

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE
PCA3/PSA PARA LA DETECCIÓN DE CÁNCER DE
PRÓSTATA**

Por

Rubén Aarón Benítez Martínez

**Como requisito parcial para obtener el grado de MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON ORIENTACIÓN EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

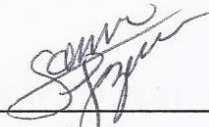
Junio 2020

DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE PCA3/PSA PARA LA DETECCIÓN DE CÁNCER DE PRÓSTATA

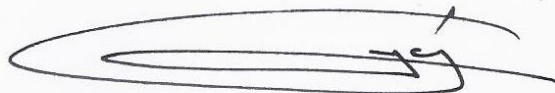
Aprobación de la tesis:



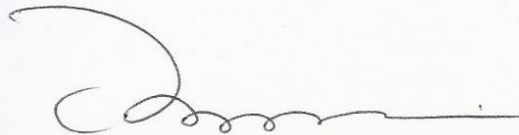
Dra. C. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Directora de Tesis



Dra. C. Sonia Amelia Lozano Sepúlveda
Co-Directora de Tesis



Dr. med. Lauro Salvador Gómez Guerra
Miembro de la Comisión de Tesis



Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

Agradecimientos

Agradezco al comité de tesis, a los colaboradores y al departamento, cada uno de sus miembros fue indispensable para el desarrollo de este proyecto.

Dedicatoria

Dedicado a cualquier sujeto que se sienta abatido por sus errores. No todo tiene solución, pero la sociedad no ofrece soluciones deliberadamente, ofrece consensos y castiga a los disidentes.

"Si tuviese las ropas bordadas del cielo (...). Las extendería bajo tus pies: pero yo, al ser pobre, solo tengo mis sueños. He tendido mis sueños ante tus pies; Camina con cuidado, porque estás pisando mis sueños".

- William Butler Yeats, Aedh wishes for the cloths of heaven.

Índice

Capítulo I - Introducción	1
Capítulo II - Antecedentes	4
2.1 El cáncer de Próstata es un problema de salud del varón a nivel nacional.....	4
2.2 La prueba del antígeno prostático específico.....	5
2.3 Diagnóstico confirmatorio de cáncer de próstata.....	7
2.3.1 Biopsia transrectal.....	9
2.3.2 Puntaje Gleason.....	10
2.4 La calculadora de riesgo para la prevención del cáncer del próstata.....	13
2.5 Búsqueda de biomarcadores más efectivos.....	15
2.5.1 PCA3.....	19
Capítulo III - Justificación	23
3.1 Objetivos	24
Capítulo IV - Material y métodos	25
4.1 Material.....	25
4.2 Métodos.....	27
4.2.1 Objetivo 1. Elaboración de curva de calibración para qPCR.....	27
4.2.2. Objetivo 2. Analizar la expresión de PCA3 y PSA en líneas celulares de CaP.....	30
4.2.2.1 Cultivo celular de LNCaP y PC3.....	31
4.2.2.2 Estandarización del método cuantitativo en cultivo celular.....	33
4.2.2.3 Extracción de ARN de las líneas celulares con TRIzol™.....	34
4.2.2.3.1 Lisis de la muestra y separación de fases.....	34
4.2.2.3.2 Precipitación, lavado y resuspensión del ARN.....	36
4.2.3 Objetivo 3. Analizar la expresión de PCA3 y PSA en muestras de tejido de pacientes con CaP y con HPB.....	37
4.2.3.1 Cuantificación del número de copias por qPCR: Amplificación con TaqMan™ Universal PCR Master Mix.....	38
4.2.4 Análisis de datos.....	40
Capítulo V - Resultados	41
5.1 Objetivo 1: Desarrollo de curvas de calibración para cuantificación del ARN _{inc} PCA3 y el ARN _m de PSA por qPCR.....	41
5.2 Objetivo 2: Análisis de la expresión de PCA3 y PSA en líneas celulares de CaP.....	43

5.3 Objetivo 3: Análisis de la expresión de PCA3 y PSA en muestras de tejido de pacientes con CaP y con HPB.....	54
Capítulo VI - Discusión	62
6.1 Conclusiones	68
Capítulo VII - Referencias.....	70
Capítulo VIII - Anexos.....	84

Lista de figuras y tablas

#

Fig. 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de próstata (CaP). 2

Fig. 2. Algoritmo para tamizaje y diagnóstico de cáncer de próstata. 3

Fig. 3. Proporción de casos de CaP por cada 100 varones en los Estados Unidos de América. 4

Fig. 4. Fluctuaciones en concentración de PSA en sangre a lo largo de la transcurso del CaP. 6

Fig. 5. Tacto digital rectal. 9

Fig. 6. Biopsia transrectal. 10

Fig. 7. Resultado de la PCPT-RT. 14

Fig. 8. Breve esquemático del flujo de trabajo utilizado en el descubrimiento del panel de las 4 calicreínas. 17

Fig. 9. Flujo general de trabajo para identificación de biomarcadores de CaP en orina. 19

Fig. 10. Expresión de PCA3 en diferentes tejidos. 20

Fig. 11. Estrategia general de la metodología. 27

Fig. 12. Esquema de elaboración de curva estándar. 30

Fig. 13. Micrografías de líneas celulares utilizadas y sus respectivos medios de cultivo. 31

Fig. 14. Flujo de trabajo para la estandarización del método cuantitativo en cultivo celular. 34

Fig. 15. Esquema de extracción de ARN a partir de cultivo celular. 35

Fig. 16. Esquema breve de procesamiento de muestras de tejido. 38

Fig. 17. Gráficas de amplificación para curvas de calibración. 42

Fig. 18. Curvas de calibración para cuantificación de PCA3 y PSA. 43

Fig. 19. Análisis de integridad de ARN extraído. 44

Fig. 20. Gráficas de absorbancia en diferentes longitudes de onda obtenidas de Nanodrop 2000. 46

Fig. 21. Gráfica logarítmica de amplificación de muestras obtenidas de orina adicionada con LNCaP 49

Fig. 22. Gráficas lineales de amplificación de PCA3 y PSA en orina. 49

Fig. 23. Gráfica logarítmica de amplificación de muestras obtenidas de diluciones de células en medio de cultivo RPMI 1640. 50

Fig. 24. Gráficas lineales de amplificación de PCA3 y PSA en diluciones de células con medio de cultivo RPMI 1640. 51

Fig. 25. Gráficas de regresión lineal de PCA3 y PSA. 52

Fig. 26. Gráficas de barras de número de copias. 53

Fig. 27. Gráficas de absorbancia en diferentes longitudes de onda de extracciones de tejidos. 54

Fig. 28. Gráficas de amplificación logarítmicas de los biomarcadores analizados en tejido. 58

Fig. 29. Gráficas lineales de amplificación de PCA3 y PSA en tejido prostático incluido en parafina. 59

Fig. 30. Gráficas de barras de número de copias de PCA3 y PSA en tejido prostático. 60

Fig. 31. Flujo de trabajo de retrotranscripción. 88

Tabla 1. Concentración de ARN obtenido del cultivo celular determinada con Nanodrop 2000. 47

Tabla 2. Concentración de ARN obtenido de tejidos incluidos en parafina 55

Abreviaturas

ADN Ácido desoxirribonucleico.

ADNc ADN complementario

ag attogramos

ARN Ácido ribonucleico.

ARNlnc ARN largo no codificante

ARNm ARN mensajero

CaP Cáncer de próstata

cc centímetros cúbicos

°C Grados centígrados.

CO₂ Dióxido de carbono

Ct Ciclo de amplificación

dNTP Desoxirribonucleótidos trifosfatados

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilendiaminotetraacético

FDA Agencia de Medicamentos y Alimentación

fg femtogramos

GS Puntuación Gleason

Kb Kilobases

m Pendiente

μM micromolar

μg microgramos

MgCl₂ Cloruro de magnesio

μ L microlitros

mL mililitros

mM milimolar

ng nanogramos

OMS Organización Mundial de la Salud

PCR Reacción en cadena de la polimerasa

qPCR PCR tiempo real

rpm Revoluciones por minuto

RT Retrotranscripción

SFB Suero fetal bovino

TAE Tris-Acetato-EDTA

TDR Tacto digital-rectal

zg zeptogramos

Resumen

Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina
Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular
Presenta: Rubén Aarón Benítez Martínez

Determinación de los niveles de expresión de PCA3/PSA para la detección de cáncer de próstata

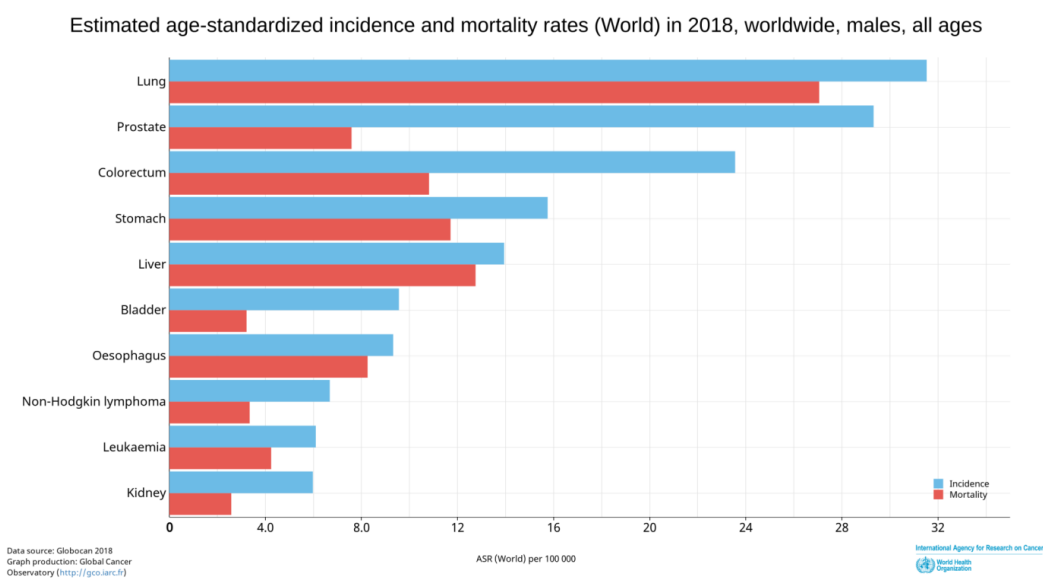
Introducción: El cáncer de próstata (CaP) es un grave problema para la salud del varón a nivel nacional y en el resto del mundo. El diagnóstico y tratamiento oportuno son fundamentales para la supervivencia de los pacientes afectados por esta enfermedad. Sin embargo, actualmente el tamizaje presenta algunas limitaciones que podrían causar la detección de falsos positivos y al mismo tiempo, ocasionar efectos no deseados derivados del tratamiento innecesario y el diagnóstico confirmatorio altamente invasivo (biopsia transrectal). Para solucionar este problema, se han propuesto biomarcadores alternativos al antígeno prostático específico (PSA, por sus siglas en inglés), el cual funge como tamizaje primario para CaP. Además, la necesidad de desarrollar métodos diagnósticos cada vez menos invasivos ha obligado a la comunidad científica a centrar su atención en el análisis de fluidos como orina y saliva. El ARNinc PCA3 es un biomarcador que ha sido reportado en orina de pacientes y cuya sobreexpresión es única del CaP, es por eso que su descubrimiento marca la pauta para la generación de mejores métodos diagnósticos.

Objetivo: Debido a lo anterior el objetivo de esta tesis es determinar los niveles del ARNinc PCA3 y del transcrito de PSA en biopsias tumorales evaluar su utilidad como biomarcadores en el diagnóstico de cáncer de próstata. **Métodos:** Para lograrlo, se estandarizó el método cuantitativo del ARNinc PCA3 y el ARNm de PSA en cultivo celular y tejidos mediante RT-qPCR. A cada muestra de línea celular LNCaP o biopsia se sometió a un proceso de extracción de ARN total, para posteriormente retrotranscribir y cuantificar los transcritos. **Resultados:** Se demostró la expresión de PCA3 en la línea celular LNCaP y su ausencia en la línea PC3. Se detectaron hasta 480 copias PCA3 y 53,000 copias de PSA en 350,000 células de LNCaP. Además, PCA3 se encontró sobreexpresado en tejido de CaP obteniendo hasta 2,523 copias en 500 ng de ADNc, mientras que su expresión estuvo por debajo del rango de la curva de calibración en las hiperplasias prostáticas benignas. **Conclusión:** El método estandarizado es capaz de cuantificar PCA3 y PSA en muestras de cultivo celular y tejido incluido en parafina. PCA3 se encuentra sobreexpresado en tejido tumoral de próstata, pero no en hiperplasia prostática benigna (HPB)

Dra. Celia Nohemí Sánchez Domínguez
Directora de tesis

Capítulo I - Introducción

A nivel mundial, el cáncer de próstata (CaP) ocupa la segunda posición entre las neoplasias del varón (GLOBOCAN, 2018; Tao et al., 2015) y en México ocupa el primer lugar tanto en incidencia como mortalidad (**Figura 1**). Hasta hace un par de años, existían pocas campañas nacionales para su prevención y diagnóstico oportuno; ahora cada vez son más frecuentes en esta época, en donde se invita a los hombres en grupo de riesgo a evaluar el nivel de PSA y acudir con el urólogo.



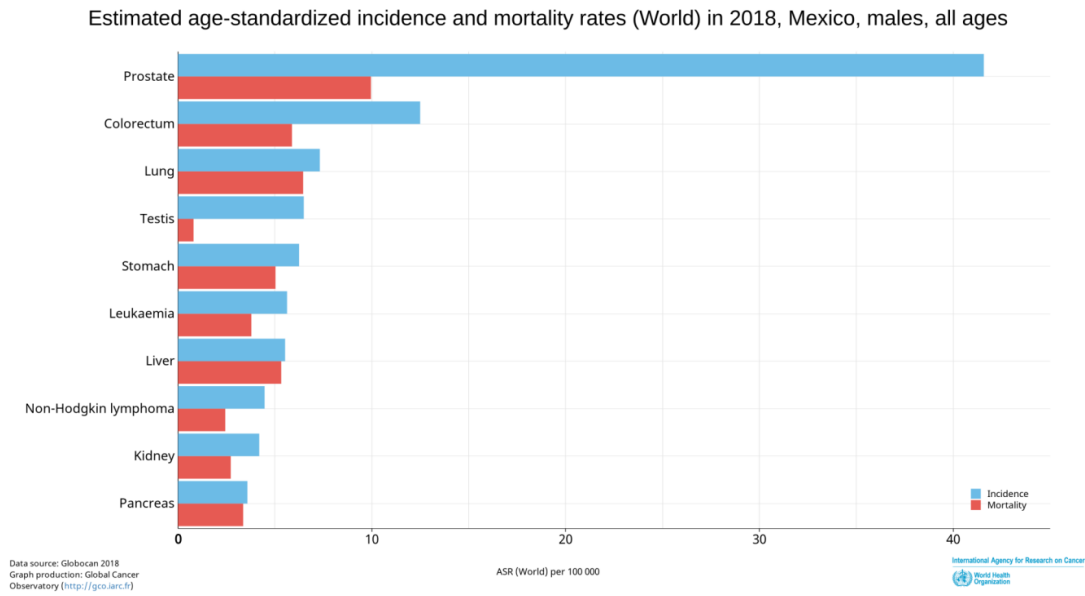


Fig. 1. Incidencia y mortalidad de cáncer de próstata (CaP). A nivel nacional, el CaP afecta a más varones que el cáncer colorrectal, el cáncer de pulmón, de testículo y estómago juntos.

El PSA en suero es el analito más utilizado para el tamizaje del CaP (Burgio et al., 2015). Si éste presenta valor mayor a 4 ng/ml se realiza un tacto dígito rectal (TDR). Si la próstata (después de la exploración física invasiva) posee induraciones y un volumen mayor al habitual, se toma una biopsia transrectal del paciente (**Figura 2**). Sin embargo, la utilización de PSA como biomarcador posee limitaciones considerables, debido a que no es específico de CaP, sino que puede ser sintetizado por células prostáticas bajo estrés (Pezaro et al., 2014).

Aunado a esto, el análisis asociado a este biomarcador posee el riesgo de detectar falsos positivos, lo que lleva a un diagnóstico y tratamiento exhaustivo de los pacientes (Alberts et al., 2015); si éste da indicios anormales se toman biopsias de la próstata (alrededor de 12-14) vía transrectal. Esto significa que un

gran número de varones se someten a estudios y procedimientos sin verdadera relevancia clínica (Fujita et al, 2009). Además, el diagnóstico oportuno falla porque

- 1) Los niveles de PSA pueden estar elevados en otras situaciones que no son CaP ó estadios avanzados de CaP pueden presentar niveles de PSA prácticamente normales,
- 2) la idiosincrasia de nuestra población impide el proceder al TDR.

Las pruebas que se fundamentan en los niveles de PSA carecen de robustez, y podrían llevar a los pacientes a innecesarios escenarios inconvenientes. Tomando en cuenta que la orina es un fluido mucho más fácil de recolectar de los pacientes, y que acarrea una gran cantidad de biomarcadores (Fujita & Nonomura, 2018), es imperante identificar dichos biomarcadores y estandarizar métodos que permitan el diagnóstico y seguimiento de pacientes con Cap.

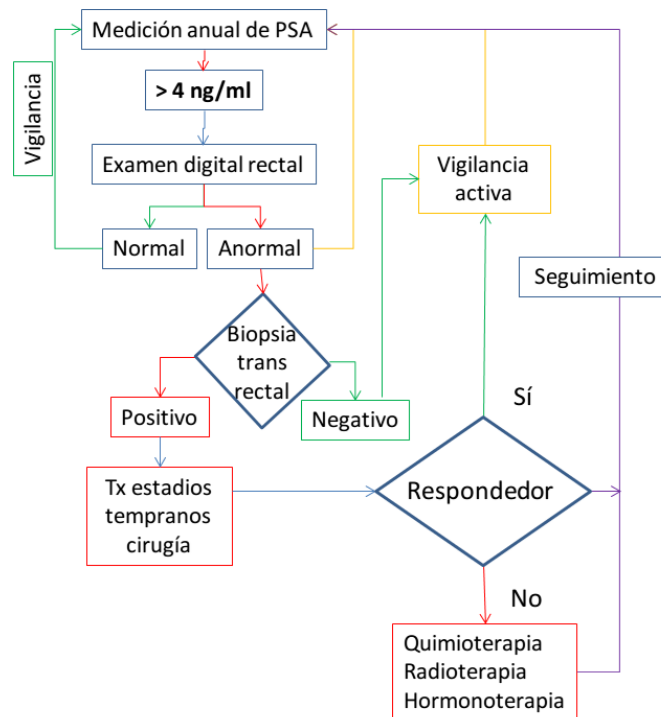


Fig. 2. Algoritmo para tamizaje y diagnóstico de cáncer de próstata.

Capítulo II - Antecedentes

2.1 El cáncer de Próstata es un problema de salud del varón a nivel nacional

En la actualidad, el segundo tipo de cáncer más común en varones, es el cáncer de próstata, solamente es superado por el cáncer de pulmón a nivel mundial. Y a nivel nacional esta situación se agrava, debido a que el CaP causa más muertes que cualquier otro tipo de cáncer en los hombres mexicanos (GLOBOCAN, 2018) (**Figura 3**). Normalmente, los pacientes de esta enfermedad responden satisfactoriamente al tratamiento si el CaP es diagnosticado a tiempo; el rango de edad promedio de la afección se encuentra entre los 65 y 70 años (American Cancer Society, 2020; U.S. Cancer Statistics Working Group, 2016).

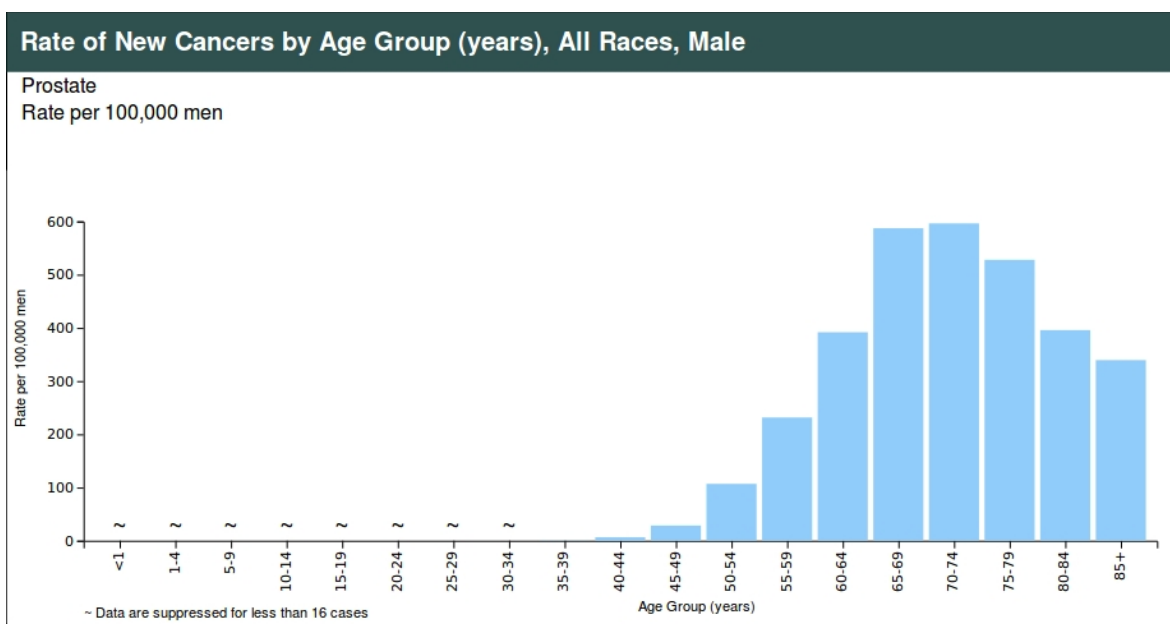


Fig. 3. Proporción de casos de CaP por cada 100 varones en los Estados Unidos de América. La mayoría de los casos se encuentran en sujetos con más de 60 años (siendo la media de 66 años) y aunque los casos en sujetos menores

de 50 años son menos de 100 por cada 100,000 varones al año, se recomienda someterse al tamizaje de CaP a partir de los 40 años (Cancer Statistics Working Group, 2016).

