



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Biopsias líquidas: herramientas moleculares para identificar nuevos biomarcadores candidatos para mejorar el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de próstata asociado al síndrome metabólico

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área de Ciencias Biológicas

Lic. Rocío Belén Duca

Directora de tesis: Dra. Adriana De Siervi

Consejera de Estudios: Dra. Anabella Srebrow

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET)

Buenos Aires, Diciembre 2022

RESUMEN

“Biopsias líquidas: herramientas moleculares para identificar nuevos biomarcadores candidatos para mejorar el diagnóstico y/o pronóstico del cáncer de próstata asociado al síndrome metabólico”

El cáncer de próstata (CaP) es el cáncer más común y la quinta causa de muerte por cánceres en hombres a nivel mundial. En Argentina, el CaP es el cáncer con mayor incidencia en hombres. Los factores de riesgo asociados a esta enfermedad son la edad, la raza y la historia familiar. Sin embargo, la dieta y el estilo de vida resultan factores claves en la biología y tumorigénesis del CaP. El síndrome metabólico (SM) es un desorden fisiopatológico que se caracteriza por la presencia de al menos 3 de 5 factores de riesgo metabólico: obesidad visceral, triglicéridos elevados, bajos niveles de colesterol HDL, hipertensión y niveles elevados de glucemia en ayunas. Un reciente meta-análisis reveló que el SM está asociado con un peor pronóstico, un aumento de la agresividad tumoral y una mayor tasa de recurrencia de los pacientes con CaP. Asimismo, varios estudios de nuestro grupo demostraron que la alimentación crónica de ratones con una dieta grasa (DG) genera un estado similar al SM, que impacta en el tejido adiposo y la expresión de diversos genes y miRNAs, aumentando el desarrollo y la progresión. El PSA es el biomarcador de detección por excelencia en el CaP. Sin embargo, no es específico del CaP, y sus niveles se ven aumentados ante distintas afecciones no cancerosas como hiperplasia prostática benigna (HPB) y prostatitis. Por lo tanto, surge en la clínica la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores más robustos para la detección del CaP. Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA no codificante que tienen la capacidad de circular en fluidos corporales tales como la sangre. El objetivo de este trabajo de tesis fue identificar miRNAs biomarcadores candidatos para la detección temprana del CaP. En primer lugar, a partir de modelos pre-clínicos se investigó el efecto de la DG sobre el perfil de expresión y mecanismo de acción de los miRNAs en el CaP utilizando modelos animales y humanos. Luego, se enrolaron pacientes con CaP y voluntarios sanos (VS) sin enfermedades oncológicas en distintos hospitales. Mediante

microarreglos de expresión y miRNA-Seq se identificaron 29 miRNAs aumentados en el plasma de pacientes con CaP respecto a VS. Estos resultados se validaron mediante la técnica de RT-qPCR en una cohorte de 133 (n CaP= 65 y n VS =68) pacientes y de manera *in-sílico* en una cohorte de 564 (n CaP= 282 y n VS= 282) pacientes. Finalmente, utilizando un modelo logístico se identificó una combinación de 5 miRNAs que detecta el CaP con una sensibilidad del 91,17%. Esta herramienta generada en este trabajo podría ser utilizada en la clínica como método rutinario en el control urológico anual de pacientes, sumándose al PSA y el examen digital rectal (DRE) mejorando la detección y el manejo del CaP.

Palabras claves: Cáncer de próstata, dieta grasa, biomarcadores, miRNAs, detección temprana

ABSTRACT

“Liquid biopsies: molecular tools to identify new candidate biomarkers to improve the diagnosis and/or prognosis of prostate cancer associated with metabolic syndrome”

