asociación de miRNAs en orina con el diagnóstico de CaP en pacientes mexicanos en el Hospital General Dr. Manuel Gea González.

■ MÉTODOS

Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo y transversal. Se incluyeron 30 pacientes sometidos a biopsia de próstata de mayo a julio de 2010 en el servicio de Urología del Hospital General Dr. Manuel Gea González. Todos los pacientes presentaron un APE sérico mayor a 4 ng/dL o tacto rectal con sospecha clínica de cáncer de próstata. Previo a la biopsia se les realizó masaje prostático y se les tomó 30 mL de orina posterior al mismo. Las muestras de orina se mezclaron con 5 mL de una solución amortiguadora (RNAlater® RNA Stabilization Reagent, AMBIION, Austin TX, USA) para estabilización del RNA y se mantuvieron en refrigeración a -70°C hasta que se procesó la muestra.

Extracción de RNA total y microRNAs de diferentes muestras de orina: Cada muestra se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos a 15°C y se decantó el sobrenadante para obtener una pastilla que contiene el paquete celular. La pastilla se lavó, agregando 10 ml de PBS (solución salina amortiguadora de fosfatos) a pH = 7.4; se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 15°C y se decantó el sobrenadante; determinando en dicha muestra la concentración de miRNA. Se seleccionaron las muestras que tenían una concentración por arriba de 50 ng/ml de miRNA (18/30 muestras); a estos se les realizó amplificación de miRNAs y cuantificación de 373 miRNAs con el método de PCR en tiempo real, con el equipo ABI 7900HT Real Time PCR System (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA) y el software Data

assist DataAssist™ (Applied Biosystems Llc, Foster City, CA USA). Dicho proceso se realizó bajo las siguientes condiciones de termociclado: 50°C por dos minutos y 95°C por 15 seg (activación), seguidos por 40 ciclos de 95°C por un minuto (desnaturalización) y 60°C por dos minutos (alineamiento y extensión).

El código Bioconductor del entorno de programación permite normalizar la fluorescencia detectada durante el proceso de amplificación, respecto a un control endógeno y reportar la cantidad de miRNAs en la muestra problema con respecto a un estándar.

Los recursos humanos por parte de la división de Uroología del Hospital Gea González y la obtención de los tubos de transporte y los insumos para la realización de la amplificación de MicroRNA se aportaron por el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con lo estipulado en el Reglamento de la ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección II, investigación con riesgo mínimo, con hoja de consentimiento informado.

Para determinar cambios estadísticamente significativos se aplicó la prueba *t* de Student.

■ RESULTADOS

Inicialmente se realizó el aislamiento de RNA a partir de las 30 muestras de orina de los pacientes con diagnóstico de CaP y 30 con el diagnóstico de HPB. La concentración de RNA recuperado resultó ser muy variable. Del total de muestras estudiadas, se seleccionaron sólo 18 con una concentración de miRNA superior a 50 ng/ μ l; nueve muestras del grupo de CaP (biopsias positivas) y nueve del grupo de HPB (biopsias negativas). La calidad del RNA aislado se evaluó por medición de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. La relación 260nm/280nm en las muestras seleccionadas fue inferior a 1.5 y superior a 0.7. Para la reacción de RT (transcriptasa reversa) la cantidad de RNA empleada se ajustó a 75 ng. Con el objetivo de incrementar el número de copias de cada miRNA y mejorar su detección durante la reacción de PCR en tiempo real, se efectuó por triplicado la reacción de pre-amplificación selectiva para miRNAs. La pre-amplificación es especialmente útil en nuestro caso, ya que en orina la concentración de ácidos nucléicos es menor que la que se tiene en tejidos.

La diferencia de expresión de miRNAs entre CaP y HPB se realizó por medio de una comparación entre los perfiles de expresión de ambas condiciones, considerando positivo para CaP un cambio dos veces mayor en el nivel de expresión de miRNA con respecto a las muestras de HPB, a un nivel de significancia estadístico de $p < 0.05$.

Determinamos un conjunto de 21 miRNAs que presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos en todas las muestras; identificando sobre-expresión de 19 miRNAs (miR-196b, -574-3p, let-7b, -7c, -7d, 7e,-7g, miR -200b, -149, -20b, -17, -184, -20a, -106a, -671-3p, -148a, -429, -31, -100) y sub-expresión en dos (miR-150, -328).³⁴