La avanzada edad de los pacientes favorece que en algunos casos, éstos mueran por afecciones no relacionadas con el CaP (Albertsen, et al., 2011). Sin embargo, se ha demostrado que el sobrediagnóstico también ha resultado ser perjudicial para la supervivencia de los pacientes (Klotz, 2013). Este fenómeno coincide con el surgimiento de nuevos métodos diagnósticos y biomarcadores para el CaP, siendo la prueba de PSA una base sólida para el tamizaje de la enfermedad.

Según datos del Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER, por sus siglas en inglés), la tasa de supervivencia relativa a 5 años (TSR) de los pacientes depende directamente de la detección temprana del CaP. Cuando el CaP es diagnosticado en un estadio temprano, localizado solamente en la próstata la TSR a 5 años es de 100%. Si el CaP se encuentra en la próstata y tejidos circundantes cuando es diagnosticado la TSR a 5 años de los pacientes sigue siendo de 100%. Sin embargo, cuando el CaP es diagnosticado y encontrado en tejidos distantes a la próstata la TSR a 5 años disminuye a 31%.

2.2 La prueba del antígeno prostático específico

El antígeno prostático específico representa a una proteína que se encarga disolver los grumos en el líquido seminal, y a finales del siglo pasado se desarrolló

una prueba para determinar su concentración en sangre (Chan & Sokoll, 2000). Fue hasta 1986 cuando la FDA (U. S. Food and Drug Administration) aprobó su uso en el monitoreo de pacientes previamente diagnosticados con CaP. En ese entonces todavía no se contaba con estándares internacionales para la prueba, y el resultado de cada análisis dependía de cada laboratorio en donde se realizara (Chan & Sokoll, 2000). Tuvieron que pasar casi 10 años (1994), para que la prueba de PSA se fuese reconocida por la FDA como un recurso valioso en el diagnóstico de CaP (National Cancer Institute, 2017). El PSA es secretado por células epiteliales de la próstata, y a pesar de que un incremento en su concentración sérica puede deberse a varios factores, se sospecha de CaP cuando sus valores son superiores a 4 ng/ml (Eastham, 2017). Desafortunadamente, esto no distingue a los pacientes con un CaP clínicamente significativo de los sujetos con tumores sin relevancia clínica (Fujita & Nonomura, 2018) y puede derivar en el sobretratamiento del paciente (**Figura 4**).

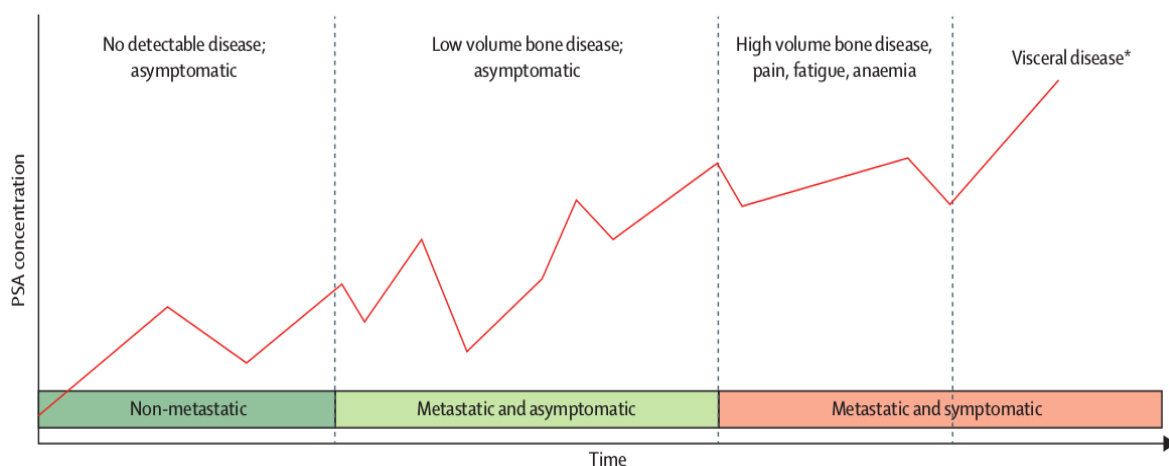


Fig. 4. Fluctuaciones en concentración de PSA en sangre a lo largo de la transcurso del CaP. Dichas fluctuaciones podrían formar un escenario en donde

el CaP pase desapercibido para los urólogos, o en donde el paciente sufra los efectos secundarios del sobretreatmento (Lorente, et al., 2015).

Desde su adopción como prueba de tamizaje, la determinación de la concentración del PSA ha disminuido ligeramente la mortalidad por cáncer de próstata (hasta 107 muertes por cada 100,000 casos), sin embargo el costo del sobrediagnóstico no ha sido calculado con exactitud (Howrey, et al., 2013). Se estima que por cada 1000 varones de entre 55 a 69 años, que se sometan a pruebas de tamizaje de CaP anualmente durante 15 años, hasta 120 sujetos resultarían ser falsos positivos (aún después de una biopsia transrectal y sus consecuencias), 100 serían diagnosticados con la enfermedad y sólo se evitaría una muerte por CaP (USPSTF, 2018). La detección de CaP basada en la prueba de PSA podría derivar en la localización de tumores que podrían jamás causar síntomas a los pacientes, sin embargo el tratamiento de ese tumor causaría todos los efectos indeseados del procedimiento como disfunción eréctil e incluso incontinencia urinaria y fecal (Fenton, et al., 2018).

La prueba de PSA no diagnostica CaP por sí sola, debe ir acompañada de otros exámenes para evitar falsos positivos y negativos, además de reducir el riesgo de tomar una biopsia innecesaria.

2.3 Diagnóstico confirmatorio de cáncer de próstata

El diagnóstico presuntivo de CaP debe siempre ser sucedido por un TDR y confirmado con el análisis de una biopsia transrectal. Esto evitaría iniciar un tratamiento para un tumor que no pone en riesgo la vida del paciente (Descotes, 2019).

El TDR es un procedimiento sencillo, rápido y normalmente no posee efectos adversos en la salud del paciente (**Figura 5**). Hay tres posibles resultados del TDR que pueden ser explicados de forma breve:

- Tacto normal: El urólogo debe evaluar si el tamaño de la próstata en el paciente es acorde a la media de su grupo de edad.
- Próstata agrandada: La próstata crece conforme el organismo envejece y una próstata agrandada es normal en hombres mayores de 50 años (Jones et al., 2018).
- Rigidez en la próstata: Una próstata más rígida de normal o con una textura áspera es considerada una anomalía y podría indicar la presencia de un tumor maligno (Hamilton et al., 2006).

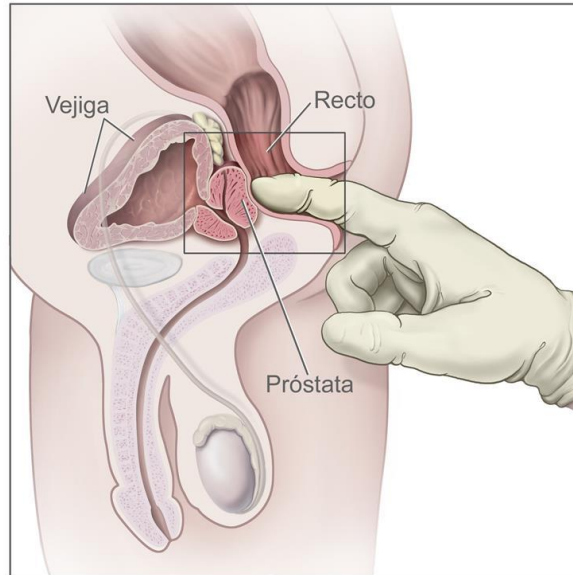


Fig. 5. Tacto digital rectal. El TDR es una prueba impactante para los pacientes. Además, no es un examen infalible, el tumor podría no estar al alcance del urólogo y eso afectaría la sensibilidad del análisis (Prostate cancer UK, 2020).

El TDR también puede ser una vía para detectar hiperplasia prostática benigna (HPB). El HPB es un fenómeno común y se estima que alrededor de 1 de cada 3 varones mayores a 50 años podrían tener algún síntoma relacionado al crecimiento de la próstata como obstrucción urinaria (Prostate Cancer UK, 2020)

2.3.1 Biopsia transrectal

Una vez que el urólogo ha encontrado anomalías en el TDR de un paciente, revisa su historial para evaluar si es candidato a una biopsia transrectal (**Figura 6**). La biopsia transrectal es un procedimiento que puede complicar la salud de los pacientes. Hasta el 6.9% de sujetos sometidos a una biopsia transrectal podrían sufrir infecciones bacterianas, hematuria, obstrucción urinaria, disfunción eréctil y

en casos más graves septicemia (Pelayo-Nieto et al., 2015). Existe también la posibilidad de que el sujeto no tenga un tumor que ponga en riesgo su vida, sin embargo los efectos de la biopsia afectarían el bienestar del paciente.

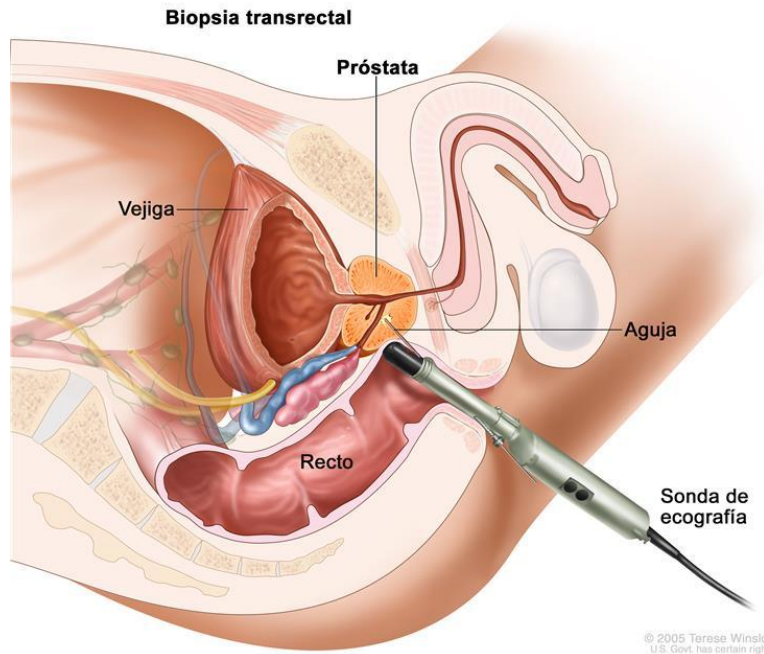


Fig. 6. Biopsia transrectal. Es la forma más eficaz de detectar CaP, sin embargo en algunos casos viene acompañada de efectos adversos para el paciente.

2.3.2 Puntaje Gleason

El tejido extraído a través de la biopsia transrectal es analizado por el patólogo, y clasificado por su puntuación Gleason (GS). Normalmente se realizan entre 8 y 16 cortes de tejido de próstata y cada uno tiene posibilidad de presentar tejido transformado o tejido sano. La similitud entre el tejido en la biopsia y tejido canceroso determina el puntaje que se asigna al corte.

La puntuación Gleason clásica resulta de la adición de los grados histológicos con mayor prevalencia, esto resulta en una escala de 2 a 10. El puntaje es reportado con sus factores expuestos (GS 3+4=7 es distinto a GS 4+3=7), debido a que es común proyectar diferentes pronósticos de acuerdo al componente con menor grado de transformación (Chan, et al., 2000). Los tumores que presentan una puntuación Gleason menor a 7 (resultado de 3+4) se consideran de poco riesgo para la vida del paciente, mientras que los puntajes mayores o iguales a 7, se consideran clínicamente significativos. El pronóstico empeora conforme la puntuación sube, aunque tratar un tumor de Gleason 6 podría causar más daño que la misma neoplasia (Howrey, et al., 2013). El sistema de clasificación Gleason también presenta sus limitaciones, debido a esto se desarrollaron los grupos de grado Gleason para evitar imprecisiones:

- Grado 1: GS ≤ 6 .
- Grado 2: GS 3+4 = 7
- Grado 3: GS 4+3 = 7
- Grado 4: GS 8
- Grado 5: GS ≥ 9

El grupo de grado 1 incluye a casos con tejido bien diferenciado y eso implica normalmente un buen pronóstico en la salud del paciente. En contraste, el grupo de grado 5 incluye casos con tejido vagamente diferenciado, estos tumores ponen en riesgo la vida del paciente y están asociados a un mal pronóstico (Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology, 2017; National

Cancer Institute, 2020). Los grupos del 2 al 4, representan casos intermedios entre un riesgo moderado y una enfermedad grave, aunque el tumor se considera clínicamente significativo a partir del grado 2 (O'Malley P, et al., 2017).

De una forma más completa, la agrupación de los estadios del cáncer integra diversos conceptos que resultan útiles para el pronóstico y el monitoreo del paciente. El sistema de estadificación toma en cuenta el grado del tumor, su tamaño, e incluso su localización en el cuerpo (AJCC, 2018; National Cancer Institute, 2015). Existen 4 estadios principales en los que se clasifica al CaP:

- Estadio I: El tumor es pequeño, no palpable, localizado sólo en tejido de próstata. La concentración de PSA es menor a 10 ng/ml y pertenece al grupo 1 de grado Gleason.

- Estadio II: Tumor pequeño todavía localizado en la próstata, en este estadio puede llegar a ser detectado en TDR. La concentración de PSA es de 10 a 20 ng/ml. Sin embargo, la probabilidad de que el cáncer prolifere es más alta.

- Estadio III: El tumor pertenece a un grupo de grado alto. Se considera un cáncer avanzado con altas probabilidades de que haya migrado a tejidos adyacentes al epitelio de la próstata. Concentración de PSA de más de 20 ng/ml.

Estadio IV: En este estadio las células del cáncer han migrado a los ganglios linfáticos e incluso podrían establecerse en otros órganos y tejidos distantes.

Los estándares de referencia de estadificación del cáncer se actualizan regularmente, y cada vez son más precisos para ayudar a los médicos a tratar y monitorear al paciente (AJCC, 2018). La estadificación es de gran ayuda cuando el paciente ya ha sido diagnosticado con cáncer y forma parte de los estándares internacionales que tratan de compensar las imprecisiones de los métodos diagnósticos y sistemas de clasificación. Sin embargo, calcular el riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer durante algún momento de la vida aún es un objetivo común dentro de la comunidad científica.

2. 4 La calculadora de riesgo para la prevención del cáncer de próstata

El cálculo del riesgo de desarrollar CaP ha sido objeto de grandes esfuerzos por parte urólogos, patólogos, oncólogos, biólogos moleculares y hasta expertos en estadística. Se han desarrollado una gran cantidad de modelos con toda clase de datos del historial clínico y hábitos cotidianos del paciente. Sin embargo, probablemente uno de los logros más notables en el área, ha sido el desarrollo de la calculadora de riesgo para la prevención de cáncer de próstata (PCPT-RC) (**Figura 7**).

La PCPT-RC fue creada con la intención de influenciar la decisión de someter al paciente a una extracción de biopsia transrectal. Indudablemente, la biopsia transrectal es el recurso más valioso para diagnosticar el CaP, a pesar de las consecuencias que podría desencadenar en la vida del paciente. La idea

principal era evitar obtener una biopsia que no era necesaria, así el paciente podía eludir los efectos indeseables del procedimiento, y se le proporcionaba un tratamiento y monitoreo adecuados a su pronóstico (Ankerst, et al., 2014). La primer PCPT-RC se volvió pública a mediados de la década del 2000 como una herramienta para el personal médico.

El modelo que dio a origen a la calculadora surgió de un protocolo del departamento de urología del centro de investigación en ciencias de la salud de la universidad de Texas (UTHSC). Reclutaron a 5,519 varones que no tenían cáncer de próstata y los monitorearon (concentración sérica de PSA, historial familiar de CaP, resultados de TDR, biopsias transrectales, entre otras variables clínicas) durante 7 años. Realizaron un análisis de regresión logística con los datos obtenidos y desarrollaron el modelo que dio origen a la calculadora (Thompson, et al., 2006).

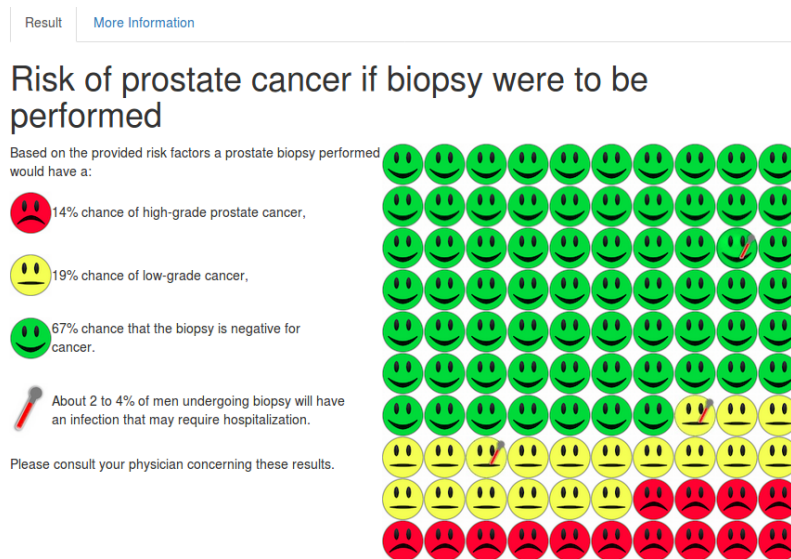


Fig. 7. Resultado de la PCPT-RT. Actualmente, la calculadora de riesgo es fácil de utilizar y tiene una interfaz amigable para el uso de personal médico, y

pacientes con sospecha de CaP (Thompson, et al., 2014). Disponible en <https://riskcalc.org/PCPTRC/>.

En 2012, sólo 6 años después de la consumación del proyecto original, la PCPT-RC fue actualizada por el mismo equipo para añadir nuevos biomarcadores descubiertos por otros grupos de investigación, y hacer de la calculadora más precisa (Ankersrst, et al., 2014). A partir de ese entonces se han propuestos diversos modelos, que incluyen biomarcadores candidatos y son cada vez más complejos en su forma de manejar las variables. Esto los vuelve más adecuados a la práctica clínica y ha impulsado la búsqueda de biomarcadores que puedan complementar su utilidad clínica en combinación con los parámetros tradicionales.

2.5 Búsqueda de biomarcadores más efectivos

La evaluación de biomarcadores relacionados con CaP en fluidos corporales parece ser una buena alternativa no invasiva para tamizaje. Muchos estudios han descrito la orina como un fluido corporal útil para la detección no invasiva de biomarcadores en casos de neoplasias malignas de origen urológico como el CaP (Martignano et al., 2017; Tosoian et al., 2016), ya que permitirían el diagnóstico temprano.

La presencia de células de cáncer en secreciones prostáticas fue vista como un método diagnóstico viable para cáncer de próstata, por su fundamento simple y requerimientos tecnológicos básicos (Albers et al., 1949). Sin embargo, la

falta de sensibilidad y especificidad hizo que este método fuese reemplazado rápidamente por otras pruebas más novedosas (Fujita et al., 2009; Garret & Jassie, 1976). También se ha intentado utilizar a las proteínas como biomarcadores para cáncer de próstata en orina (Tanase et al., 2017), y el ADN ha despertado un interés similar, sin embargo los resultados no han sido satisfactorios en algunos casos (Salvi, et al., 2015).

Algunos biomarcadores han mostrado resultados prometedores en ensayos clínicos (sensibilidad mayor a 80%) y pueden utilizarse en conjunto con el diagnóstico molecular, como es el caso del PHI (Prostate Health Index). El PHI resulta de una fórmula que combina el PSA libre (PSA que no se encuentra unido a proteínas), PSA total y p2PSA (isoforma más estable de precursor de PSA) (Loeb & Catalona, 2014). Todos sus datos de entrada provienen de un análisis de sangre y sus resultados pueden considerarse en un modelo más complejo que integre más de un biomarcador o serie de parámetros clínicos (Scattoni, et al., 2013).

Tomando como base esta idea, se han propuesto pruebas que incluyen diversos tipo de biomarcadores. El panel de las 4 calicreínas (denominado así de forma trivial por los investigadores del área) se compone de 3 biomarcadores candidatos de ARN para CaP (Homeobox C6 o HOXC6, Tudor Domain Containing 1 o TDRD1, Distal-Less Homeobox 1 o DLX1) en conjunto con el PSA sérico que se cuantifica tradicionalmente (Leyten, et al., 2015) (**Figura 8**). Este panel fue modificado poco después para desarrollar un modelo que fue sometido a prueba

en diversos hospitales en Holanda, y según los investigadores a cargo del proyecto, lograron disminuir el número de biopsias innecesarias sin tener una disminución de la sensibilidad (Van Neste, et al. (2016).



Fig. 8. Breve esquemático del flujo de trabajo utilizado en el descubrimiento del panel de las 4 calicreínas. El panel propuesto en este estudio fue modificado para sintetizar un modelo que fue puesto en práctica con resultados prometedores (Leyten, et al., 2015).

Hoy en día tenemos precedentes de varios tipos de biomarcadores urinarios, dependiendo de su fuente de origen: ADN, ARN y proteína (Goessl et al., 2001; Payne et al., 2009; Tosoian et al., 2016). Aunque el biomarcador más utilizado es el RNA largo no codificante: antígeno 3 del cáncer de próstata (PCA3), primer ARN urinario aprobado por la Administración de alimentos y Medicamentos (FDA) para su detección diagnóstica (Martignano et al., 2017).

La mayoría de los biomarcadores basados en ARN urinario se cuantifican en sedimentos urinarios (**Figura 9**), que podrían contener células y fragmentos de células pertenecientes a la próstata. Las muestras de orina para el diagnóstico de CaP a menudo se recolectan después de una tacto digital rectal (Garret & Jassie, 1976), ya que aumenta la cantidad de biomarcadores relacionados con CaP (Fujita & Nonomura, 2018). La corta vida del ARN debido a su inherente inestabilidad es el principal problema para este tipo de análisis. Además la orina posee una alta cantidad de ribonucleasas (Blank & Dekker 1981; Sugiyama et al., 1981), que provocan la fragmentación del ARN de interés.

Por esta razón, los niveles de expresión de el ARNm de PCA3 deben normalizarse con los niveles de ARNm de PSA para encontrar una relación con la cantidad de células CaP en la orina (Martignano et al., 2017), así como se han realizado asociaciones de nuevos métodos acoplados a los estándares (Xia et al., 2016).