Prostate cancer (PCa) is the most common cancer and the fifth leading cause of cancer death worldwide in men. In Argentina, PCa is the cancer with the highest incidence in men. The risk factors associated to this disease are age, race and family history. However, diet and lifestyle are key factors in the PCa biology and tumorigenesis. Metabolic syndrome (MeS) is a pathophysiological disorder characterized by the presence of at least 3 of 5 metabolic risk factors: visceral obesity, high triglycerides, low levels of HDL cholesterol, hypertension, and high fasting blood glucose levels. A recent meta-analysis revealed that MeS is associated with a worse prognosis, increased tumor aggressiveness, and a higher rate of recurrence in patients with PCa. Likewise, several studies by our group demonstrated that chronic feeding of mice with a high fat diet (HFD) generates a similar state to MeS, which impacts in the adipose tissue and also in genes and miRNAs expression, increasing tumor development and progression. PSA is the gold standard detection biomarker in PCa. However, it is not PCa specific, and its levels are increased in different non-cancerous conditions such as benign prostatic hyperplasia (BPH) and prostatitis. Therefore, the need arises in the clinic to find new and more robust biomarkers for PCa detection. MiRNAs are small non-coding RNA molecules that have the ability to circulate in body fluids such as blood. The aim of this thesis was to identify candidate biomarker miRNAs for the early detection of PCa. Firstly, from pre-clinical models, HFD effects on the expression profile and mechanism of action of miRNAs in PCa was investigated using animal and human models. Then, patients with PCa and healthy donors (HD) without oncological diseases were enrolled in different hospitals. Using microarrays and miRNA-Seq, 29 increased miRNAs were identified in the plasma of PCa patients compared to HD. These results were validated using RT-qPCR technique in a cohort of 133 (n PCa= 65 and n HD=68) patients and in a *in-silico* cohort

of 564 (n PCa= 282 and n HD= 282) patients. Finally, using a logistic regression model, a combination of 5 miRNAs that detect PCa with a 91,17% of sensitivity was identified. The tool generated in this thesis could be used in the clinic as a routine method in the annual urological control of patients, in addition to PSA and digital rectal examination (DRE), improving the detection and management of PCa.

Keywords: Prostate cancer, high fat diet, biomarkers, miRNAs, early detection

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de tesis se presenta como el resultado de tres años y medio de dedicación, compromiso, estudio, esfuerzo y sobre todo mucho trabajo. Sin embargo, este trabajo, al igual que muchos proyectos científicos, es el resultado de un trabajo en equipo en el que se vieron muchas personas involucradas. Por esta razón, a continuación dedicaré unas palabras a quienes contribuyeron no solo a mi formación científica sino también personal.

En primer lugar quiero agradecer a mi directora de tesis, la Dra. Adriana De Siervi, quien me hizo parte de su grupo de trabajo en el 2016 para realizar mi tesis de licenciatura. Dos años después, en el 2018, volvió a confiar en mí para presentarme a CONICET con este gran proyecto de tesis doctoral. A ella le agradezco enormemente porque a lo largo de estos años estuvo presente, siempre proponiendo y escuchando ideas, permitiéndome crecer a nivel profesional y personal dentro del laboratorio. Sin dudas Adriana es una gran directora de tesis, inculcando la pasión por la ciencia y permitiendo que brillen todos sus becarios en sus respectivos trabajos, siempre con palabras de aliento y apoyo, como así también una excelente persona que nos supo acompañar en lo personal, y en mi caso estos últimos años con temas de salud siempre dispuesta a ayudarme y cuidarme. De la misma forma, mis compañeras y compañeros del laboratorio también fueron un pilar fundamental en este trabajo, con quienes compartí largas jornadas de trabajo, mini crisis existenciales, festejos, risas y mucha comida (de Puerto dulce y por supuesto chipacitos). En primer lugar quiero mencionar a Pau, mi compañera de tesis de licenciatura y doctorado, con quién formamos una hermosa amistad que trascendió el laboratorio. Gracias Pau por apoyarme y ayudarme en cada toma de decisión tanto profesional como personal, gracias por estar conmigo en todo momento, por compartir crisis y estrés, como así también festejar nuestros logros y sobre todo gracias infinitas por compartir la extraña experiencia de realizar un doctorado en medio de una pandemia, fuiste sin dudas un gran apoyo estos años.

A Cin y Nico, con quienes pude trabajar durante muchos años y hoy en día tengo el lujo de llamarlos amigos. En primer lugar, gracias por las risas y payasadas constantes, por los mates a la tarde/noche con cositas ricas, por los días de música temática, los bailes

y coreografías juntos y los incontables canciones pegadizas (sin dudas son las personas más creativas que conocí en mi vida). Gracias por enseñarme distintas técnicas de laboratorio y todo lo que sabían sobre el cancer de próstata para hacer más fácil mi transición al doctorado.