■ DISCUSIÓN

Reportes previos de diversos grupos han mostrado que es factible utilizar mRNA aislado de orina como marcadores de cáncer de próstata. La determinación del mRNA no codificante PCA3 ha mostrado una sensibilidad y una especificidad de 0.69% y 0.86%, respectivamente.⁷ El poder para discriminar entre CaP y otro tipo de neoplasias no malignas como la HPB se incrementa considerablemente con el uso combinado de varios marcadores.^{11,16-23} Las firmas de expresión de miRNAs tienen una utilidad potencial en el diagnóstico, pronóstico y predicción de la respuesta terapéutica en diversos tipos de enfermedades humanas, como en el cáncer, así como la diferenciación entre neoplasias benignas y las de tipo maligno.²⁴⁻²⁹ En otro estudio se demostró la presencia de miRNAs de origen placentario en plasma de la madre.³⁰ En adición a estos estudios, se ha demostrado que fluidos como la sangre la saliva e incluso la orina contienen miRNAs en cantidad detectable; y que dichas moléculas se encuentran en una forma relativamente estable y protegidas de la degradación.³¹⁻³³ Se han logrado avances en el desarrollo de métodos para el estudio de miRNAs presentes en tejidos de órganos y en células.

Las estimaciones actuales predicen que cerca de 30% de los genes humanos se encuentran regulados por algún miRNA⁶ y que cada miRNA tiene aproximadamente 200 transcriptos blanco, en vertebrados. La variabilidad en la cantidad de RNA recuperado puede ser explicado por la diferencia interindividual en la cantidad de células prostáticas que se descaman y vierten a la orina. El número de pacientes y de muestras utilizadas en nuestro estudio es muy pequeño para asegurar que los miRNA expresados encontrados tengan una asociación directa con cáncer de próstata; sin embargo, en estudios realizados en otras instituciones se han encontrado expresión de miRNA similar al nuestro.³⁴

La detección y cuantificación de miRNAs en orina es potencialmente útil como marcadores de CaP; el reto a continuación es identificar y validar ese conjunto de miRNAs marcadores con la finalidad de establecer, de manera oportuna, grupos de pronóstico que permitan orientar las decisiones terapéuticas en el tratamiento de los pacientes con enfermedad prostática y realizar una predicción adecuada de su evolución.

■ CONCLUSIONES

Se determinó un grupo de 21 miRNAs que mostraron diferencia de expresión significativa en el grupo de muestras de CaP.

La detección y cuantificación de miRNAs en orina es potencialmente útil como marcadores de CaP.

BIBLIOGRAFÍA

1. García M, Jemal A, Ward EM, et al. Global Cancer Facts & Figures 2007. Atlanta, GA: American Cancer Society; 2007.
2. INEGI. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer; 2009.
3. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology* 2003;62(5Suppl):55-62.
4. Schulz WA, Burchardt M, Cronauer MV. Molecular biology of prostate cancer. *Mol Hum Reprod* 2003;9:437-48.
5. Rubin MA, De Marzo AM. Molecular genetics of human prostate cancer. *Mod Pathol* 2004;17:380-8.
6. Pienta KJ, Bradley D. Mechanisms underlying the development of androgen-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2006;12:1665-71.
7. Reynolds MA, Kastury K, Groskopf J. Molecular markers for prostate cancer. *Cancer Lett* 2007;249:5-13.
8. You J, Cozzi P, Walsh B. Innovative biomarkers for prostate cancer early diagnosis and progression. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010;73:10-22.
9. Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999;59:5975-9.
10. Rubin MA, Zhou M, Dhanasekaran SM. alpha-Methylacyl coenzyme A racemase as a tissue biomarker for prostate cancer. *JAMA* 2002;287:1662-1670.
11. Tomlins SA, Laxman B, Varambally S. Role of the TMPRSS2-ERG gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 2008;10:177-88.
12. Bushati N, Cohen SM. microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Bio* 2007;23:175-205.
13. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993;75:843-54.
14. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001;294:853-8.
15. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004;10:1957-66.
16. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:376-85.
17. Lund E, Güttinger S, Calado A. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004;303:95-8.
18. Ro S, Park C, Young D. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res* 2007;35:5944-53.
19. Brennecke J, Stark A, Russell RB. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005;3:e85. *PLoS Biol* 2005;3:e85.
20. Rajewsky N, Socci ND. Computational identification of microRNA targets. *Dev Biol* 2004;267:529-35.
21. Liu J, Carmell MA, Rivas FV. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 2004;305:1437-41.
22. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008;9:102-14.
23. Liu J, Valencia-Sánchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 2005;7:719-23.
24. Parker R, Sheth U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. *Mol Cell* 2007;25:635-46.
25. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007;318:1931-4.
26. Wrightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 1993;75:855-62.
27. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435:834-8.
28. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolina DA. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008;27:2128-36.
29. Zhu S, Wu H, Wu F, et al. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res* 2008;18:350-9.
30. Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 2005;65:9628-32.
31. Tong AW, Fulgham P, Jay C. MicroRNA profile analysis of human prostate cancers. *Cancer Gene Ther* 2009;16:206-16.
32. Chim SS, Shing TK, Hung EC. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 2008;54:482-90.
33. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:10513-8.
34. Pang Y, Young CY, Yuan H, et al. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010;42:363-9.