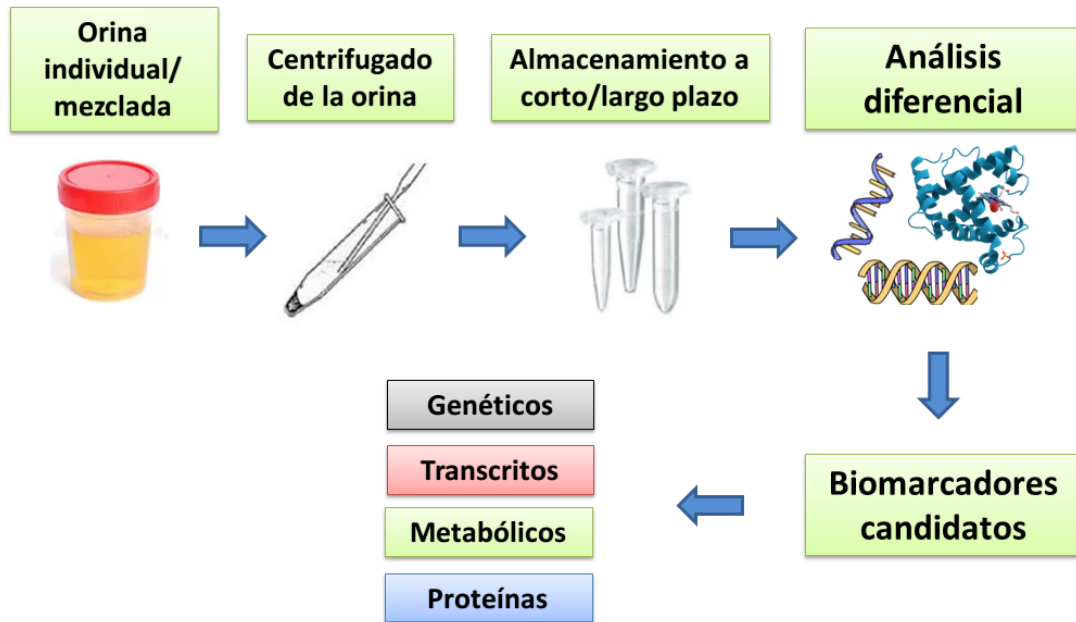


Fig. 9. Flujo general de trabajo para identificación de biomarcadores de CaP en orina. Modificado de: Wu, D et al., (2017). Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2017 Oct;118:15-26. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002. Epub 2017 Aug 19.

2.5.1 PCA3

El gen de PCA3 (también conocido como Código de despliegue diferencial 3, DD3) posee alrededor de 23,000 pb y está localizado en el cromosoma 9q21–22. El transcrito no puede traducirse debido a la presencia de múltiples codones de paro en su secuencia y es por esto que es clasificado como un ARN largo no codificante (Bussemakers et al., 1999). Es un transcrito prostático específico presente en el 95% de casos de CaP y significativamente sobreexpresado en tejido canceroso (Schalken, 1998). PCA3 está ausente en tejido benigno de próstata y otros tipos de tumores (Bussemakers et al., 1999; de Kok et al., 2002)

(Figura 10). Esto lo vuelve un biomarcador con un gran potencial diagnóstico y un sólido candidato para el pronóstico de la enfermedad (Schmid et al., 2015). También es el primer biomarcador urinario para CaP aprobado por la FDA en 2012, para uso en varones con una biopsia negativa previa (Fujita & Nonomura, 2018).

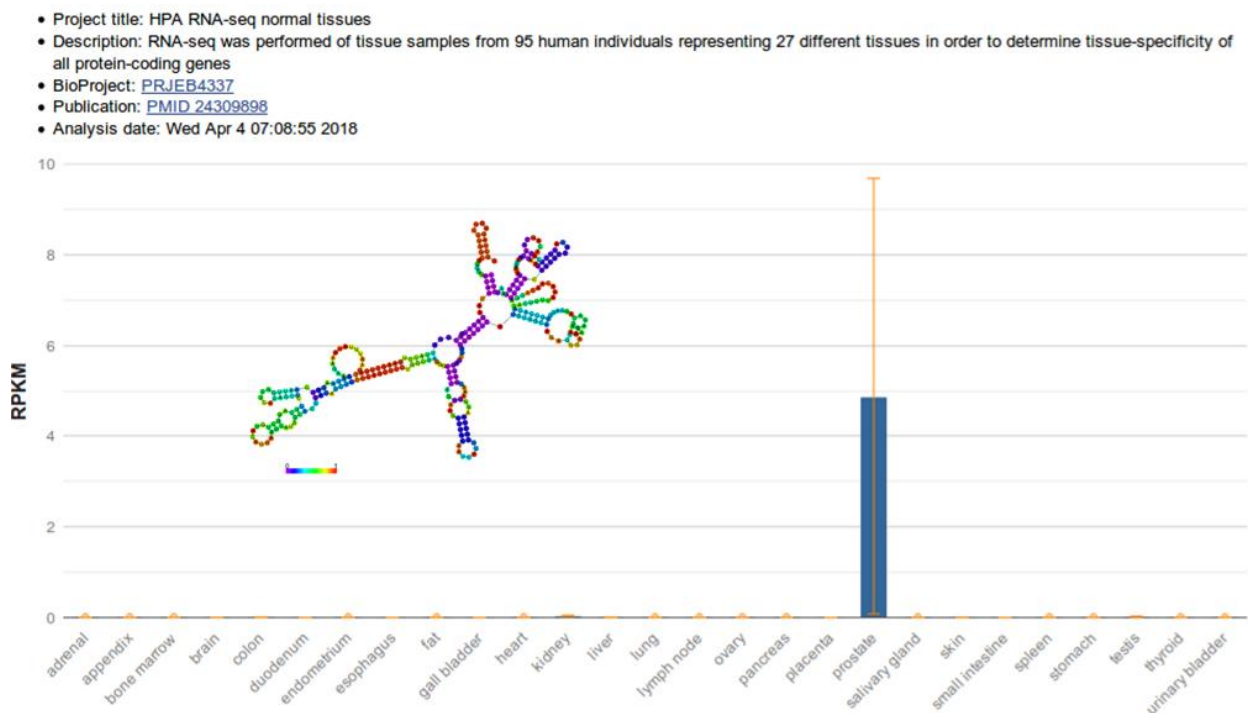


Fig. 10. Expresión de PCA3 en diferentes tejidos. La expresión es de PCA3 es específica de tejido de próstata. Y se sobreexpresa en CaP (NCBI, 2020).

La relevancia diagnóstica de PCA3 ha ido refinándose con el paso de los años (Fradet et al., 2004; Groskopf et al., 2006; Hessels et al., 2003; Shappell et al., 2009). Hasta que finalmente surgió un ensayo que era capaz de cuantificar el ARNinc PCA3 y el ARNm de PSA en orina de pacientes, lo cual implicaba un

diagnóstico aún menos invasivo que las pruebas séricas (Tinzi et al., 2004). Vale la pena mencionar que se ha intentado acoplar el diagnóstico mediado por el PCA3 y otros biomarcadores (Laxman et al., 2008; Ouyang et al., 2009; Rigau et al., 2009) como TMPRSS2-ERG en orina. Se ha documentado que esto puede incrementar la sensibilidad del estudio, aunque podría disminuir la especificidad (Hessels et al., 2007). Al mismo tiempo, diversos grupos se han sumado a la detección de PCA3 dentro de otro biomarcador de gran potencial: Las células circulantes de tumor (CTC) (Jost et al., 2010; Shaw et al., 2008). Aunque los resultados parecen prometedores, se requieren más estudios para confirmar la viabilidad del método que surja a partir de los datos publicados.

El análisis actual de PCA3 se realiza utilizando el ensayo desarrollado por HOLOGIC; PROGENSA PCA3 assay (© 2006–2013 Gen-Probe Inc.). Una prueba de amplificación que detecta el ARNm del PCA3 en la orina masculina para generar el llamado "Puntaje PCA3" (Hessels et al., 2003). Con un valor de corte inicial de 50, el ensayo PROGENSA demostró una sensibilidad del 69% y una especificidad del 79% (de la Taille, 2007).

$$\text{Puntaje PCA3} = \frac{\text{Número de copias de PCA3}}{\text{Número de copias de PSA}} \times 1000$$

Un metaanálisis reciente mostró que un corte de PCA3 de 20, en lugar de 35, usando el ensayo PROGENSA obtuvo una sensibilidad optimizada en caso de

repetición de biopsia de próstata. También mostró que >50% de las biopsias podrían haber sido evitadas en el mismo valor de corte (Martignano et al., 2017). Este kit ha sido sometido a múltiples pruebas en diversos estudios a lo largo del mundo (Wang et al., 2017). A pesar de que los resultados han sido tema de debate, los kits que aprovechan la presencia de biomarcadores específicos de tumor como PROGENSA representan una esperanza para encontrar el método diagnóstico y predictivo definitivo, al menos para cáncer de próstata (Malik & Feng, 2016). Interesantemente, ha servido de inspiración para otros métodos diagnósticos, y de sus estudios se han encontrado otros biomarcadores con una prometedora relevancia clínica (Albitar et al., 2016). Sin embargo, este estuche no está disponible para su utilización en México, y requiere un equipo especial para su análisis. Es por eso que se requiere especial atención en el desarrollo de tecnologías que puedan mejorar el diagnóstico y pronóstico de los pacientes de CaP. Los antecedentes en el campo indican la viabilidad de un método similar al aprobado por la FDA, para ser implementado en nuestro país. Esto con el afán de compensar el rezago y poner al día la investigación clínica mexicana con el resto del mundo.

Capítulo III - Justificación

El CaP se encuentra en primer lugar de morbilidad y mortalidad en la población masculina de nuestro país, por lo que es un problema de salud y existe la necesidad de mejorar los métodos diagnósticos actuales. Aunque el PSA es el marcador utilizado para la detección temprana y monitoreo de CaP, tiene limitaciones debido a su inespecificidad.

A lo largo del tiempo, se han propuesto diversos biomarcadores para diagnóstico de CaP en la literatura. Siendo PCA3 el único biomarcador aprobado en conjunto con el PSA, como auxiliar en decisiones médicas por la FDA, nos propusimos establecer un método para su análisis, y probarlo en líneas celulares, así como en tejido tumoral de CaP.

3.1 Objetivo General:

- Estandarizar un método para analizar la expresión de PCA3 y PSA en líneas celulares y cáncer de próstata.

3.2 Objetivos específicos:

1. Desarrollar la curva de calibración para medir el ARNinc PCA3 y el ARNm de PSA por qPCR.
2. Analizar la expresión de PCA3 y PSA en líneas celulares de CaP.
3. Analizar la expresión de PCA3 y PSA en muestras de tejido de pacientes con CaP y con HPB.

Capítulo IV - Material y métodos

4.1 Material

Consumibles

Reactivos:

Agua bidestilada, Azul de tripano (Corning™, 15393661), Etanol 100% (EMPARTA® ACS, 107017), ezDNase™ Enzyme (Invitrogen™, 11766051), gBlocks™ (Integrated DNA Technologies, Inc.), Isopropanol 100% (EMPROVE®, 100995), Medio de cultivo RPMI 1640 (Gibco™, 11875119), F-12K de Ham (Gibco™, 21127022), PCA3 TaqMan Gene Expression Assay (ID Hs01371939_g1, ThermoFisher Scientific), PSA TaqMan Gene Expression Assay (ID Hs02576345_m1, ThermoFisher Scientific), 18S TaqMan Gene Expression Assay (Hs99999901_s1, ThermoFisher Scientific), Quick-RNA™ FFPE Kit (Zymo research, R1008), SuperScript IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen™, 18091050), Solución de desinfección (Cloralex®), TRIzol Reagent (Invitrogen™, 15596026), TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™, 4326708)

Materiales

Bisturí, Guantes de nitrilo (Ambiderm™), MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™, N8010560), Puntillas para micropipeta 10, 200 y 1000 µL,

Tubos cónicos para centrifuga (Falcon™, FA352098), Tubos para microcentrifuga (SSI, Pk/1000).

Equipo

Centrífuga refrigerada (Biorad), Nanodrop 2000 (Thermo Fisher), 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied biosystems), Vortex genie (Scientific Industries).

4.2 Métodos

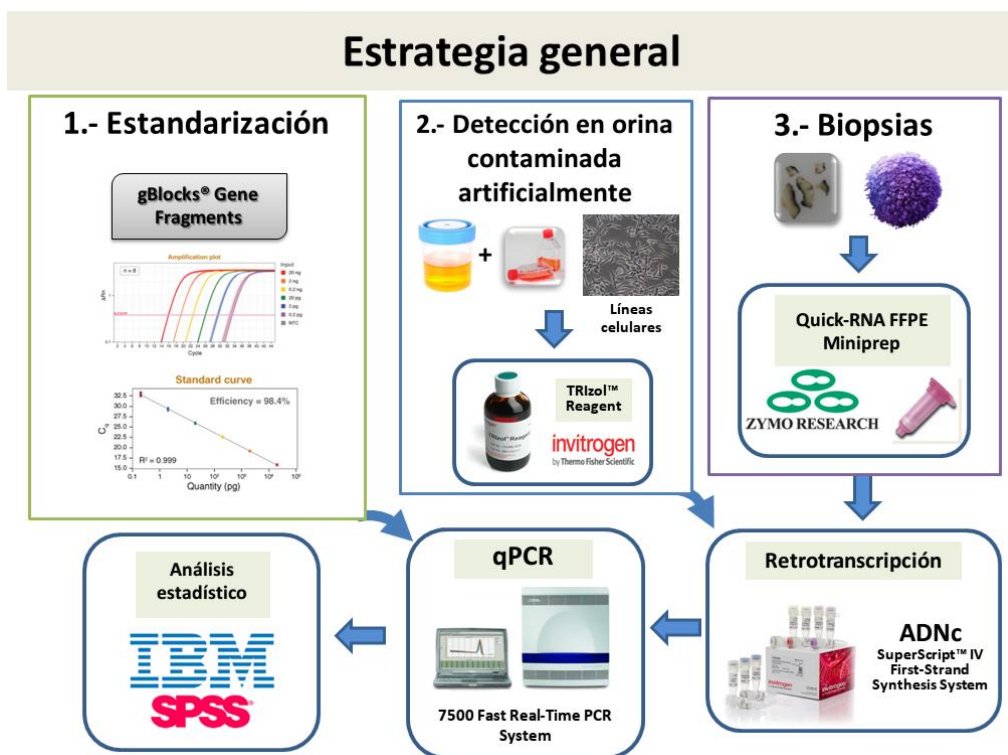


Fig. 11. Estrategia general de la metodología. Primero se realizará la estandarización del método cuantitativo de los biomarcadores, seguido de una cuantificación en líneas celulares, para concluir el estudio con un análisis de biopsias tumorales incluidas en parafina.

4.2.1 Objetivo 1. Elaboración de curva de calibración para qPCR

Para determinar el número de copias en cada muestra, se realizó una curva de calibración utilizando ADN sintético "g-Block" (g-Blocks Gene Fragments, IDT®) como estándar. El diseño fue basado en secuencias utilizadas anteriormente como

estándar por otro grupo de trabajo (Coelho, et al., 2015). El gBlock diseñado para este protocolo contó con las secuencias del ARNm de PSA y la variante 1 del transcrito de PCA3 separadas por una secuencia de 30pb sugerida por el proveedor:

>PCA3-PSA Gblock

```
GTGAGAAATAAGAAAGGCTGCTGACTTTACCATCTGAGGCCACACATCTGCTGAAATG
GAGATAATTAACATCACTAGAAACAGCAAGATGACAATATAATGTCTAAGTAGTGACAT
GTTTTTGCACATTTCCAGCCCCTTTAAATATCCACACACACAGGAAGCACAAAAGGAA
GCACAGAGATCCCTGGGAGAAATGCCCGGCCGCCATCTTGGGTCATCGATGAGCCT
CGCCCTGTGCCTGGTCCCGCTTGTGAGGGAAGGACATTAGAAAATGAATTGATGTGT
TCCTTAAAGGATGGGCAGGAAAACAGATCCTGTTGTGGATATTTATTTGAACGGGATT
ACAGATTTGAAATGAAGTCACAAAGTGAGCATTACCAATGAGAGGAAAACAGACGAG
AAAATCTTGATGGCTTCACAAGACATGCAACAAACAAAATGGAATACTGTGATGACAT
GAGGCAGCCAAGCTGGGGAGGAGATAACCACGGGGCAGAtgcatatctccggtgcgtaacatgc
agtacATGTGGGTCCCGGTTGTCTTCCTCACCTGTCCGTGACGTGGATTGGTGCTGC
ACCCCTCATCCTGTCTCGGATTGTGGGAGGCTGGGAGTGCGAGAAGCATTCCCAACC
CTGGCAGGTGCTTGTGGCCTCTCGTGGCAGGGCAGTCTGCGGCGGTGTTCTGGTGC
ACCCCAGTGGGTCCTCACAGCTGCCCACTGCATCAGGAA
```

Los primers que fueron utilizados para la amplificación se encuentran disponibles comercialmente en ThermoFisher Scientific como TaqMan® Gene Expression Assays. El ensayo que se utilizó para la amplificación de PCA3 tiene el ID Hs01371939_g1 y el ensayo para la amplificación de PSA fue el ID Hs02576345_m1. Se utilizó también la subunidad ribosomal 18S como endógeno de referencia con el ID de ensayo Hs99999901_s1.

Para obtener el plot de amplificación el g-block fue diluido en agua libre de nucleasas hasta obtener una concentración de 10 ng/ μ L. Se tomaron 5 μ L de esta solución y se aforaron a 100 μ L. La dilución resultante (0.5 ng/ μ L) fue utilizada para realizar diluciones seriadas 1:10. En total se obtuvieron 10 diluciones para tener un rango de concentración de 50 pg/ μ L a 50 zg/ μ L. **(Figura 12)**. Cada mezcla de reacción a determinada concentración de ADN fue amplificada y se generó el plot de amplificación. El Ct (Ciclo umbral o Cycle treshold en inglés) de cada dilución fue graficado en una curva de calibración que luego se utilizó como referencia para predecir la concentración de cada muestra. El resultado fue reportado en número de copias por lo que el valor de la masa utilizado en cada mezcla de reacción tendrá que ser convertido a número de copias utilizando la fórmula que relaciona el número de moles con la masa en gramos y la masa molecular en UMA.

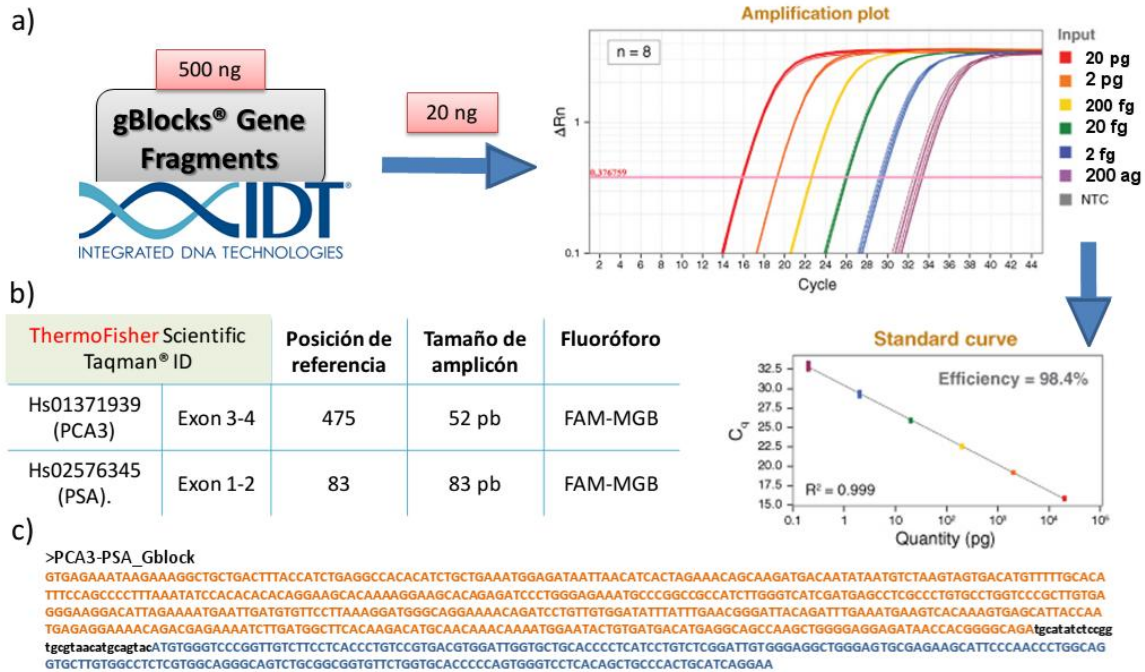


Fig. 12. Esquema de elaboración de curva estándar. a) Generación del plot de amplificación mediante diluciones seriadas del gBlock (estándar). b) ID de primers y sondas utilizadas para amplificación de PCA3 y PSA. c) Secuencia de gBlock utilizado. En naranja se muestra la secuencia de PCA3, en minúsculas negras se muestra el separador de 30 pb recomendado por el fabricante y en azul se encuentra resaltada la secuencia de PSA.

4.2.2. Objetivo 2. Analizar la expresión de PCA3 y PSA en líneas celulares de CaP

Para determinar el número de copias de PCA3 y PSA en orina se prepararon soluciones de orina contaminadas con células LNCaP y PC3. Se cultivaron las líneas LNCaP (control positivo) y PC3 (control negativo) para el ARN total de los sedimentos urinarios que contenga los transcritos de interés (PCA3 y PSA).

4.2.2.1 Cultivo celular de LNCaP y PC3

Las células LNCaP fueron cultivadas en contenedores rectangulares de 25 cc (Corning®) con el medio RPMI 1640 (Gibco™) con 10% de SFB, y almacenadas en una incubadora, con CO₂ al 5%. Las células de la línea PC3, se almacenaron bajo las mismas condiciones que la LNCaP, pero cultivadas con medio Ham's F-12K con 10% de SFB (**Figura 13**). Cuando el cultivo alcanzó una confluencia celular de 70 - 90%, se descartó el medio de cultivo para después añadir 1 mL de tripsina 1X sobre la monocapa. La tripsina no se dejó en contacto con las células más de 5 minutos para evitar el daño celular irreversible.