A Karen y Juana, que fueron mis compañeras de doctorado este ultimo año, quienes vivieron las últimas crisis pre-entrega de tesis y festejaron conmigo los últimos logros y alegrías. Gracias por confiar en mí para ayudarlas/guiarlas durante su doctorado. Y lo más importante, gracias por su amistad y sus palabras de aliento y apoyo siempre que necesite.

A Gina, por siempre estar presente, dispuesta a prestar una oreja para escuchar, ayudando en todo lo que pueda, dando consejos, abrazos y contención de madre, siempre empujando para adelante y alentandonos a superarnos día a día. A Pao y Fla, por siempre aconsejarnos en los proyectos y compartir toda su experiencia y sus años de formación de manera desinteresada. Por último, agradecer el tiempo compartido con los más peques del grupo: Lari, Nico T, Paulita y Edu, que estuvo lleno de risas, mates y mucha comida.

Quiero agradecer también a la Dra. Claudia Lanari y al Dr. Kevin Gardner cuyo aporte en cuanto a reactivos y financiación permitió el desarrollo de gran parte de este trabajo de tesis. A los medicos/as, técnicos/as, extraccionistas y enfermeras que hicieron posible el enrolamiento de pacientes, y la toma y recolección de muestras, sin los cuales no hubiese sido posible llevar adelante parte del trabajo, y a todos los hombres que desinteresadamente se enrolaron en los proyectos de investigación, ya que fueron fundamentales para llevar a cabo este proyecto.

Más allá de la cantidad de gente involucrada para llevar adelante este trabajo, quiero reconocer a quienes desde el plano emocional, estuvieron presents apoyándome en mi Carrera y me escucharon y me dieron un abrazo cuando lo necesité.

En primer lugar a mi familia, mi mama Rosa, mi papa Ricardo y mi hermana Malena que me ayudaron e impulsaron a seguir lo que me gusta y hace muy feliz. Más que nada quiero agradecerle enormemente a mi mama que es capaz de hacer hasta lo imposible

para ayudarme, apoyarme, acompañarme y hacerme crecer como persona y profesional. Gracias Ma por bancarme en todas, por permitirme siempre ser quien soy, por nunca imponerme nada, por bancarte mi carácter fuerte, cambios de humor, mini crisis existenciales por el estrés, risas, euforia y mi personalidad inquieta que está todo el tiempo haciendo algo, estudiando algo nuevo, moviendome de acá para allá y vos siempre firme al lado mío. Sin dudas hoy soy lo que soy gracias a vos. Te amo con todo mi corazón.

Al Negro, mi novio, amigo y pareja hace 7 años y medio. Gracias por acompañarme durante más de la mitad de la carrera y todo el doctorado, por llorar conmigo las derrotas y festejar doblemente los triunfos. Gracias por llevarme muchas mañanas (muy temprano) al laboratorio, pasarme a buscar a la noche luego de jornadas de 12 hs de trabajo y cocinarme con mucho amor cuando ya no podía más del cansancio.

Una parte hermosa de mi vida la integran mis amigas y amigos. En particular quiero agradecer a mi mejor amiga de toda la vida, Suyay, que nos conocemos desde los 10 años y desde ahí nunca más nos separamos, a pesar de terminar en colegios distintos y estudiar carreras totalmente distintas. Gracias por estar siempre dispuesta a ayudarme, escucharme, sacarme una sonrisa y bancarme en todo sin juzgar. Siempre juntas listas para todo! A mis amigas/os del colegio y de toda la vida: Mica, Andre, Sofi, Flor M, Flor S, Lu, Cami, Luli y Nico que siempre estuvieron a mi lado y que a pesar de no vernos tan seguido, se que puedo contar con ustedes pase lo que pase. A mis mejores amigas de la facultad y que ahora son mejores amigas de la vida: Ani y Rochi, no encuentro palabras para describir esta amistad porque es algo tan loco y hermoso generar un vínculo así fuerte siendo grandes, pero lo que puedo decir es que son de las mejores personas que conocí de lo más lindo que me dio la facultad, gracias por estar siempre, por aconsejarme en todo, por escucharme, por quererme así de fría y ablandarme un poco, por cuidarme siempre y preocuparse por mi salud (física y mental) y lo más importante: por compartir la pasión por la comida y en particular compartir el veganismo, se que esta amistad es para siempre sin importar distancias y tiempos.