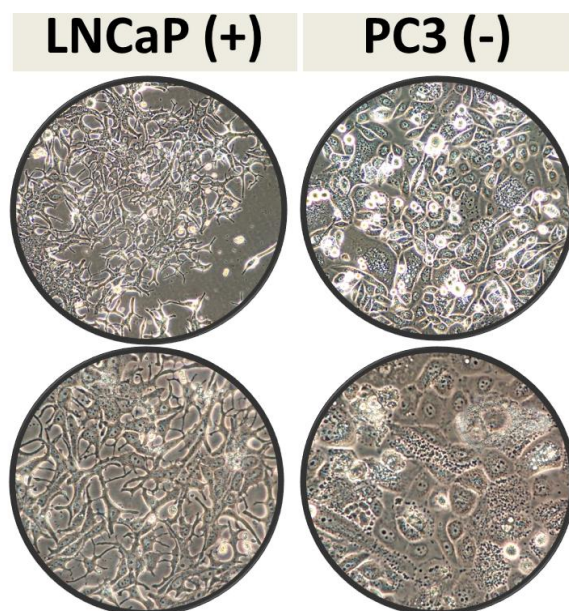


Fig. 13. Micrografías de líneas celulares utilizadas y sus respectivos medios de cultivo. LNCaP (+) expresa PCA3 y PSA, mientras que PC3 (-) carece de ambos biomarcadores.

Una vez que la tripsina comenzó a separar las células en monocapa, la mezcla de células con tripsina se colocó en un vial de 2 mL para su posterior centrifugación a 500 g durante 3 - 5 minutos. Se descartó la tripsina (el sobrenadante) y las células fueron resuspendidas en medio de cultivo. Se homogeneizó la solución de células con micropipeta. Una vez que desaparecieron todos los cúmulos celulares detectables a simple vista, se tomaron 10 μ L de la solución de células, los cuales se vertieron en un vial con 10 μ L de azul de tripano (0.4%). La solución se mezcló con la micropipeta y se vertieron los 20 μ L en la cámara de Neubauer para el conteo celular. Una vez obtenido la solución de células con azul de tripano 2:1, la mezcla se colocó entre el cubreobjetos y las zonas de conteo de la cámara. Las células se contaron en los cuatro cuadrados grandes (1 mm X 1 mm cada uno) de las esquinas dos veces (cada una con 10 μ L).

En el conteo se excluyeron las células que se encontraban teñidas de color azul (células muertas). Tampoco se contaron las células que tocaban las líneas de alguno de los 16 cuadrados pequeños que conforman a cada cuadrado grande (1 mm X 1 mm). Las células contadas debieron ser incoloras y estar uniformemente distribuidas a lo largo de la muestra para evitar repetir la mezcla de solución con células y azul tripano.

Para calcular el número de células por mL, se obtuvo el promedio de los cuatro cuadrados grandes, luego se dobló el resultado, para después calcular 10,000 veces esa cantidad.

Fórmula utilizada:

$[(\text{Promedio de 4 cuadrados grandes}) (2)] \times [10,000] = \text{Número de células por mL}$

Posteriormente se realizó la extracción de ARN total (procedimiento 4.2.2.3), retrotranscripción (procedimiento 4.2.4) y qPCR (procedimiento 4.2.5).

4.2.2.2 Estandarización del método cuantitativo en cultivo celular

Se realizaron alícuotas de 350,000 a 60,000 células de las líneas celulares LNCaP y PC3 de cultivos con al menos el 70% de confluencia en contenedores de 25 cc (**Figura 14**). Cada alícuota fue aforada con orina de un sujeto sano hasta alcanzar el volumen de 1 ml. Cada vial con células en orina fue centrifugado durante 3-5 min a 500 g. Se descartó el sobrenadante y se realizó una extracción de ARN, retrotranscripción y amplificación mediante qPCR como se ha descrito previamente. Las células LNCaP expresaron los biomarcadores PSA y PCA3, y estos fueron cuantificados. Las células PC3 no expresan ninguno de estos

biomarcadores y no pudieron ser detectados por la qPCR (van Bokhoven, et al. 2003). Posteriormente se realizó la extracción de ARN total (procedimiento 4.2.2.3), retrotranscripción (procedimiento 4.2.4) y qPCR (procedimiento 4.2.5).

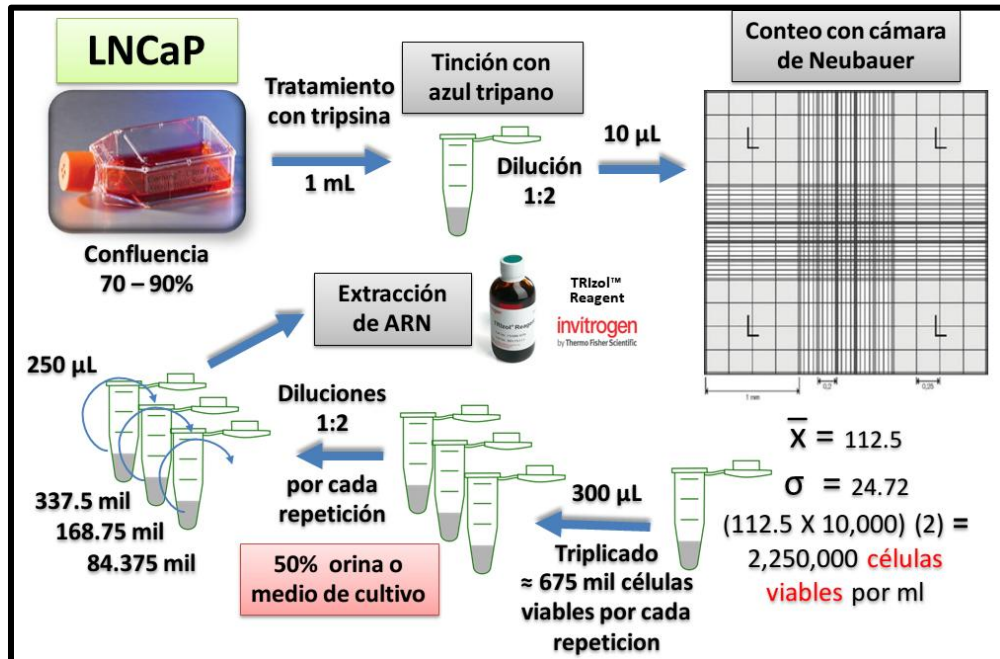


Fig. 14. Flujo de trabajo para la estandarización del método cuantitativo en cultivo celular.

4.2.2.3 Extracción de ARN de las líneas celulares con TRIZOL™

4.2.2.3.1 Lisis de la muestra y separación de fases

Las suspensiones de las líneas celulares fueron centrifugadas durante 10 minutos a 500 g para formar un paquete de células en el fondo del vial. Se removió el sobrenadante con una micropipeta y se resuspendió el paquete con 500 μL de TRizol™ Reagent (Life Technologies®) (**Figura 15**). La mezcla se homogeneizó con vórtex para después incubar el lisado durante 5 minutos.

Se añadieron 100 μL de cloroformo a la mezcla de TRizol™ Reagent y restos celulares. Se incubaron durante 2 minutos para luego centrifugar la muestra durante 15 minutos a 12,000 rpm en centrifuga refrigerada a 4 °C. La mezcla se separó en 3 fases, una incolora en la parte superior (fase acuosa que contiene el ARN total), una interfase opaca (que contiene el ADN) y una fase en la parte inferior de color rojo (fase orgánica). La fase acuosa fue transferida (a un nuevo vial).

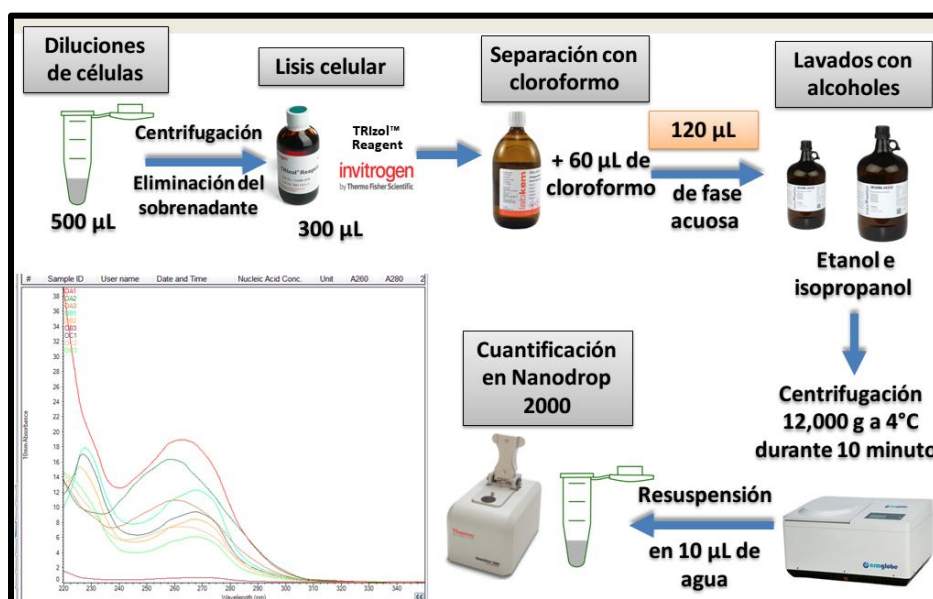


Fig. 15. Esquema de extracción de ARN a partir de cultivo celular.

4.2.2.3.2 Precipitación, lavado y resuspensión del ARN

A la fase acuosa se le añadieron 250 μ L de isopropanol. La mezcla se incubó durante 10 minutos a -20 °C y se centrifugó a 12,000 rpm a 4 °C durante 10 minutos. Si la cantidad de ácidos nucleicos lo permite, el ARN se muestra como un precipitado de color blanco en el fondo del vial. El sobrenadante fue descartado con una micropipeta sin tocar el paquete de ácidos nucleicos recién formado.

Se añadieron 500 μ L de etanol al 75% al vial con el paquete de ácidos nucleicos. Se utilizó el vórtex para remover las sales contenidas en el paquete y luego se centrifugó la muestra a 8,000 rpm a 4 °C durante 5 minutos. El sobrenadante se descartó con micropipeta para dejar la menor cantidad de etanol que sea posible. Luego se esperó 5-10 minutos a que se evapore la mayor cantidad de etanol del paquete. Una vez que el paquete de ácidos nucleicos comenzó a transparentarse, se vertieron 25 μ L de agua libre de RNAsas en el vial para resuspender el ARN. El ARN obtenido fue analizado en un gel desnaturizante de cloro para revisar la integridad de los ácidos nucleicos obtenidos. El gel fue preparado a una concentración de agarosa de 1.2%, y con cloro desinfectante comercial (Cloralex) a una concentración final de 1%.

4.2.3 Objetivo 3. Analizar la expresión de PCA3 y PSA en muestras de tejido de pacientes con CaP y con HPB.

Para determinar el número de copias en tejido se seleccionaron 10 biopsias tumorales de cáncer de próstata y 8 inclusiones de hiperplasia prostática benigna como controles. Los criterios de inclusión para los tejidos incluidos en parafina fueron: muestras de pacientes con CaP y un grado Gleason clínicamente significativo mayor o igual a 7. Como controles se emplearon muestras de HPB. Las muestras fueron revisadas y proporcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario. Como requisito, debía existir un expediente del paciente para obtener la información requerida para este proyecto.

Se emplearon secciones de 25 mg de tejido, y con una celularidad tumoral >80% (**Figura 16**) en el caso de los tejidos con cáncer de próstata. A cada bloque se le realizó una extracción de ARN con el Quick-RNA™FFPE Kit (Zymo Research Corp) (Anexo 1). El ARN total obtenido fue retrotranscrito con SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System (Invitrogen) (Anexo 2), para después realizar la cuantificación absoluta de los biomarcadores de interés con qPCR.

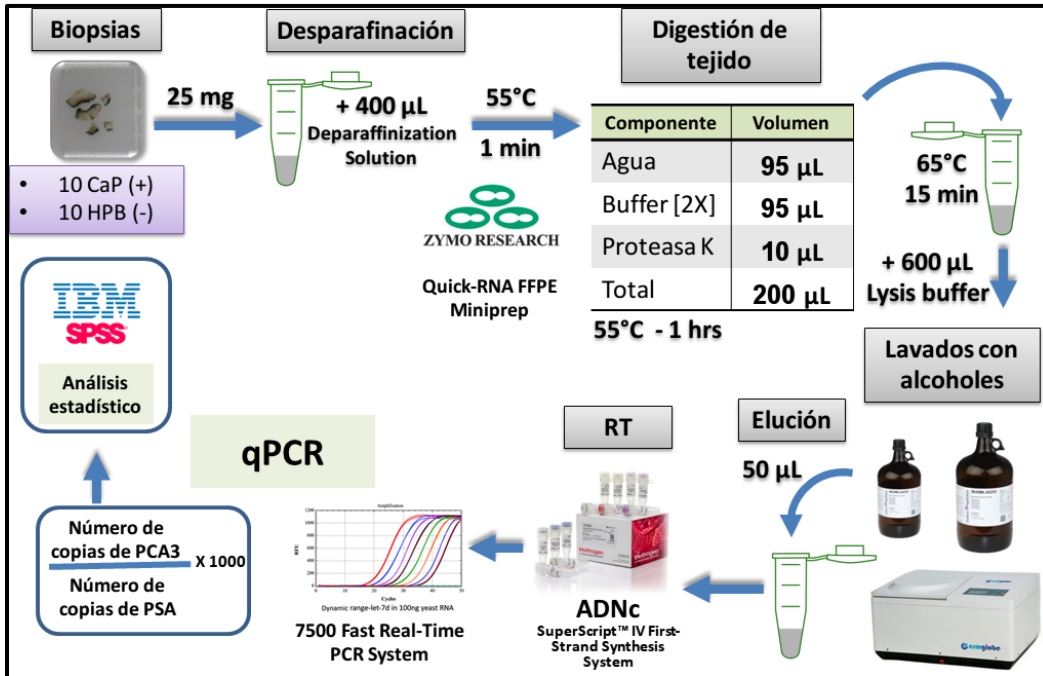


Fig. 16. Esquema breve de procesamiento de muestras de tejido.

4.2.3.1 Cuantificación del número de copias por qPCR: Amplificación con TaqMan™ Universal PCR Master Mix

Para obtener el número de copias por cantidad de células, se decidió tomar en cuenta el volumen del producto de extracción en lugar de la masa. El paquete de ácidos nucleicos obtenido de la extracción se resuspendió en 10 µL en todos los casos. Se tomaron 4.5 µL de cada una de las alícuotas de ARN total para realizar la digestión de ADN genómico. Después del tratamiento con ADNasa, se tomaron 4 µL de la mezcla para realizar la retrotranscripción. Posteriormente, se tomaron 4.5 µL de la solución con ADNc para realizar la amplificación.

La amplificación del ADNc obtenido de la retrotranscripción del ARN total y el ADN estándar (gBlock) se realizó en el equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems™) en modo estándar (por sugerencia del fabricante del mastermix). Primero se preparó la mezcla de reacción. Se tomaron 10 µL del TaqMan™ Universal PCR Master Mix, se añadió 1 µL del TaqMan® Gene Expression Assay (20X) que incluye los primers para PSA, PCA3 o el endógeno de referencia (Subunidad ribosomal 18S), se colocaron 500 ng de ADNc y la mezcla se aforó con agua libre de nucleasas hasta tener un volumen final de 10 µL. Cada reacción se realizó por duplicado. El experimento incluyó la muestra, el control positivo (g-Block), el control negativo (sin templado) y la reacción para el endógeno. Se cerró la tapa del vial y se agitó en vórtex para mezclar las soluciones. Se centrifugó el vial para eliminar las burbujas de la mezcla. Luego se transfirieron 10 µL de cada mezcla de reacción a cada pozo de la placa óptica.

Se utilizaron los parámetros sugeridos por el fabricante para la amplificación: Para activar la polimerasa 10 min a 95 °C, seguido de 15 s a 95 °C para desnaturalización, y el alineamiento, así como la extensión se llevó a cabo en el mismo paso de 1 min a 60 °C.

4.2.4 Análisis de datos

El número de copias de PCA3 y PSA se comparó entre las líneas celulares y entre los tejidos analizados. El número de copias de las biopsias de CaP fue comparado con las copias extraídas en las inclusiones de HPB, con una prueba de U de Mann Whitney para muestras independientes en el programa SPSS20.

Capítulo V - Resultados

5.1 Objetivo 1: Desarrollo de curvas de calibración para cuantificación del ARNinc PCA3 y el ARNm de PSA por qPCR

El stock de ADN sintético g-Block (10 ng/ μ L) se diluyó para obtener una concentración de 0.5 ng/ μ L. A partir de esa solución, se realizaron diluciones seriadas 1:10. En total se obtuvieron 10 diluciones para tener un rango de concentración de 50 pg/ μ L a 50 zg/ μ L. De estas 10 soluciones se seleccionaron 7 para utilizarlas como estándares en la curva de calibración (**Figura 17**). Se tomaron 4 μ L de cada dilución para su amplificación en qPCR, de esta forma el rango de masa utilizado para la curva de calibración fue de 200 fg a 20 ag, lo cual nos permite cuantificar desde 38 hasta 389,656 copias de PCA3, y desde 94 a 945,332 copias de PSA (**Figura 17**).

Con los Ct obtenidos a partir de la amplificación de una cantidad de masa conocida de g-Block, se realizó la regresión lineal y se obtuvo el coeficiente de correlación de la curva para cada secuencia (PCA3 y/o PSA) (**Figura 18**). Para PCA3, el coeficiente de correlación fue de 0.9905 y el coeficiente de correlación para PSA fue de 0.9899. Mientras que la eficiencia de la reacción fue de 111%

para PCA3 y 109% de PSA. Con esto se cumplen los requisitos para estimar el número de copias de cada transcrito en la muestra que sea utilizada.

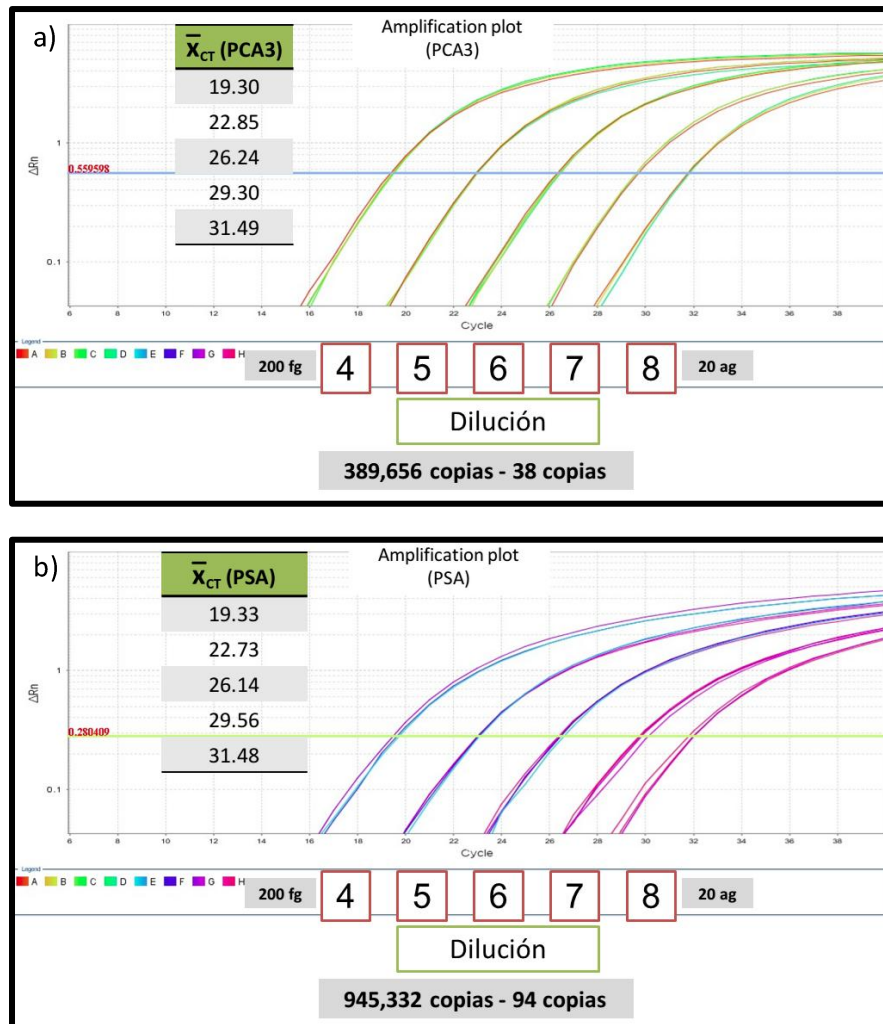


Fig. 17. Gráficas de amplificación para curvas de calibración. a) Plot de amplificación de PCA3 a partir de g-Block diseñado para fungir como estándar. De 20 ag a 200 fg fueron utilizados para generar cada curva, el número de copias dentro del rango dinámico fue de 38 a 389,656 copias para PCA3. b) Plot de amplificación de PSA a partir de g-Block. De 20 ag a 200 fg fueron utilizados para generar cada curva, el número de copias dentro del rango dinámico fue de 94 a 934,332 copias para PSA.

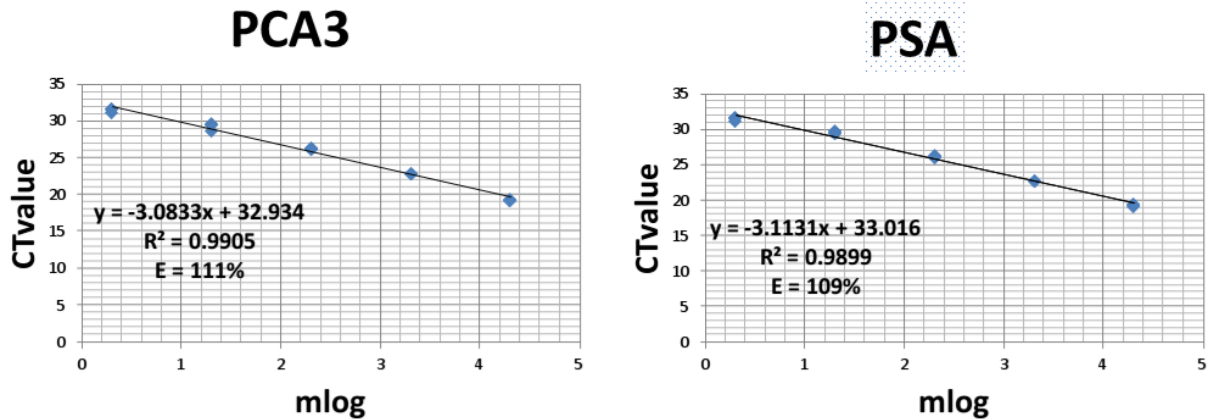


Fig. 18. Curvas de calibración para cuantificación de PCA3 y PSA. En el eje de las y se gráfica el valor de Ct obtenido para cada estándar y en el eje de las x el \log_{10} de la masa. La correlación entre la masa y ciclo de amplificación fue de >0.98 .

5.2 Objetivo 2: Análisis de la expresión de PCA3 y PSA en líneas celulares de CaP

Se realizó la estandarización de las extracciones de ARN total con TRIzol a partir de células en cultivo. Después se preparó un gel de agarosa desnaturalizante con cloro para poder observar las bandas características de 28 y 18S que muestra la electroforesis del ARN total. Los productos de extracción fueron cuantificados en Nanodrop 1000 para revisar la concentración de ARN, la relación 260/280 (que indica la cantidad de proteínas contaminando la muestra) y la relación 260/230 (proporción de sales respecto a cantidad de ácidos nucleicos). Se seleccionaron 3 productos de extracción (80.1, 20.1 y 2510 1) por sus distinta concentración de ARN y pureza. Las muestras fueron colocadas por duplicado en

el gel inmerso en buffer TAE. Se colocaron 500 ng para cada muestra (excepto 2510 1 para la cual se colocaron 1,500 ng) y se utilizó el indicador de peso molecular 1 kb plus de Invitrogen y se realizó la electroforesis (**Figura 19**).

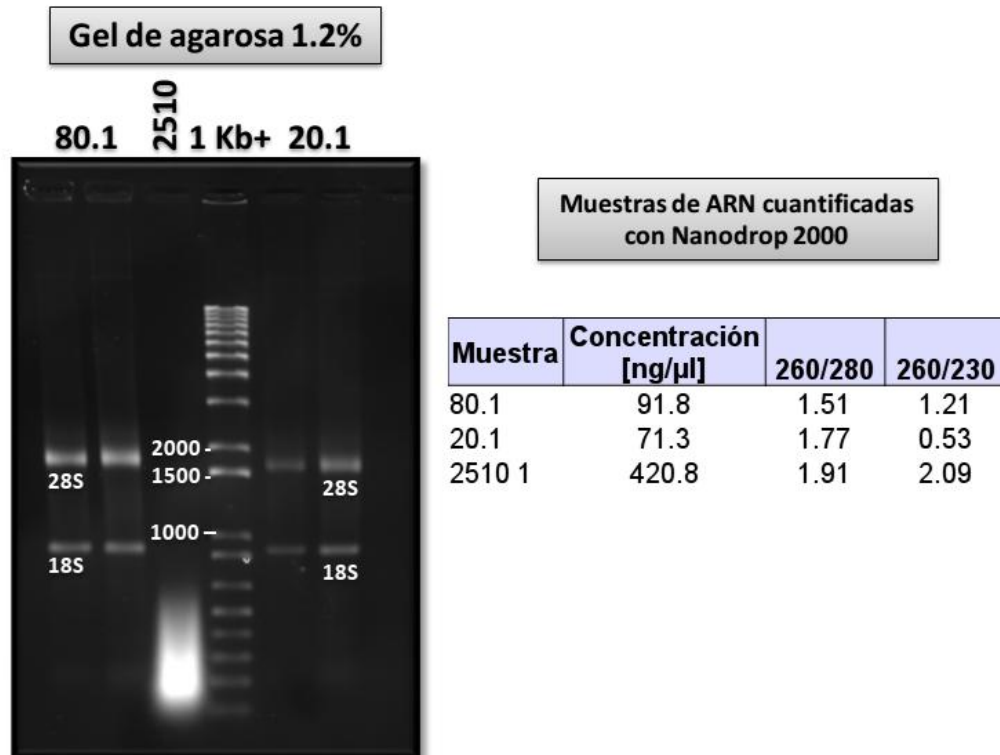


Fig. 19. Análisis de integridad de ARN extraído. Gel desnaturizante de agarosa para análisis de integridad del ARN extraído. Los carriles fueron cargados con duplicados de la muestra señalada en la parte superior. En la tabla se muestra la concentración de ARN y la pureza de cada muestra cargada en el gel. El indicador de peso molecular corresponde a 1 Kb Plus DNA ladder de Invitrogen.

Al revelar el gel se pudo observar que la muestra 2510 1 se encontraba completamente degradada (a pesar de mostrar la mayor concentración y pureza

de todas las muestras utilizadas), mientras que 80.1 y 20.1 mostraban las bandas 28 y 18S al desplazamiento esperado. De esta forma vemos que el ARN total extraído con nuestra metodología es apto para su retrotranscripción y posterior amplificación.

Para someter a prueba la metodología propuesta para determinar el número de copias de PCA3 y PSA en orina, se diseñó un experimento para hacerlo a partir de células LNCaP inmersas en orina. Se cultivaron las líneas LNCaP y PC3 para obtener ARN total que contenga los transcritos de interés (PCA3 y PSA). Cuando las células en cultivo mostraban una confluencia de al menos 70%, se realizó un tratamiento proteolítico con tripsina para despegarlas de las cajas de cultivo. Se prepararon diluciones con 50% de azul de tripano para contar las células viables en la cámara de Neubauer improved. En total se contaron 2,250,000 células en 1 ml para el primer experimento y en el segundo experimento se contaron 1,670,000 de células en 1 ml de medio. De cada mililitro de solución con células se tomaron 300 μ L por triplicado. Con cada réplica se realizaron tres diluciones seriadas 1:2 (con orina para el experimento 1 o medio de cultivo para el experimento 2) para obtener soluciones con al menos 60,000 y hasta 340,000 células. Las soluciones se centrifugaron para obtener el paquete con células en el sedimento y con esto se realizó la extracción de ARN con TRIzol.

Las gráficas de absorbancia del Nanodrop 2000 obtenidas de las muestras de ARN total muestran una gran cantidad de contaminantes alrededor de los 230 nm en las extracciones de orina y medio (Figura 20). Lo cual sugiere que las muestras presentan contaminación con sales. La concentración de ARN total en cada grupo fue variable, sin embargo, los datos presentan menor dispersión para las extracciones obtenidas de células diluidas con medio de cultivo (Tabla 1).

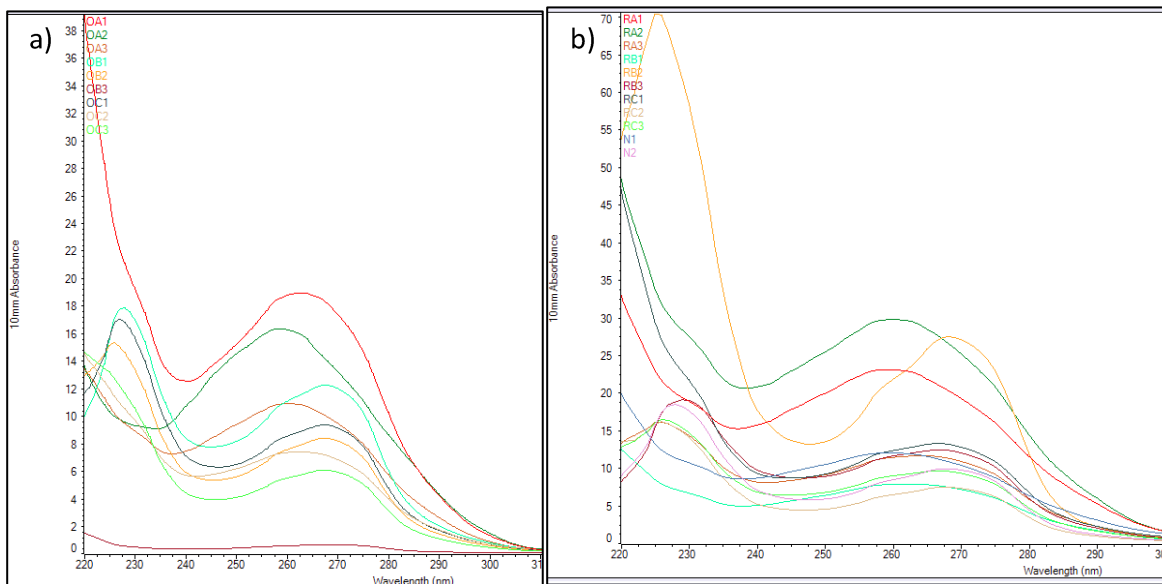


Fig. 20. Gráficas de absorbancia en diferentes longitudes de onda obtenidas de Nanodrop 2000. a) Curvas de extracciones de ARN de LNCaP inmersas en orina. b) Curvas de extracciones de ARN de LNCaP y PC3 inmersas en medio de cultivo RPMI 1640.

Tabla 1. Concentración de ARN obtenido del cultivo celular determinada con Nanodrop 2000.

Muestra*	Concentración [ng/μl]	260/280	260/230
OA1	748.7	1.84	0.97
OA2	649.1	1.89	1.76
OA3	433.4	1.91	1.22
OB1	440.1	1.83	0.65
OB2	299.9	1.79	0.56
OB3	20.3	1.67	1.21
OC1	338.9	1.8	0.54
OC2	291.5	1.85	0.75
OC3	216.9	1.77	0.51
RA1	921.6	2.00	1.22
RA2	1189	2.06	1.08
RA3	455.2	1.96	0.80
RB1	311.6	1.94	1.18
RB2	870.2	1.82	0.37
RB3	462.6	1.95	0.61
RC1	491.2	1.83	0.57
RC2	256.3	1.88	0.45
RC3	356.9	1.91	0.61
N1	479	1.90	1.12
N2	336.3	1.93	0.48

*Las letras al principio del ID indican si la muestra estuvo inmersa en orina (O) o en medio de cultivo RPMI 1640 (R). Las letras A, B y C representan el nivel de dilución de la alícuota. Las letras N representan a las extracciones de PC3.

Para obtener el número de copias por cantidad de células, se decidió tomar en cuenta el volumen del producto de extracción en lugar de la masa. El paquete de ácidos nucleicos obtenido de la extracción se resuspendió en 10 μL en todos los casos. Se tomaron 4.5 μL de cada una de las alícuotas de ARN total para realizar la digestión de ADN genómico. Después del tratamiento con ADNasa, se tomaron 4 μL de la mezcla para realizar la retrotranscripción. Posteriormente, se tomaron 4.5 μL de la solución con ADNc para realizar la amplificación. Para el cálculo del número de copias, las curvas de amplificación de todas las diluciones de las líneas celulares en orina (**Figura 21**) muestran gran variabilidad, a pesar de que por el número de células, la curva de amplificación de cada dilución debería cruzar el umbral un ciclo después de la dilución siguiente. Las gráficas lineales muestran con mayor claridad que la expresión de PCA3 en todas las diluciones fue menor que la expresión de PSA (**Figura 22**).

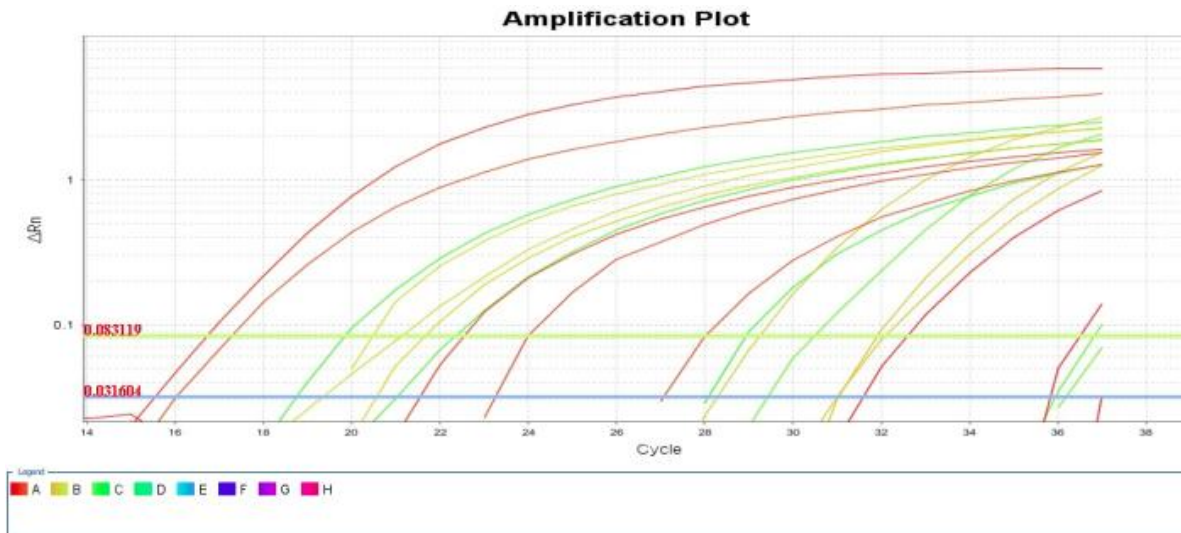


Fig. 21. Gráfica logarítmica de amplificación de muestras obtenidas de orina adicionada con LNCaP. El umbral de PCA3 en color celeste, el umbral de PSA se muestra en color verde.

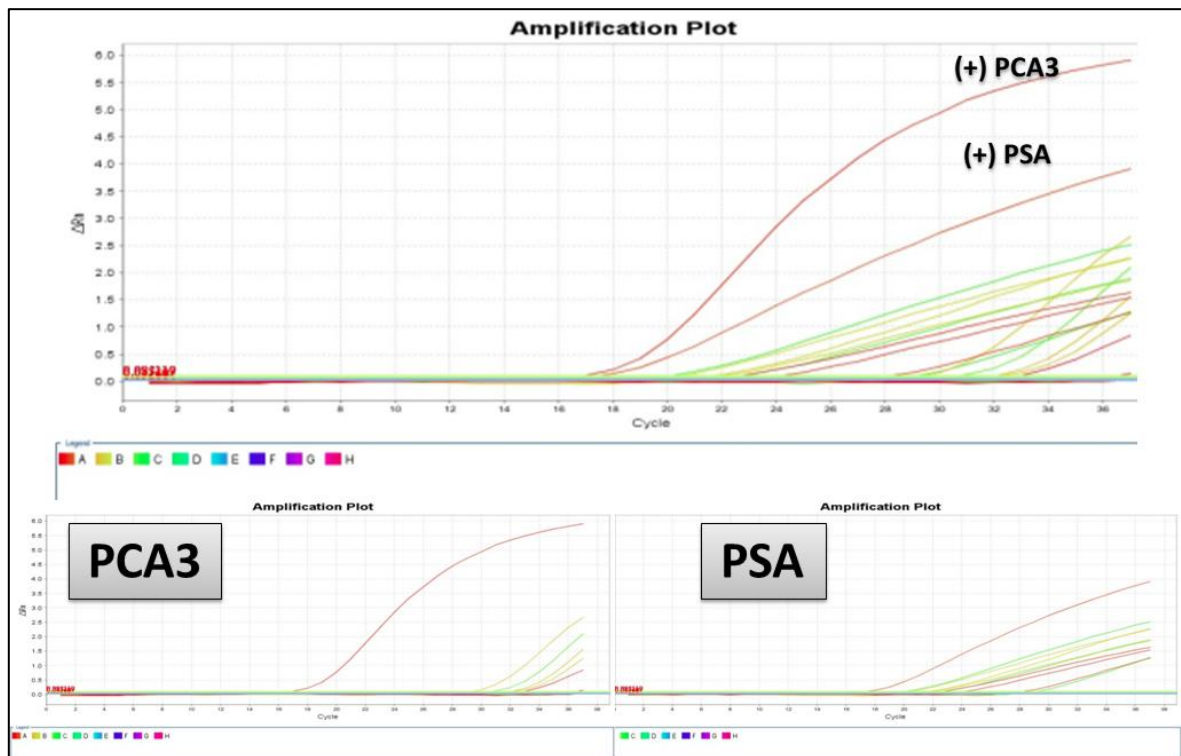


Fig. 22. Gráficas lineales de amplificación de PCA3 y PSA en orina. Se indican las curvas de los controles positivos "(+)", abajo se presentan las curvas para cada gen.

La gráfica de amplificación para las diluciones en medio (Figura 23) fue similar a la de diluciones con orina. Sin embargo, la línea celular PC3 no presentó expresión de ninguno de los biomarcadores buscados (PCA3 y PSA). Esto concuerda con la literatura y cumple su función como control negativo. Además, nuevamente las gráficas lineales separadas por transcrito muestran una mayor expresión de PSA respecto a PCA3 (Figura 24). Esto coincide con el supuesto de que PSA se encuentra a hasta 35 veces más sobreexpresado que PCA3 en células de cáncer.

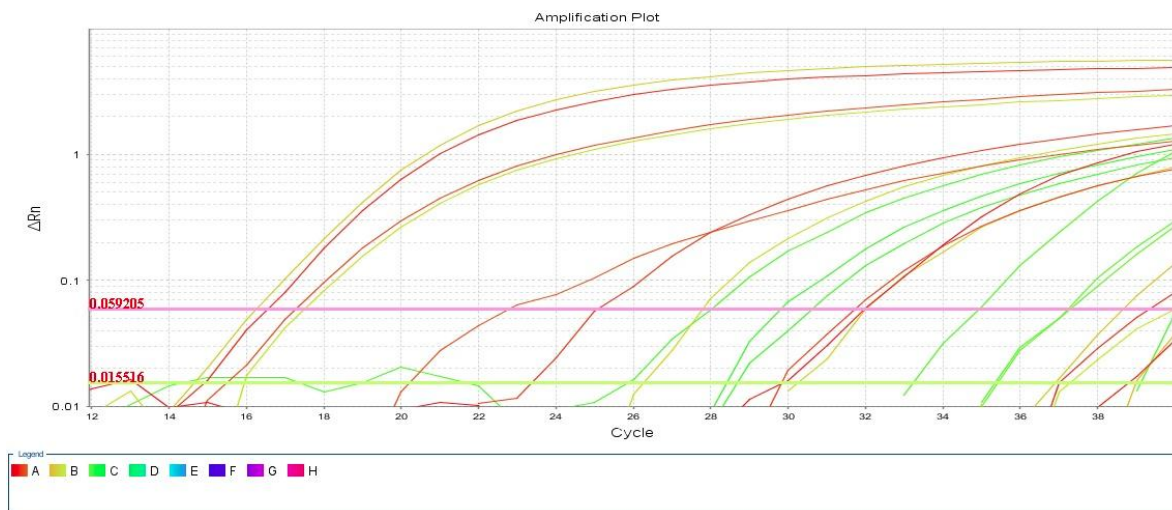


Fig. 23. Gráfica logarítmica de amplificación de muestras obtenidas de diluciones de células en medio de cultivo RPMI 1640. El umbral de PCA3 en color verde, el umbral de PSA se muestra en color rosado.

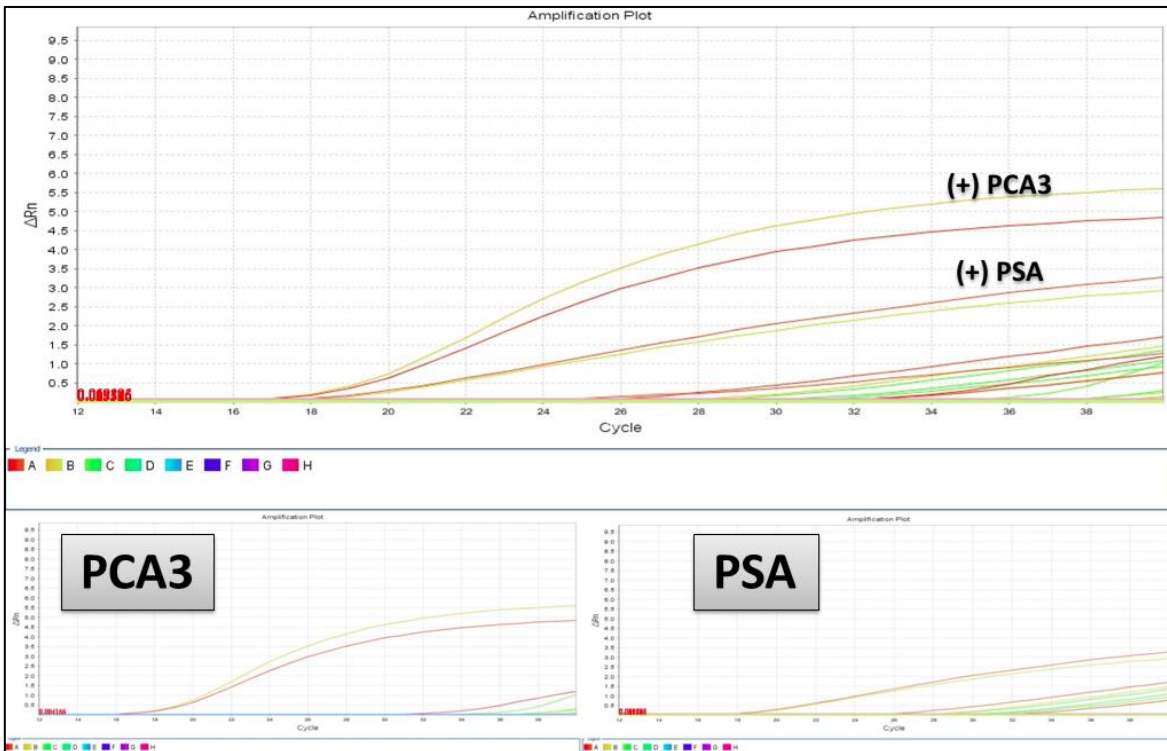


Fig. 24. Gráficas lineales de amplificación de PCA3 y PSA en diluciones de células con medio de cultivo RPMI 1640. Se indican las curvas de los controles positivos "(+)", abajo se presentan las curvas para cada gen.

Con los datos de Ct obtenidos se calculó la masa despejando la x en la fórmula de la línea recta utilizando la m y la b de las curvas de calibración con g-Block en cada dilución, y posteriormente se convirtió a número de copias con la fórmula que relaciona el número de avogadro y el número de moles de una sustancia por unidad de masa. Esto se hizo en el DNA/RNA Copy number calculator de Endmemo (disponible en endmemo.com/bio/dnacopynum.php). Se realizó una regresión lineal con los datos obtenidos (**Figura 25**) y posteriormente se graficó el número de copias de cada solución para visualizar las cantidades y compararlas con mayor facilidad (**Figura 26**).