A Gonza, quién comenzó como el chico del labo de enfrente siempre con sus auriculares que te ignoraba los saludos y ahora es un gran amigo que me dejó el IBYME. Gracias por

las tardes de mate y cositas ricas o de birrita/sidra y papitas post un largo día laboral. Gracias por venir a hablarnos de cualquier cosa mientras estaba haciendo una RT de mil muestras de pacientes o una qPCR de placa entera que no se podía contaminar con nada, donde sabías que no me podía desconcentrar pero querías alegrarme el día o la tarde y desestresarme un poco. A Pri, mi amiga de la facultad y hoy en día amiga del IBYME también, con quien no nos vemos tan seguido pero sé que siempre está, para brindar un consejo de vida y también a nivel laboratorio y burocracia facultative.

Por supuesto quiero agradecer a la Scaloneta por regalarnos la última gran alegría del año: SOMOS CAMPEONES DEL MUNDO!!

Por ultimo, quiero agradecer a todos los organismos que hicieron posible que esta tesis se pudiera llevar a cabo. Al IBYME, un instituto de excelencia, por brindarme todo lo necesario para realizar este trabajo. A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA y sus docentes, por la educación académica pública y gratuita de excelencia que recibí a lo largo de tantos años. También quiero agradecer a CONICET, al Instituto Nacional del Cáncer, la ANPCyT, la Fundación Williams y la Fundación René Baron por brindar el financiamiento necesario para realizar este trabajo de tesis y permitir mi formación como doctorando. Finalmente, quiero agradecer a quienes defienden y hacen posible la educación pública y gratuita, y quienes apoyan el desarrollo de la ciencia y tecnología en este país, herramientas que permiten la inclusion y transformación social.

A mi familia, lola y moana

ÍNDICE

PUBLICACIONES.....	1
ABREVIATURAS.....	3
INTRODUCCIÓN.....	6
CAPÍTULO 1: EL CÁNCER DE PRÓSTATA	7
Características del cáncer de próstata	9
Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata	13
Etiología del cáncer de próstata.....	15
Diagnóstico del cáncer de próstata.....	19
CAPÍTULO 2: EL SÍNDROME METABÓLICO	21
Características del síndrome metabólico	22
El síndrome metabólico y el cáncer	23
El síndrome metabólico y el cáncer de próstata	24
CAPÍTULO 3: BIOSÍNTESIS DE miRNAs, MECANISMOS GENERALES DE ACCIÓN Y BIOPSIAS LÍQUIDAS	27
Biosíntesis y mecanismos generales de acción de los miRNAs.....	28
Desregulación de miRNAs en cáncer.....	31
Biopsias líquidas y el uso de miRNAs circulantes.....	34
Antecedentes del laboratorio en investigación con miRNAs	37
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	39
MATERIALES Y MÉTODOS.....	42
CAPÍTULO 1: LÍNEAS CELULARES, EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i> Y MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN	43
Condiciones de crecimiento de las líneas celulares	44
Experimentos <i>in vivo</i>	44
Microarreglos de expresión de miRNAs.....	45
CAPÍTULO 2: MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE mRNA y miRNAs	47
Aislamiento de RNA total y miRNAs.....	48
Análisis de la expresión de miRNAs por Stem-loop RT-qPCR.....	49
Análisis estadístico y representación gráfica de los resultados	56
CAPÍTULO 3: MUESTRAS DE PACIENTES, MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN DE miRNAs, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS	57