El número de copias en las diluciones de orina fue superior al de las diluciones con medio RPMI 1640, aunque esto no significa que el medio pueda interferir en la extracción de ARN. Simplemente es producto de la variación resultante del procesamiento de cada muestra. Cabe señalar que debido al hecho de que no haya disminución en la recuperación de ARN ni en la amplificación de los biomarcadores analizados, podemos concluir que la orina no obstaculiza el procesamiento de las células inmersas en ella, esto para el diagnóstico molecular a través de la detección de estos biomarcadores.

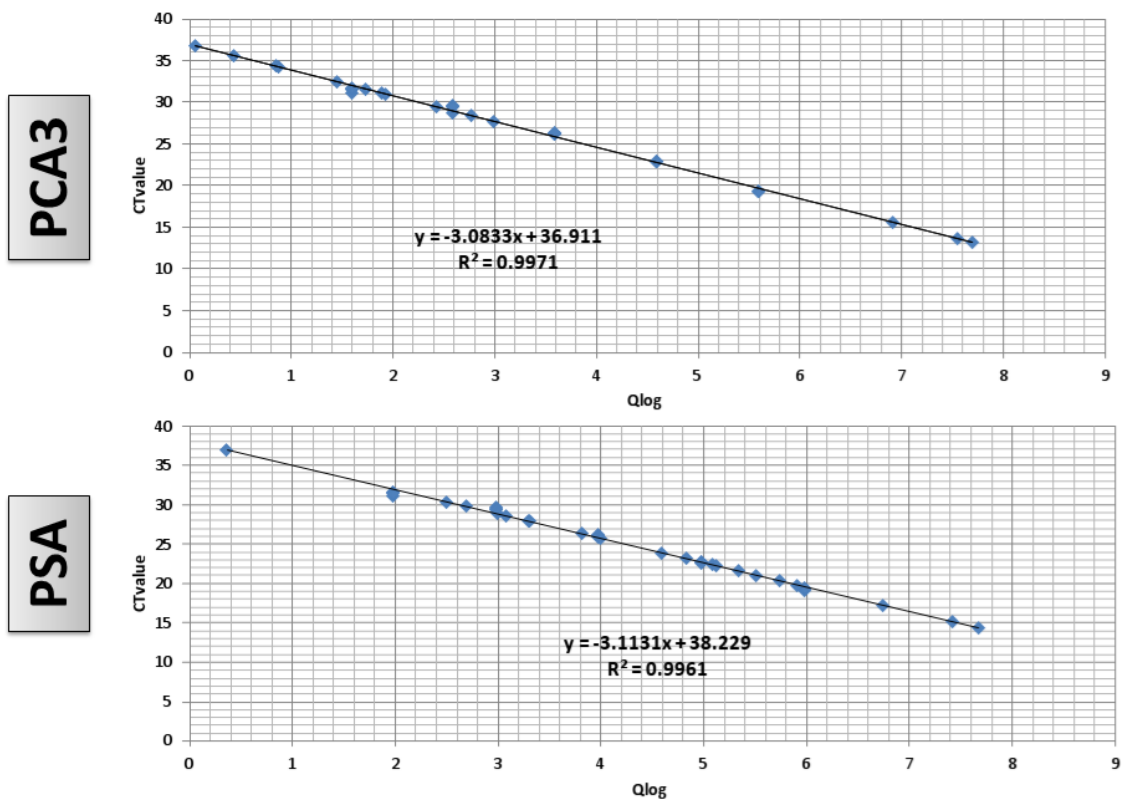


Fig. 25. Gráficas de regresión lineal de PCA3 y PSA. Las gráficas fueron hechas con los datos obtenidos del números de copias de cada biomarcador en orina y en medio de cultivo RPMI 1640.

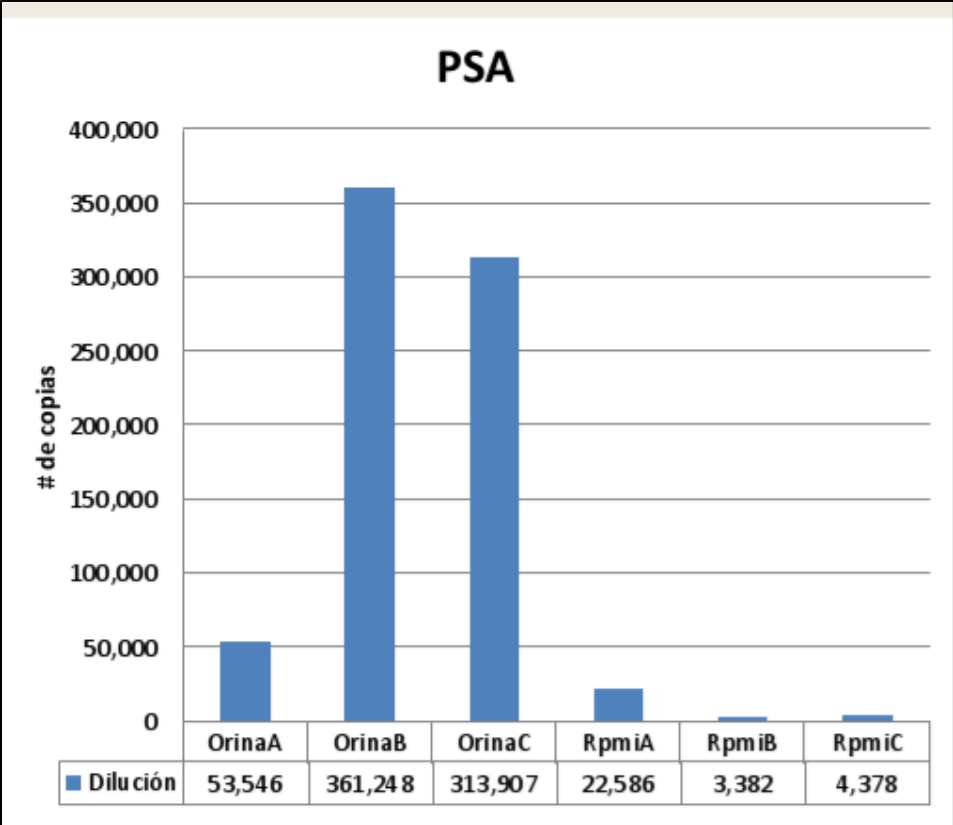
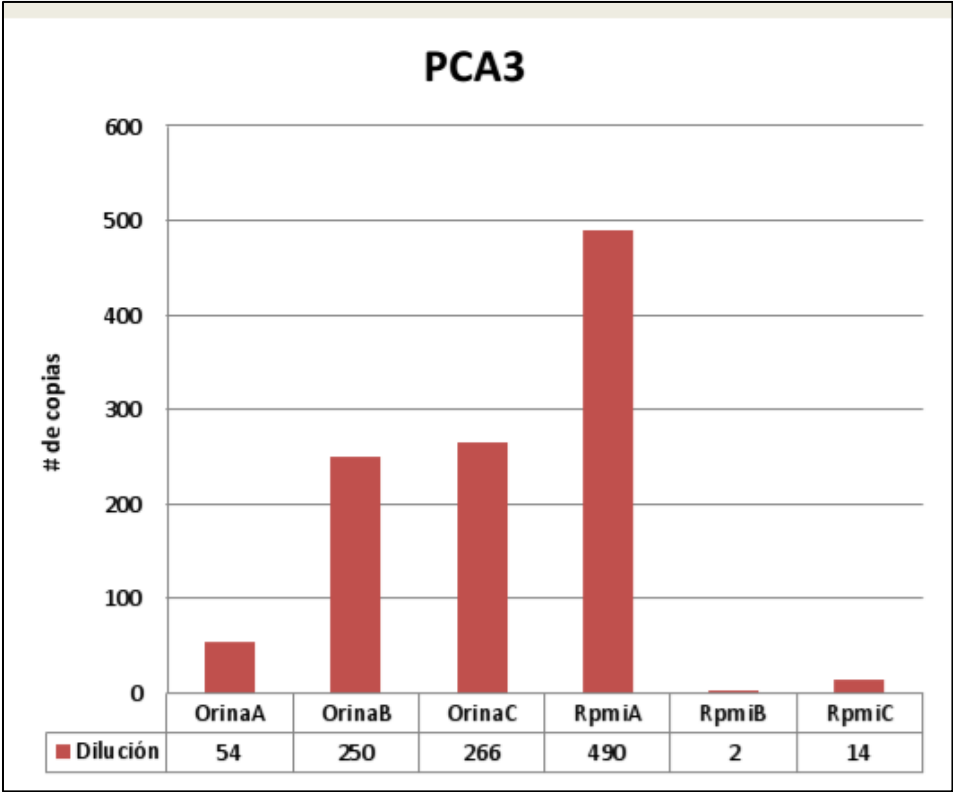


Fig. 26. Gráficas de barras de número de copias. La gráfica con barras color rojo representa el número de copias de PCA3 determinado a partir de células en orina y en medio de cultivo RPMI 1640. La gráfica con barras color azul representa el número de copias de PCA3 determinado a partir de células en orina y en medio de cultivo RPMI 1640.

5.3 Objetivo 3: Análisis de la expresión de PCA3 y PSA en muestras de tejido de pacientes con CaP y con HPB

Para determinar el número de copias en tejido se seleccionaron 10 biopsias tumorales de cáncer de próstata y 8 inclusiones de hiperplasia prostática benigna. Las biopsias se cortaron y pesaron para utilizar 25 mg como máximo de cada muestra. Se procedió a realizar la extracción de ARN en una columna de extracción en fase sólida. Los ácidos nucleicos se trataron con ADNasa mientras estaban en la columna y el ARN se eluyó en 12 μ L de agua libre de nucleasas. Las soluciones con el ARN total fueron cuantificadas con Nanodrop 2000 para analizar la calidad del ARN extraído (**Figura 27**), así como la concentración y la pureza del ARN en relación a la cantidad de proteínas y sales en solución (**Tabla 2**).

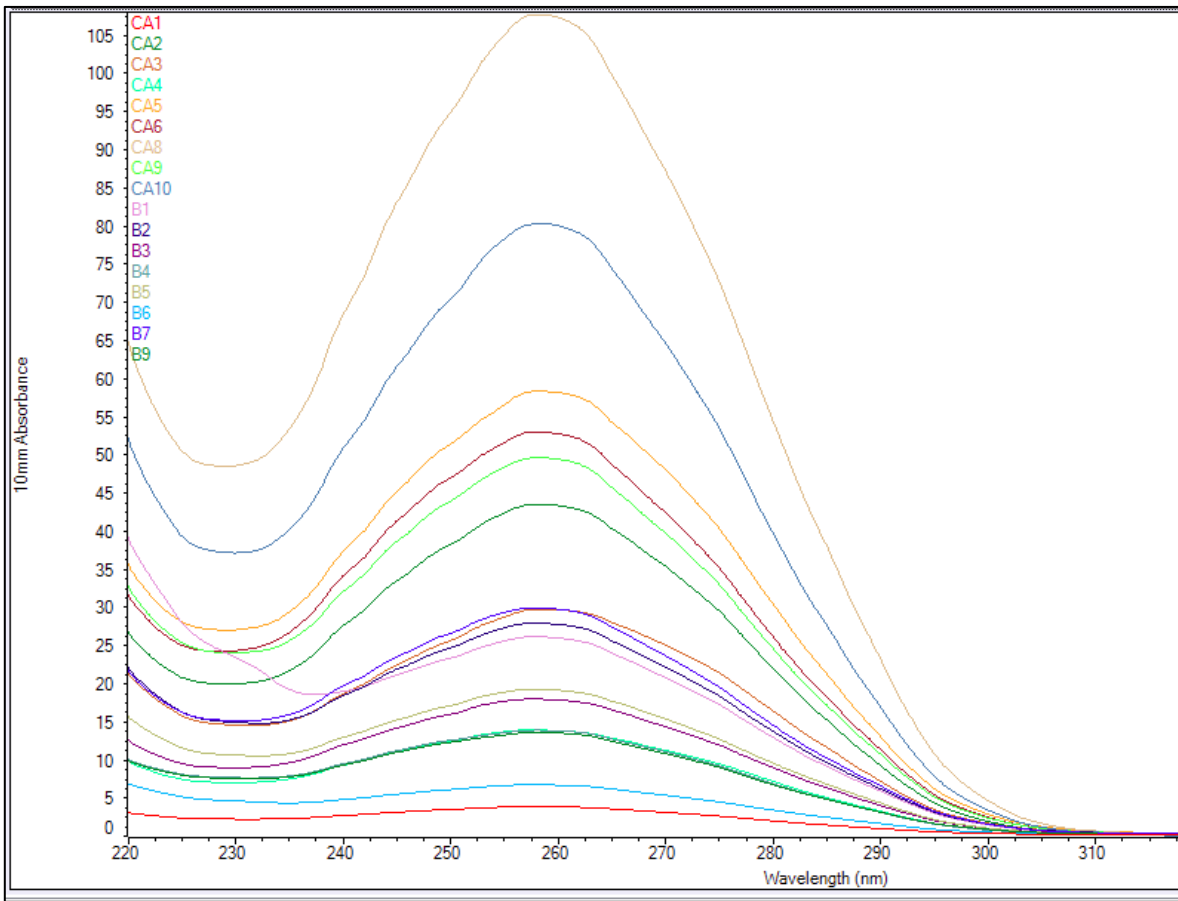


Fig. 27. Gráficas de absorbancia en diferentes longitudes de onda de extracciones de tejidos. Curvas de extracciones de ARN a partir de muestras de tejido de cáncer de próstata (CA) e hiperplasia prostática benigna (B).

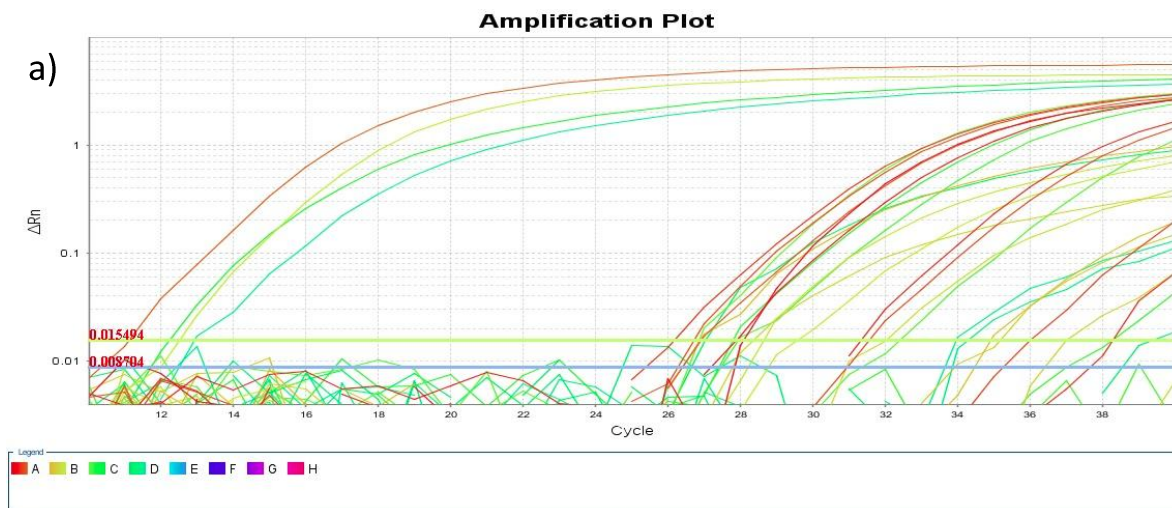
Tabla 2. Concentración de ARN obtenido de tejidos incluidos en parafina

Muestra*	Concentración [ng/μl]	260/280	260/230
CA1	147.7	1.98	1.77
CA2	1730.8	1.97	2.18

CA3	1182.9	1.81	2.05
CA4	547.5	1.93	1.98
CA5	2324.5	1.91	2.16
CA6	2107.6	2.01	2.18
CA7	7807.6	1.9	2.19
CA8	4296.1	1.96	2.21
CA9	1975	2.01	2.06
CA10	3202.5	2.01	2.16
B1	1034.6	2.01	1.11
B2	1106.3	2.02	1.87
B3	709.3	1.99	2.01
B4	547.3	2.02	1.82
B5	760.5	2	1.81
B6	261.9	2	1.46
B7	1186.1	2.05	1.97
B9	536	2.02	1.8

*CA. Cáncer de próstata, B. Hiperplasia prostática benigna.

Todas las extracciones presentaron relaciones 260/280 superiores a 1.8 y al menos 15 de las 18 muestras resultaron por encima de 1.8 en la relación 260/230. A partir de cada muestra se retrotranscribieron 2.5 µg de ARN total por duplicado para después utilizar 500 ng de ADNc para amplificar. Las gráficas logarítmicas de amplificación muestran evidencia de expresión de ambos biomarcadores en las muestras de cáncer de próstata (**Figura 28a**), pero no se muestra expresión de PCA ni de PSA en las inclusiones de hiperplasia prostática benigna (**Figura 28b**). Además, es evidente que PCA3 se expresó hasta 18 veces más que PSA en las muestras de CaP.



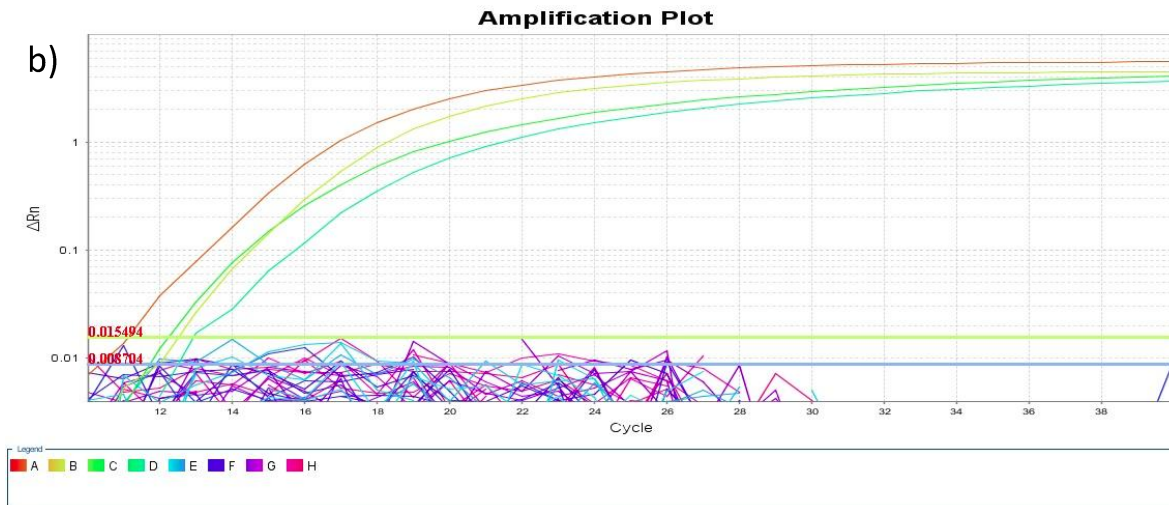


Fig. 28. Gráficas de amplificación logarítmicas de los biomarcadores analizados en tejido. a) Curvas de amplificación que representan la expresión de PCA3 y PSA en muestras de CaP. Los controles positivos cruzaron el umbral antes del ciclo 14 en ambos casos. b) Curvas de amplificación de PCA3 y PSA en las muestras de hiperplasia prostática benigna.

Se calculó el número de copias para PCA3 y PSA en cada muestra de CaP (Figura 30). El número de copias de PCA3 ($X = 1093.66$, $\sigma = 1609.66$) superó al de PSA ($X = 1088.77$, $\sigma = 1061.18$) en las muestras CA2 (1250 de PCA3 vs 94 de PSA), CA6 (2346 de PCA3 vs 292 de PSA), CA9 (1996 de PCA3 vs 286 de PSA) y CA10 (2523 de PCA3 vs 1234 de PSA). Esto significa que se ha detectado una sobreexpresión de PCA3, debido a que este biomarcador se encuentra en mayor proporción (hasta 18 veces más que PSA). El resultado de la prueba de U de Mann-Whitney resultó en una diferencia significativa entre la expresión de PCA3 ($p < 0.01$) y PSA ($p < 0.01$) de las muestras de CaP en comparación con las HPB.

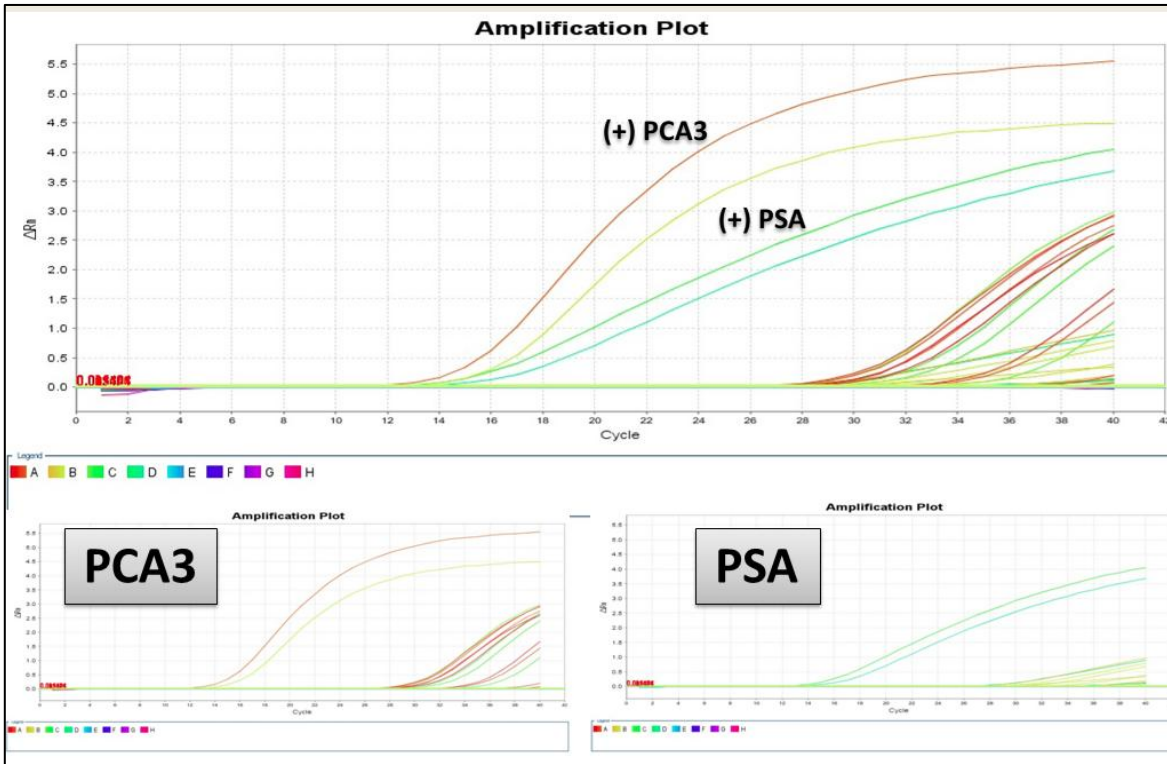


Fig. 29. Gráficas lineales de amplificación de PCA3 y PSA en tejido prostático incluido en parafina. Se indican las curvas de los controles positivos "(+)", abajo se presentan las curvas para cada transcrito.