Diseño del estudio y enrolamiento de individuos.....	58
Microarreglos de expresión de miRNAs (Affymetrix)	59
Secuenciación de miRNAs	59
Desarrollo de modelos estadísticos	59
Análisis bioinformático.....	60
RESULTADOS	66
CAPÍTULO 1: LA DIETA GRASA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE oncomiRs EN TUMORES DE CÁNCER DE PRÓSTATA INSENSIBLE A ANDRÓGENOS.....	67
Descripción del modelo murino utilizado	69
La DG induce la expresión de miRNAs en xenotransplantes de PC3	69
Los miRNAs candidatos modulan vías metabólicas específicas y relacionadas con cáncer	73
Los miRNAs: hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-1207-5p y miR-5095, se encuentran aumentados en la sangre de pacientes con CaP	78
La expresión de hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p está aumentada en tumores de próstata de pacientes y en tumores metastásicos de CaP	79
Los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p son buenos biomarcadores en tejido, pero no en suero para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP	81
Hsa-miR-101-3p aumenta en exosomas aislados de sangre de pacientes con CaP	83
El hsa-miR-19b-3p está involucrado en vías de proteoglicanos en el cáncer y adhesión focal.....	85
CAPÍTULO 2: LA DIETA GRASA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE tsmiRs EN TUMORES DE PRÓSTATA SENSIBLES A ANDRÓGENOS	99
Descripción del modelo murino utilizado	100
La DG modula la expresión de miRNAs en tumores TRAMP-C1	101
Los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p se encuentran disminuidos en tumores de próstata y en tumores metastásicos de próstata.....	108
Los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p comparten varios genes blanco	113
Los miRNAs regulados negativamente por la DG modulan vías relacionadas con el cáncer	115
GOLPH3 y JUP están aumentados en tumores primarios de próstata de pacientes	118
La combinación de hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP da como resultado un buen panel de biomarcadores para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP	121
La hipermetilación del promotor hsa-miR-1-2/miR-133a-1 aumenta en CaP y se correlaciona negativamente con la expresión de los miRNAs	123
CAPÍTULO 3: LOS miRNAs CIRCULANTES SON BUENOS BIOMARCADORES PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA	127
Métodos utilizados para la identificación de miRNAs candidatos	128

Validación de los miRNAs candidatos	133
Análisis de los miRNAs candidatos en muestras de pacientes.....	138
DISCUSIÓN.....	144
La dieta grasa aumenta la expresión de oncomiRs en tumores de próstata insensible a andrógenos.....	145
La dieta grasa disminuye la expresión de tsmiRs en tumores de próstata sensible a andrógenos.....	150
Identificación de miRNAs circulantes para la detección del CaP	155
ANEXO	171
REFERENCIAS.....	194

PUBLICACIONES

Los contenidos presentes en este trabajo de tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones:

- **Duca RB***, Massillo C*, Farré PL, Graña KD, Moro J, Gardner K, Lacunza E, De Siervi A. *“Hsa-miR-133a-3p, miR-1-3p, GOLPH3 and JUP combination results in a good biomarker to distinguish between prostate cancer and non-prostate cancer patients”*. Front Oncol. 2022 Oct 26;12:997457. doi: 10.3389/fonc.2022.997457. PMID: 36387263; PMCID: PMC9641240.
- **Duca RB***, Massillo C*, Dalton GN, Farré PL, Graña KD, Gardner K, De Siervi A. *“MiR-19b-3p and miR-101-3p as potential biomarkers for prostate cancer diagnosis and prognosis”*. Am J Cancer Res. 2021 Jun 15;11(6):2802-2820. PMID: 34249429; PMCID: PMC8263646.

Los contenidos presentes en este trabajo de tesis han recibido las siguientes menciones:

- Mención al Mérito en el Premio Bienal Fundación Fiorini. **Duca RB**, Graña KD, Farré PL, Egea DY, Villoldo GM, Dimase FC, Batagelj EJ, Bayo SRM, De Siervi A. *“Detección temprana de cáncer de próstata a través de biopsias basadas en microRNAs circulantes”*. Premio Bienal Florencio Fiorini en Cáncer 2022 sobre el tema “Nuevos Desarrollos Diagnóstico y/o Terapéuticos en Cáncer”. Octubre 2022. Fundación Florencio Fiorini y La Liga Argentina de Lucha contra el Cáncer. Buenos Aires, Argentina.
- Mención mejor póster en el área de Oncología. **Duca RB**, Farré PL, Graña KD, De Siervi A. *“MiR-19b-3p and miR-101-3p: key prostate cancer oncomiRs with diagnostic and prognostic value”*. Comunicación (Póster). 66 Reunión Anual, Online, Buenos Aires, Argentina. Noviembre 2021. Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC).