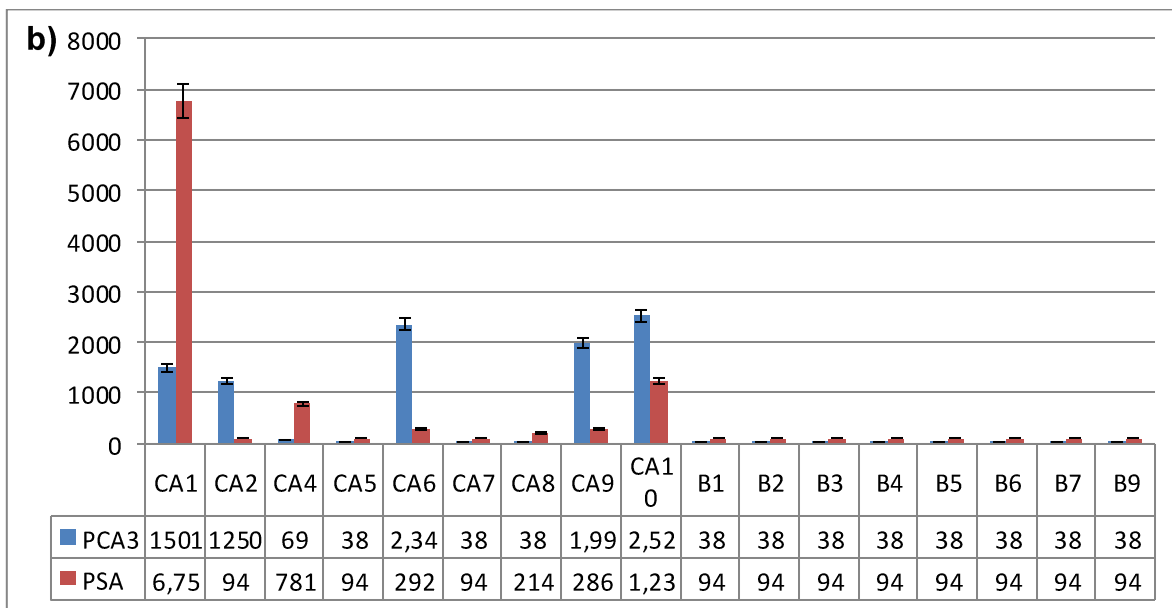
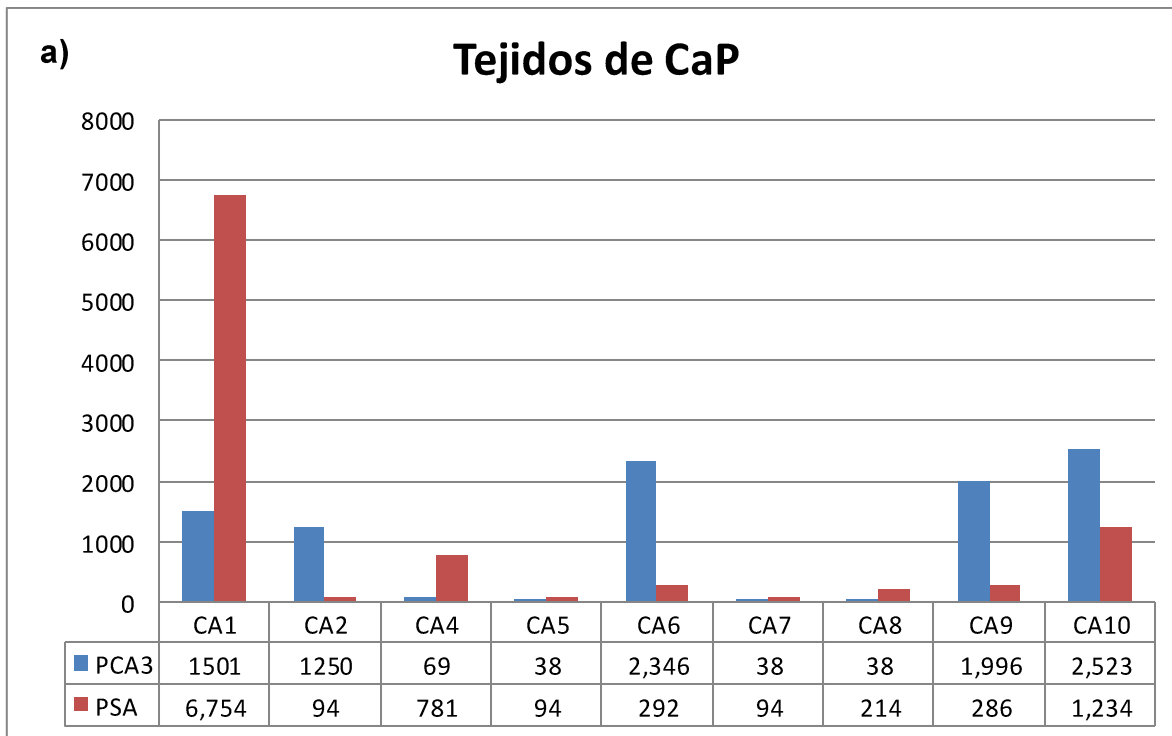


Fig. 30. Gráficas de barras de número de copias de PCA3 y PSA en tejido prostático. Las barras azules representan el número de copias en PCA3. Las barras rojas representan el número de copias de PSA. a) Las muestras "CA#" son de tejidos tumorales de CaP. Las muestras CA2, CA6, CA9 y CA10 muestran incluso una mayor expresión de PCA3 con respecto a PSA. b) Comparación de

gráficas de barras de muestras de CaP y HPB. Las muestras "B#" corresponden a tejidos de HPB, el número de copias en todas estas muestras fueron inferiores al límite inferior del rango de la curva de calibración (menos de 38 copias en PCA3 y menos de 94 copias en PSA).

Capítulo VI - Discusión

El diagnóstico de las afecciones en general ha mejorado significativamente conforme avanza la ciencia y la tecnología. Esto ha propiciado que la medicina ponga cada vez más énfasis en la prevención de las enfermedades que en la cura de las mismas (Clarke, 1974). En algunos casos los síntomas de un padecimiento, aparecen demasiado tarde para proporcionar un tratamiento adecuado al paciente. Esto es especialmente cierto en los casos de cáncer, en los cuales el pronóstico es optimista si la enfermedad es diagnosticada y tratada en un estadio temprano (NCI, 2019).

A pesar de su incidencia, el cáncer de próstata sufre el fenómeno de sobrediagnóstico, este representa un escenario poco frecuente entre las afecciones potencialmente mortales (Klotz, 2013). El sobrediagnóstico es un concepto relativamente reciente que se ha difundido cada vez con mayor frecuencia desde la segunda mitad del siglo pasado (Singh, et al., 2018). El sobrediagnóstico de cáncer es un fenómeno que ha provocado polémica en el campo de la medicina preventiva, y a menudo se ve como un problema que debe solucionarse (Esserman & Thompson, 2010) con la mejora de las estrategias clínicas. El tamizaje de CaP ha ayudado a prevenir una cantidad inmensurable de muertes desde su existencia. Sin embargo los exámenes de detección como la prueba de PSA y el TDR son capaces de dar origen a falsos positivos (NIC, 2020).

Las consecuencias del diagnóstico confirmatorio a través de la toma de una biopsia transrectal (Loeb, et al., 2013), los efectos adversos a nivel psicológico (Fowler, et al., 2006) y las complicaciones que se derivan del sobretreatmento (Klotz, 2013) son razones suficientes para mejorar el diagnóstico presuntivo de la enfermedad. El esfuerzo para solucionar este problema, se ha focalizado en desarrollar nuevos métodos diagnósticos cada vez menos susceptibles a discrepancias por errores técnicos. O bien, se trata de implementar métodos que no se encuentren sujetos a la subjetividad del encargado de evaluar la muestra. Esto ha generado una gran cantidad de modelos que buscan integrar la combinación ideal de biomarcadores para lograr un pronóstico preciso de la enfermedad (Van Neste, et al., 2016).

No hay duda de la importancia de la búsqueda de biomarcadores en orina, cómo una alternativa menos invasiva para el tamizaje de CaP. Para sumarnos a estos esfuerzos, nos propusimos realizar un abordaje previo en los tejidos de pacientes con CaP, para poder establecer información base que pudiera servir para una segunda etapa del proyecto. Para esto, utilizamos a PCA3 por sus antecedentes de sobreexpresión específica en tejido de CaP (Bussemakers, 1999). Se generaron curvas de calibración para cuantificar mediante RT-qPCR el ARNlnc PCA3 y el ARNm de PSA. El rango de una centena a un millón de copias para la cuantificación de estos biomarcadores es común. Aunque en el caso de los primers utilizados para esta tesis, la eficiencia de amplificación (111 y 109% para PCA3 y PSA respectivamente) ha resultado ser similar al compararla incluso con

proyectos de validación de protocolos de RT-qPCR para cuantificar PCA3 y el ARNm de PSA en orina (101.5%, PCA3 y 113.6% PSA) (Wang, et al., 2017). Los coeficientes de correlación obtenidos de la regresión lineal con los datos de la amplificación (0.9905 para la curva de PCA3 y 0.9899 para PSA) son adecuados para estimar de forma adecuada el número de copias de los transcritos analizados (Navidshad, et al., 2012). Las curvas de calibración nos permitieron cumplir con los objetivos posteriores.

En cuanto a los resultados de la extracción de ARN a partir de cultivo celular, la pureza de cada muestra determinada con Nanodrop 2000, fue óptima para su análisis posterior, obteniendo valores superiores a 1.8 en la relación 260/280 en 17 de 20 lecturas. A pesar de esto, la relación 260/230 no presentó ningún valor superior o igual a 1.8. Sin embargo, se ha reportado que esto puede variar dependiendo del método de extracción utilizado (Van Peer, 2012). Otros grupos de investigación han realizado extracciones con TRIzol y han obtenido ARN suficiente para amplificar PCA3 (Li, et al., 2018). Aunque se han encontrado reportes de extracciones a partir de orina completa acoplada a métodos de captura con nanopartículas (O'Malley, et al., 2017). Es probable que la fuente y el método de extracción afecte los resultados de forma significativa, y explique parcialmente las discrepancias entre estudios con protocolos similares (Eskra, et al., 2019). El número de copias también está sujeto a la eficiencia de amplificación de los primers (Wang, 2017), aunque la eficiencia obtenida de los datos de la curva de calibración es satisfactoria (mayor a 95%). En este caso, la variación en

el número de copias obtenido de las diluciones del cultivo celular puede deberse a la manipulación de las células en cultivo y las muestras diluidas (Glaysher, et al., 2012).

Las cuantificación del ARN total por espectrofotometría de las muestras de tejido dio como resultado variaciones que dependen de la masa de la muestra original, así como su grado de celularidad (Samadani, 2015). La relación 260/280 de las alícuotas de ARN total es mayor de 1.8 en todas las muestras. Y la relación 260/230 muestra que 15 de 18 muestras presentan una proporción mayor a 1.8. Lo cual hace evidente que las muestras procesadas con extracción en fase sólida poseen un mayor grado de pureza que las extraídas con TRzol manualmente. Sin embargo el número de copias presentó gran variabilidad e incluso, no fue posible detectar cantidades cuantificables de los biomarcadores en las muestras de HPB. Esto significa que hemos encontrado hasta 60 veces más expresión de PCA3 (muestras CA6 y CA10) en biopsias tumorales comparado con tejido prostático sano, esto es incluso mayor que el reporte original (Bussemakers, 1999) y reportes más recientes (Floriano-Sánchez, 2009). Normalmente PSA se encuentra en mayor proporción y debe ser de al menos 35 veces la cantidad de PCA3 en orina para que se considere que el paciente no necesita una biopsia. Sin embargo, conforme la expresión de PCA3 se acerca a la del PSA, el paciente presenta un mayor riesgo de tener cáncer de próstata. Interesantemente, se ha mostrado evidencia de la existencia del efecto de campo en CaP en tejido (Nonn, et al., 2009) e incluso se ha tratado de dar una aplicación clínica a este conocimiento

(Trujillo, et al., 2012). El efecto de campo puede ser aprovechado para detectar CaP en próstatas que poseen tumores que no están al alcance del TDR o el BTR. Y se ha encontrado una sobreexpresión de PCA3 (y otros biomarcadores) en células aparentemente sanas (Popa, et al., 2007). El diagnóstico del paciente a través de la biopsia por el patólogo y los análisis moleculares, no es mutuamente excluyente y podría complementarse.

Además de la búsqueda de nuevos biomarcadores, se requiere el desarrollo de nuevos modelos estadísticos para evaluar su utilidad clínica en condiciones reales. Se sabe que uno de los factores más importantes para evaluar el riesgo de desarrollar enfermedades es la variabilidad étnica (Waters, et al., 2009). Incluso, se ha encontrado variabilidad en la utilidad de biomarcadores de CaP en orina dependiendo de la ascendencia del paciente (O'Malley, 2017). Recientemente la PCPT-RC ha añadido la variable "raza" para calcular el riesgo de desarrollar CaP. Y posteriormente se actualizó para que los investigadores puedan elegir la "raza hispana" en la PCPT-RC (Ankerst, et al., 2014). Con el afán de mejorar la utilidad clínica de los biomarcadores de CaP, se han desarrollado modelos matemáticos que incluyen biomarcadores y parámetros clínicos tradicionales (Van Neste, et al. 2016). Sin embargo, estos modelos han sido implementados en poblaciones con más del 95% de pacientes caucásicos. Ya se ha demostrado que la utilidad clínica de estos biomarcadores disminuye en pacientes de ascendencia africana y la población de Latinoamérica ha demostrado poseer una gran diversidad genética (Belbin, et al., 2018). Es por eso que por ahora se desconoce la utilidad clínica de

los modelos recientemente desarrollados y los nuevos biomarcadores urinarios en México, e hispanohablantes en general.

Últimamente, el enfoque de los nuevos métodos de diagnóstico es considerar que el cáncer es una enfermedad causada por múltiples factores, esto implica un monitoreo de distintos parámetros en los pacientes. No sólo es necesario identificar un biomarcador que nos permita distinguir un paciente de un sujeto sano, sino que es necesario utilizar distintos biomarcadores en conjunto con el juicio clínico tradicional para obtener un diagnóstico más acertado (Tombal, 2013).

6.1 Conclusiones

Se generó la curva de calibración para la cuantificación del número de copias de PSA y PCA3 utilizando un g-Block, y se probó su utilidad en líneas celulares de CaP.

Se demostró la expresión de PCA3 y PSA en muestras de tejidos de cáncer de próstata, mientras que la expresión de ambos no fue detectada en pacientes con hiperplasia prostática benigna.

Se comprobó que PCA3 es un biomarcador que se expresa en tejidos de cáncer de próstata de pacientes del noreste de México.

6.2 Perspectivas

En esta tesis se esperaba poder comparar la expresión de PCA3 y PSA en muestras de CaP y HPB. Esto sirve como evidencia de la sobreexpresión de PCA3 y PSA en tejido canceroso respecto al tejido sano (considerando a la HPB como un proceso que ocurre naturalmente conforme el varón envejece) y marca la pauta para seguir investigando biomarcadores similares para cáncer de próstata, con el objetivo de desarrollar modelos que nos permitan disminuir el número de biopsias innecesarias, o incluso diagnosticar al paciente sin necesidad de realizar una biopsia.

Se debe incrementar el tamaño de la muestra para determinar la sensibilidad y especificidad del método, y confirmar la utilidad del PCA3 en las decisiones médicas.

También proponemos utilizar métodos de enriquecimiento y/o métodos de detección alternativos (columnas de extracción en fase sólida, captura con nanopartículas PCR anidado, entre otros) para mejorar la sensibilidad y la especificidad, además de evaluar su utilidad en orina de pacientes.

Finalmente, consideramos combinar el número de copias de PCA3 y PSA con otros marcadores, y evaluar el impacto en el tamizaje del CaP.

Capítulo VII - Referencias

Albers DD, McDonald JR, Thompson GJ. (1949). Carcinoma cells in prostatic secretions. *J. Am. Med. Assoc.* 1949; 139: 299–303.

Albertsen PC, Moore DF, Shih W, et al.: Impact of comorbidity on survival among men with localized prostate cancer. (2011) *J Clin Oncol* 29 (10): 1335-41.

Alberts AR, Schoots IG, Roobol MJ. (2015). Prostate-specific antigen-based prostate cancer screening: past and future *Int. J. Urol.*, 22 (6), pp. 524-532

Albitar M, Ma W, Lund L, Albitar F, Diep K, Fritsche HA, Shore N. (2016). Predicting Prostate Biopsy Results Using a Panel of Plasma and Urine Biomarkers Combined in a Scoring System. *J Cancer.* 2016; 7(3):297-303.

Ankerst, D. P., Hoefler, J., Bock, S., Goodman, P. J., Vickers, A., Hernandez, J., Sokoll, L. J., Sanda, M. G., Wei, J. T., Leach, R. J., & Thompson, I. M. (2014). Prostate Cancer Prevention Trial risk calculator 2.0 for the prediction of low- vs high-grade prostate cancer. *Urology*, 83(6), 1362–1367. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2014.02.035>

American Joint Committee on Cancer (AJCC). (2018). *AJCC Cancer Staging Manual*. Springer International Publishing. Octava ed.

American Cancer Society. *Facts & Figures 2020*. American Cancer Society. Atlanta, Ga. 2020.

Belbin GM, Nieves-Colón MA, Kenny EE, Moreno-Estrada A, Gignoux CR. (2018). Genetic diversity in populations across Latin America: implications for population and medical genetic studies. *Curr Opin Genet Dev.* 53: 98–104. pmid:30125792

Blank A & Dekker CA. (1981). Ribonucleases of human serum, urine, cerebrospinal fluid, and leukocytes. Activity staining following electrophoresis in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels. *Biochemistry*. 1981 Apr 14;20(8):2261-7.

Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, Debruyne FM, Ru N, Isaacs WB. (1999). DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res*. 1999 Dec 1; 59(23):5975-9.

Burgio SL, Conteduca V, Rudnas B, Carrozza F, Campadelli E, Bianchi E, Fabbr Pi, Montanari M, Carretta E, Menna C, De Giorgi U. (2015). PSA flare with abiraterone in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer. *Clin. Genitourin. Cancer*, 13 (1), pp. 39-43

Chan, T. Y., Partin, A. W., Walsh, P. C., & Epstein, J. I. (2000). Prognostic significance of Gleason score 3+4 versus Gleason score 4+3 tumor at radical prostatectomy. *Urology*, 56(5), 823–827. [https://doi.org/10.1016/s0090-4295\(00\)00753-6](https://doi.org/10.1016/s0090-4295(00)00753-6)

Cancer Staging. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Actualizado el 9 de marzo de 2015. (<https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-treatment-pdq>). Consultado en mayo de 2020.

Clarke E. A. (1974). What is Preventive Medicine?. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 20(11), 65–68.

Daniel W Chan, Lori J Sokoll, WHO First International Standards for Prostate-specific Antigen: The Beginning of the End for Assay Discrepancies? (2000), *Clinical Chemistry*, Volume 46, Issue 9, Pages 1291–1292, <https://doi.org/10.1093/clinchem/46.9.1291>

de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW et al. (2002). DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res.* 2002; 62: 2695–8.

de la Taille A. (2007). Progenza PCA3 test for prostate cancer detection. *Expert Rev Mol Diagn.* 2007;7:491–497.

Descotes J. L. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian journal of urology*, 6(2), 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.ajur.2018.11.007>

Eskra, J. N., Rabizadeh, D., Pavlovich, C. P., Catalona, W. J., & Luo, J. (2019). Approaches to urinary detection of prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*, 22(3), 362–381. <https://doi.org/10.1038/s41391-019-0127-4>

Esserman, L., & Thompson, I. (2010). Solving the overdiagnosis dilemma. *Journal of the National Cancer Institute*, 102(9), 582–583. <https://doi.org/10.1093/jnci/djq119>

Eastham J. (2017). Prostate cancer screening. *Investigative and clinical urology*, 58(4), 217–219. <https://doi.org/10.4111/icu.2017.58.4.217>

Fenton JJ, Weyrich MS, Durbin S, Liu Y, Bang H, Melnikow J. (2018). Prostate-Specific Antigen–Based Screening for Prostate Cancer: A Systematic Evidence Review for the US Preventive Services Task Force. Evidence Synthesis No. 154. AHRQ Publication No. 17-05229-EF-1. Rockville, MD: Agency for Healthcare Research and Quality.

Floriano-Sánchez, E., Cárdenas-Rodríguez, N., Castro-Marín, M., Alvarez-Grave, P., & Lara-Padilla, E. (2009). DD3(PCA3) gene expression in cancer and prostatic hyperplasia. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale*, 32(6), E258.

Fradet Y, Saad F, Aprikian A, Dessureault J, Elhilali M, Trudel C et al (2004) uPM3, a new molecular urine test for the detection of prostate cancer. *Urology* 64:311–315

Fujita K, Landis P, McNeil BK, Pavlovich CP. (2009). Serial prostate biopsies are associated with an increased risk of erectile dysfunction in men with prostate cancer on active surveillance. *J. Urol.* 2009; 182: 2664–9.

Fujita K & Nonomura N. (2018). Urinary biomarkers of prostate cancer. *International Journal of Urology*. Volume 25, issue 9. 770-779.

Fujita K, Pavlovich CP, Netto GJ et al. (2009). Specific detection of prostate cancer cells in urine by multiplex immunofluorescence cytology. *Hum. Pathol.* 2009; 40: 924–33.

García-García JA, Reding-Bernal A, los López-Alvarenga JC (2009). Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. *Inv Ed Med* 2013;2(8):217-224.

Garret M, Jassie M. (1976). Cytologic examination of post prostatic massage specimens as an aid in diagnosis of carcinoma of the prostate. *Acta Cytol.* 1976; 20: 126–31.

Glaysher, S., Gabriel, F. G., & Cree, I. A. (2011). Measuring gene expression from cell cultures by quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.), 731, 381–393. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-080-5_31

GLOBOCAN 2018. (2018). Cancer today. Global Cancer Observatory (<http://gco.oarc.fr>). Consultado en mayo del 2019.

Goessl C, Müller M, Heicappell R et al. (2001) DNA based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology* 2001; 58: 335–8.

Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C et al (2006) APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem* 52:1089–1095

Hamilton, W., Sharp, D. J., Peters, T. J., & Round, A. P. (2006). Clinical features of prostate cancer before diagnosis: a population-based, case-control study. *The British journal of general practice : the journal of the Royal College of General Practitioners*, 56(531), 756–762.

Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B et al (2003) DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol* 44:8–15.

Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA (2007) Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 13:5103–5108

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Actualizado en noviembre de 2016. (https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/). Consultado en julio de 2020.

Howrey, B. T., Kuo, Y. F., Lin, Y. L., & Goodwin, J. S. (2013). The impact of PSA screening on prostate cancer mortality and overdiagnosis of prostate cancer in the United States. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*, 68(1), 56–61. <https://doi.org/10.1093/gerona/gls135>

Jones, D., Friend, C., Dreher, A., Allgar, V., & Macleod, U. (2018). The diagnostic test accuracy of rectal examination for prostate cancer diagnosis in symptomatic patients: a systematic review. *BMC family practice*, 19(1), 79. <https://doi.org/10.1186/s12875-018-0765-y>

Jost M, Day JR, Slaughter R, Koreckij TD, Gonzales D, Kinnunen M et al (2010) Molecular assays for the detection of prostate tumor derived nucleic acids in peripheral blood. *Mol Cancer* 9:174

Klotz L. (2013). Prostate cancer overdiagnosis and overtreatment. *Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity*, 20(3), 204–209. <https://doi.org/10.1097/MED.0b013e328360332a>

Laxman B, Morris DS, Yu J, Siddiqui J, Cao J, Mehra R et al (2008) A first-generation multiplex biomarker analysis of urine for the early detection of prostate cancer. *Cancer Res* 68:645–649

Lee, H., Lee, M., Byun, S. S., Lee, S. E., & Hong, S. K. (2019). Evaluation of Prostate Cancer Stage Groups Updated in the 8th Edition of the American Joint Committee on Cancer Tumor-Node-Metastasis Staging Manual. *Clinical genitourinary cancer*, 17(1), e221–e226. <https://doi.org/10.1016/j.clgc.2018.10.015>

Leyten GH, Hessels D, Smit FP, et al. (2015). Identification of a candidate gene panel for the early diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res* ;21:3061–70.

Li M, Zhou D, Zhang W, Gao S, Zhou X (2018). Urine PCA3 mRNA level in diagnostic of prostate cancer. *J Can Res Ther*;14:864-6

Litwin MS, Tan HJ. The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. (2017) *JAMA*. 2017;317(24):2532–2542. doi:10.1001/jama.2017.7248

Loeb, S., & Catalona, W. J. (2014). The Prostate Health Index: a new test for the detection of prostate cancer. *Therapeutic advances in urology*, 6(2), 74–77. <https://doi.org/10.1177/1756287213513488>

Loeb, S., Vellekoop, A., Ahmed, H. U., Catto, J., Emberton, M., Nam, R., Rosario, D. J., Scattoni, V., & Lotan, Y. (2013). Systematic review of complications of prostate biopsy. *European urology*, 64(6), 876–892. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2013.05.049>

Lorente, D., Mateo, J., Perez-Lopez, R., de Bono, J. S., & Attard, G. (2015). Sequencing of agents in castration-resistant prostate cancer. *The Lancet. Oncology*, 16(6), e279–e292. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70033-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70033-1)

Malik B & Feng FY. (2016). Long noncoding RNAs in prostate cancer: overview and clinical implications. *Asian J Androl*. 2016 Jul-Aug; 18(4):568-74.

Martignano F, Rossi L, Maugeri A, et al: Urinary RNA-based biomarkers for prostate cancer detection. *Clin Chim Acta* 473: 96-105, 2017.

Navidshad, B., Liang, J. B., & Jahromi, M. F. (2012). Correlation coefficients between different methods of expressing bacterial quantification using real time PCR. *International journal of molecular sciences*, 13(2), 2119–2132. <https://doi.org/10.3390/ijms13022119>

Nonn, L., Ananthanarayanan, V., & Gann, P. H. (2009). Evidence for field cancerization of the prostate. *The Prostate*, 69(13), 1470–1479. <https://doi.org/10.1002/pros.20983>

He J, Schepmoes AA, Shi T, et al. (2015) Analytical platform evaluation for quantification of ERG in prostate cancer using protein and mRNA detection methods. *J Transl Med* 13: 54, 2015.

Mengual L, Burset M, Marin-Aguilera M, Ribal MJ, Alcaraz A. Multiplex preamplification of specific cDNA targets prior to gene expression analysis by TaqMan Arrays. *BMC Res Notes*. 2008;1:21.

Mao Z, Ji A, Yang K, He W, Hu Y, Zhang Q, et al. Diagnostic performance of PCA3 and hK2 in combination with serum PSA for prostate cancer. *Medicine (Baltimore)*. 2018;97(42):e12806.

O'Malley P., et al., (2017). Racial variation in the utility of urinary biomarkers, PCA3 and T2ERG, in a large, multicenter study. *J. Urol*. July; 198 (1): 42-49.

Ouyang B, Bracken B, Burke B, Chung E, Liang J, Ho SM (2009) A duplex quantitative polymerase chain reaction assay based on quantification of alpha-methylacyl-CoA racemase transcripts and prostate cancer antigen 3 in urine sediments improved diagnostic accuracy for prostate cancer. *J Urol* 181:2508–2513; discussion 13–4

Payne SR, Serth J, Schostak M, Kamradt J, Strauss A, Thelen P, Model F, Day JK, Liebenberg V, Morotti A, Yamamura S, Lograsso J, Sledziewski A, Semjonow A. (2009). DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection. *Prostate*. 2009 Sep 1;69 (12):1257-69. doi: 10.1002/pros.20967.

PCA3 prostate cancer associated 3 [Homo sapiens (human)]. Expression. Bethesda, MD: National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. Actualizado el 7 de junio de 2020. (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/50652>). Consultado en junio de 2020.

PDQ® Adult Treatment Editorial Board. PDQ Prostate Cancer Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Actualizado el 29 de enero de 2020.

(<https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-treatment-pdq>). Consultado en mayo de 2020.

Pelayo-Nieto M., Linden-Castro E., Ramírez-Galindo I., González-Serrano A., Rembis-Ávila G., Espinosa-Perezgrovas D., Catalán-Quinto G., Guzmán-Hernández F., Morales-Covarrubias J.A., Cortez-Betancourt R. (2015). Impacto de la biopsia transrectal de próstata en la función eréctil. *Revista mexicana de urología*. Vol. 76. Núm. 2. Páginas 67-70 (Marzo - Abril 2016). DOI: 10.1016/j.uromx.2015.11.006.

Pezaro C, Woo HH, Davis ID. (2014). Prostate cancer: measuring PSA. *Intern Med J. May*;44(5):433-40. doi: 10.1111/imj.12407.

Popa, I., Fradet, Y., Beaudry, G., Hovington, H., Beaudry, G., & Têtu, B. (2007). Identification of PCA3 (DD3) in prostatic carcinoma by in situ hybridization. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 20(11), 1121–1127. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800963>

Prostate-Specific Antigen (PSA) Test (2017). National Cancer Institute. (<https://www.cancer.gov/types/prostate/psa-fact-sheet>). Consultado en mayo de 2020.

Prostate Cancer Screening (PDQ®). Bethesda, MD: National Cancer Institute. Actualizado el 20 de marzo de 2020. (<https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-screening-pdq>). Consultado en mayo de 2020.

Prostate Cancer: Screening. (2018). US Preventive Services Task Force (USPSTF). (<https://uspreventiveservicestaskforce.org/uspstf/recommendation/prostate-cancer-screening>) Consultado en marzo de 2020.

Prostate Cancer UK. (2019). Digital rectal examination (DRE). (<https://prostatecanceruk.org/prostate-information/prostate-tests/digital-rectal-examination-dre>). Consultado en enero de 2020.

Rigau M, Morote J, Mir MC, Ballesteros C, Ortega I, Sanchez A et al (2010) PSGR and PCA3 as biomarkers for the detection of prostate cancer in urine. *Prostate* 70:1760–1767

Samadani, A. A., Nikbakhsh, N., Fattahi, S., Pourbagher, R., Aghajani Mir, S. M., Mousavi Kani, N., Abedian, Z., & Akhavan-Niaki, H. (2015). RNA Extraction from Animal and Human's Cancerous Tissues: Does Tissue Matter?. *International journal of molecular and cellular medicine*, 4(1), 54–59.

Salvi S, Gurioli G, Martignano F et al. (2015). Urine cell free DNA integrity analysis for early detection of prostate cancer patients. *Dis. Markers* 2015; 2015: 1–6.

Scattoni V, Lazzeri M, Lughezzani G, et al. (2013). Head-to-head comparison of prostate health index and urinary PCA3 for predicting cancer at initial or repeat biopsy. *J Urol*;190:496–501.

Schalken J. (1998). Molecular diagnostics and therapy of prostate cancer: new avenues. *Eur Urol*. 1998; 34 Suppl 3():3-6.

Schmid M, Hansen J, Chun FK. (2015) Urinary prostate cancer antigen 3 as a tumour marker: biochemical and clinical aspects. *Adv Exp Med Biol*. 2015;867:277–289.

Shaw G, Price AM, Ktori E, Bisson I, Purkis PE, McFaul S et al (2008) Hedgehog signalling in androgen independent prostate cancer. *Eur Urol* 54:1333–1343

Shappell SB, Fulmer J, Arguello D, Wright BS, Oppenheimer JR, Putzi MJ (2009) PCA3 urine mRNA testing for prostate carcinoma: patterns of use by community urologists and assay performance in reference laboratory setting. *Urology* 73:363–368

Singh, H., Dickinson, J. A., Thériault, G., Grad, R., Groulx, S., Wilson, B. J., Szafran, O., & Bell, N. R. (2018). Overdiagnosis: causes and consequences in primary health care. *Canadian family physician Medecin de famille canadien*, 64(9), 654–659.

Sugiyama RH, Blank A, Dekker CA. (1981). Multiple ribonucleases of human urine. *Biochemistry*. 1981 Apr 14;20(8):2268-74.

Tanase CP, Codrici E, Popescu ID et al. (2017). Prostate cancer proteomics: current trends and future perspectives for biomarker discovery. *Oncotarget* 2017; 8: 18497–512.

Tavukcu HH, Mangir N, Ozyurek M and Turkeri L: Preliminary Results of Noninvasive Detection of TMPRSS2:ERG Gene Fusion in a Cohort of Patients With Localized Prostate Cancer. *Korean J Urol* 54: 359-363, 2013.

Tao ZQ, Shi AM, Wang, KX, Zhang, WD. (2015). Epidemiology of prostate cancer: current status. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 19 (5), pp. 805-812

Thompson, I. M., Ankerst, D. P., Chi, C., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Feng, Z., Parnes, H. L., & Coltman, C. A., Jr (2006). Assessing prostate cancer risk: results from the Prostate Cancer Prevention Trial. *Journal of the National Cancer Institute*, 98(8), 529–534. <https://doi.org/10.1093/jnci/djj131>

Thompson, I. M., Ankerst, D. P., Chi, C., Goodman, P. J., Tangen, C. M., Lucia, M. S., Feng, Z., Parnes, H. L., & Coltman, C. A., Jr. Actualizada en 2014. Prostate

Cancer Prevention Trial Risk Calculator Version 2.0. Department of Urology, University of Texas Health Science Center. (<https://riskcalc.org/PCPTRC/>). Consultado en junio de 2019.

Tinzi M, Marberger M, Horvath S, Chypre C (2004) DD3PCA3 RNA analysis in urine--a new perspective for detecting prostate cancer. *Eur Urol* 46:182–186

Tombal, B., Andriole, G. L., de la Taille, A., Gontero, P., Haese, A., Remzi, M., Speakman, M., Smets, L., & Stoevelaar, H. (2013). Clinical judgment versus biomarker prostate cancer gene 3: which is best when determining the need for repeat prostate biopsy?. *Urology*, 81(5), 998–1004. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2012.11.069>

Tosoian JJ, Ross AE, Sokoll LJ, Partin AW, Pavlovich CP. Urinary biomarkers for prostate cancer. *Urol. Clin. North Am.* 2016; 43: 17–38.

Trujillo, K. A., Jones, A. C., Griffith, J. K., & Bisoffi, M. (2012). Markers of field cancerization: proposed clinical applications in prostate biopsies. *Prostate cancer*, 2012, 302894. <https://doi.org/10.1155/2012/302894>

Understanding Cancer Prognosis. Bethesda, MD: National Cancer Institute. Actualizado el 17 de junio de 2019. (<https://www.cancer.gov/about-cancer/diagnosis-staging/prognosis>). Consultado en mayo de 2020.

Understanding Your Pathology Report: Prostate Cancer. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. American Cancer Society. Actualizado el 8 de marzo de 2017. (<https://www.cancer.org/treatment/understanding-your-diagnosis/tests/understanding-your-pathology-report/prostate-pathology/prostate-cancer-pathology.html>). Consultado en mayo de 2020.

U.S. Cancer Statistics Working Group. U.S. Cancer Statistics Data Visualizations Tool, based on November 2018 submission data (1999-2016): U.S. Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention and National Cancer Institute; www.cdc.gov/cancer/dataviz, June 2019.

Van Bokhoven, A., Varella-Garcia, M., Korch, C., Johannes, W. U., Smith, E. E., Miller, H. L., Nordeen, S. K., Miller, G. J., & Lucia, M. S. (2003). Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate*, 57(3), 205–225. <https://doi.org/10.1002/pros.10290>

Van Neste L, et al. (2016) Detection of High-grade Prostate Cancer Using a Urinary Molecular Biomarker-Based Risk Score. *Eur Urol*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2016.04.012>

Van Peer, G., Mestdagh, P., & Vandesompele, J. (2012). Accurate RT-qPCR gene expression analysis on cell culture lysates. *Scientific reports*, 2, 222. <https://doi.org/10.1038/srep00222>

Wang, T., Qu, X., Jiang, J., Gao, P., Zhao, D., Lian, X., & Li, X. (2017). Diagnostic significance of urinary long non-coding PCA3 RNA in prostate cancer. *Oncotarget*, 8(35), 58577–58586. doi:10.18632/oncotarget.17272

Waters, K. M., Le Marchand, L., Kolonel, L. N., Monroe, K. R., Stram, D. O., Henderson, B. E., & Haiman, C. A. (2009). Generalizability of associations from prostate cancer genome-wide association studies in multiple populations. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(4), 1285–1289. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-08-1142>

Wu, D et al., (2017). Urinary biomarkers in prostate cancer detection and monitoring progression. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2017 Oct;118:15-26. doi: 10.1016/j.critrevonc.2017.08.002. Epub 2017 Aug 19.

-

Xia Y, Huang C C, Dittmar R et al. (2016) Copy number variations in urine cell free DNA as biomarkers in advanced prostate cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 35818–31.

Capítulo VIII - Anexos

Anexo 1. Extracción de ARN total con Quick-RNA™FFPE Kit

A) Desparafinación

El exceso de parafina (en caso de existir) fue removido de la muestra con una espátula flameada. Después, la mitad de la muestra (hasta 25 mg) fue transferida a un vial estéril. Para realizar la extracción de ARN se utilizó el kit especial para tejidos incluidos en parafina Quick-RNA™FFPE Kit (Zymo Research Corp). Se añadieron 400 µL de solución de desparafinación (contenida en el kit) al vial con la muestra, para después incubar la solución durante 1 minuto a 55 °C. Se homogeneizó con el vórtex durante 30 segundos. Luego, la solución de desparafinación se removió con una micropipeta de la muestra.

B) Digestión de tejido con proteinasa K

Al tejido desparafinado se le añadieron 95 µL de agua libre de ARNasas, 95 µL de 2X Digestion buffer (contenido en el kit) y 10 µL de proteinasa K (proporcionada en el kit). La mezcla se incubó durante 4 horas a 55 °C. Después de la digestión, el vial con la muestra fue incubado a 65 °C durante 15 minutos.

C) Aislamiento del ARN con columnas

Se añadieron 600 μ L de RNA lysis buffer (contenido en el kit) al vial y se mezclaron con el vórtex. La mezcla fue centrifugada a 16,000 g durante 1 minuto para remover restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un nuevo vial estéril. Luego se añadió un volumen de etanol (95-100%) a la muestra y se mezcló con el vórtex.

La mezcla fue transferida a una Zymo-Spin™ IICRCColumn en un vial colector (ambos proporcionados por el fabricante) y se centrifugó a 12,000 g durante 30 segundos. El líquido contenido en el vial colector fue descartado.

Se añadieron 400 μ L de RNA prep buffer (contenido en el kit) a la columna y se centrifugó de nuevo a 12,000 g durante 30 segundos. El líquido en el vial colector fue descartado. Luego se añadieron 700 μ L de RNA wash buffer a la columna y se centrifugó a 12,000 g durante 30 segundos, para descartar el líquido en el vial colector de nuevo. Nuevamente se vertieron 400 μ L de RNA wash buffer a la columna y se centrifugó durante 2 minutos para remover el buffer de lavado por completo. Finalmente, la columna fue transferida a un vial estéril, se añadieron

50 μL de agua libre de ARNasas directamente en la matriz de la columna y se centrifugó para eluir el ARN.

D) Remoción de ADNg en extracciones de ARN total

La retrotranscripción se realizó a partir de la extracción de ARN total descrita previamente, ajustando los volúmenes para una optimización de reactivos. Primero se removieron los residuos de ADN genómico de las muestras utilizando ezDNase™ Enzyme (Invitrogen™). Se preparó la mezcla de reacción para la digestión de ADNg con 0.5 μL de 10X ezDNase™ buffer, 0.25 μL de enzima ezDNase™, hasta 4.25 μL de ARN templado (con hasta 10,000 ng totales) y agua libre de nucleasas para aforar a 5 μL . Los reactivos y catalizadores fueron mezclados brevemente y la reacción se incubó a 37 °C durante 2 minutos. La ADNasa fue inactivada al incubar la mezcla de reacción a 55 °C durante 5 minutos en presencia de DTT 10 mM. Por último, el vial fue centrifugado brevemente y colocado en hielo.

Anexo 2. Retrotranscripción con SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System

Al principio, se requiere hibridar los primers al ARN templado, para esto se realizó la siguiente mezcla: 0.5 μL de hexámeros aleatorios, 0.5 μL de mezcla de dNTP (10 mM cada uno), hasta 4 μL de ARN templado (5,000 ng) y agua libre de nucleasas hasta tener un volumen final de 6.5 μL . La mezcla fue homogeneizada y centrifugada brevemente, luego se incubó a 65 °C durante 5 minutos para posteriormente ser colocada en hielo durante 1 minuto.

El buffer SSV 5X fue homogeneizado en vórtex y centrifugado brevemente. Después, la mezcla de reacción para la retrotranscripción fue preparada de la siguiente manera: 2 μL de buffer 5X SSV, 0.5 μL de solución de DTT 100 mM, 0.5 μL de inhibidor de ribonucleasas y 0.5 μL de Retrotranscriptasa SuperScript™ IV (200 U/ μL) (**Figura 31**). La mezcla fue homogeneizada, y centrifugada.

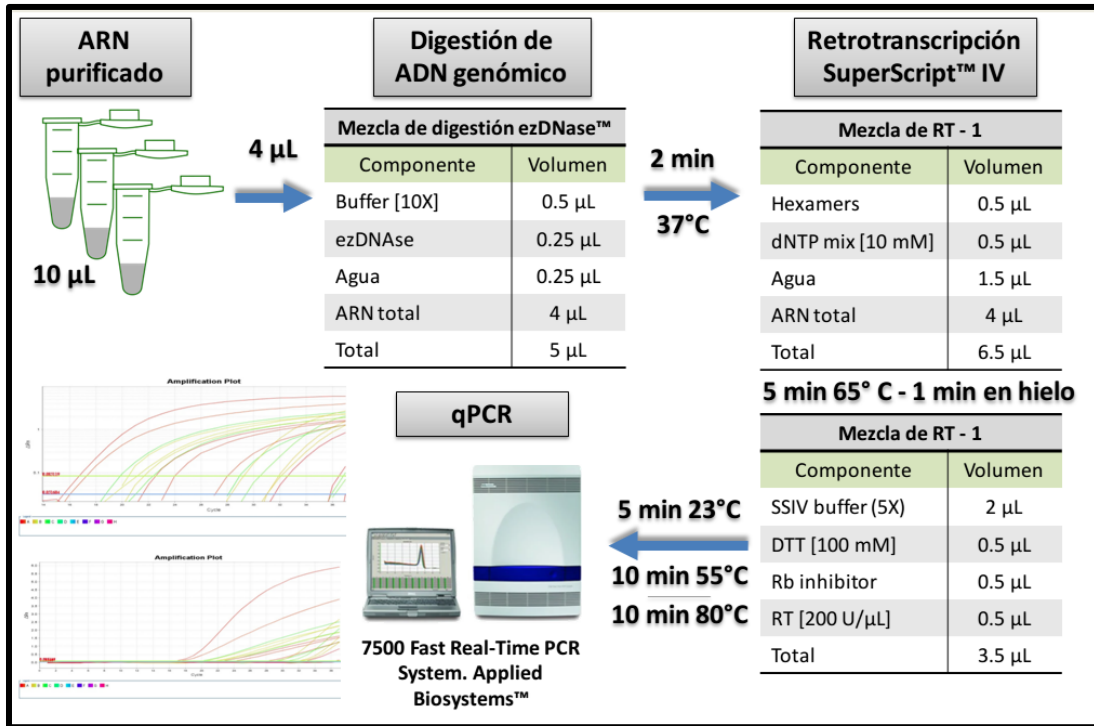


Fig. 31. Flujo de trabajo de retrotranscripción.

La mezcla de Retrotranscripción fue añadida a la solución con el ARN hibridado para posteriormente incubar la mezcla a 23 °C durante 3 minutos. Luego, la mezcla de reacción fue incubada a 50-55 °C durante 10 minutos. Después, la mezcla fue empleada inmediatamente para ser amplificada con el TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems™) en equipo 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied biosystems™)