Además, he participado en trabajos que dieron origen a las siguientes publicaciones de gran relevancia para mi desarrollo como doctorando:

- Farré PL, **Duca RB***, Massillo C*, Dalton GN, Graña KD, Gardner K, Lacunza E, De Siervi A. *“MiR-106b-5p: a master regulator of potential biomarkers for breast*

- cancer aggressiveness and prognosis*". Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 11135. doi:10.3390/ijms222011135.
- Massillo C*, **Duca RB***, Lacunza E, Dalton GN, Farré PL, Taha N, Piccioni F, Scalise GD, Gardner K, De Siervi A. *"Adipose tissue from metabolic syndrome mice induces an aberrant miRNA signature highly relevant in prostate cancer development"*. Mol Oncol. 2020 Nov;14(11):2868-2883. doi: 10.1002/1878-0261.12788. Epub 2020 Sep 25. PMID: 32875710; PMCID: PMC7607170.
 - Dalton GN, Massillo C, Scalise GD, **Duca R**, Porretti J, Farré PL, Gardner K, Paez A, Gueron G, De Luca P, De Siervi A. *"CTBP1 depletion on prostate tumors deregulates miRNA/mRNA expression and impairs cancer progression in metabolic syndrome mice"*. Cell Death Dis. 2019 Apr 1;10(4):299. doi: 10.1038/s41419-019-1535-z. PMID: 30931931; PMCID: PMC6443782.
 - Farré PL, Scalise GD, **Duca RB**, Dalton GN, Massillo C, Porretti J, Graña K, Gardner K, De Luca P, De Siervi A. *"CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis"*. Oncotarget. 2018 Feb 13;9(17):13848-13858. doi: 10.18632/oncotarget.24486. PMID: 29568399; PMCID: PMC5862620.

ABREVIATURAS

AACE= Asociación estadounidense de endocrinólogos clínicos.

AB= Cuerpos apoptóticos.

AGO= Argonauta

AKT= Proteína quinasa B

AMPK= Proteína quinasa adenosin 5'-monofosfato activada.

AR: Receptor de andrógenos

ARHGAP5= Proteína 5 activadora de Rho GTPasa

ARHGEF12= Factor de intercambio de nucleótidos de guanina Rho 12.

AUC= Área bajo la curva.

BCR= Recurrencia bioquímica.

CAFs= Fibroblastos asociados al cáncer.

CaG= Cáncer gástrico.

CaM= Cáncer de mama.

CaP= Cáncer de próstata.

CaPM= Cáncer de próstata metastásico.

CaV= Cáncer de vejiga.

CCP= Progresión del ciclo celular.

cDNA= DNA copia.

CI= Consentimiento informado.

CHC= Carcinoma hepatocelular

CT= Ciclo al cual cada muestra alcanza el umbral de fluorescencia automático del programa.

CTBP1= Proteína de unión al C-terminal 1.

CTCs= Células tumorales circulantes.

DAVID= Database for annotation, visualization and integrated discovery.

DC= Dieta control.

DG= Dieta grasa.

DMT2= Diabetes tipo 2.

DS= Donantes sanos.

DRE= Examen digital rectal.

EGIR= Estudio de la resistencia a la insulina.

EMT= Transición eítelio-mesenquimal.

FasL= Fas ligando.

FDA= Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos.

FDR= Tasa de descubrimiento de veces.

FRS2= Antígeno 2 relacionado con Fos

GEO= Gene expression omnibus.

GO= Gen ontology.

GOLPH3= Fosfoproteína 3 de Golgi.

GPS= Genomic prostate score.

HIF1A= Factor 1-alfa inducible por hipoxia.

HPB= Hiperplasia prostática benigna.

HR= Cociente de riesgo.

IC= intervalo de confianza.

IDF= Federación internacional de diabetes.

IMC= Índice de masa corporal.

ITGA6= Subunidad de la integrina alfa 6.

ITGB1= Subunidad de la integrina beta 1.

ITGB8= Subunidad de la integrina beta 8.

ITPR1= Receptor de inositol 1,4,5-trifosfato tipo 1.

JUP= Placoglobina de unión.

KEGG= Kyoto encyclopedia of genes and genomes.

LAMC1= Subunidad de laminina gamma 1.

LPM= Lecturas por millón.

MAPK1= Proteína quinasa 1 activada por mitógeno.

miRISC= Complejo de silenciamiento inducido por miRNAs.

miRNAs microRNAs.

mRNA= RNA mensajero

mTor= *Mechanistic Target Of Rapamycin Kinase*.

MV= Microvesículas.

MYC= *MYC Proto-Oncogene*.

NCCN= Red nacional integral del cáncer de estados unidos.

NSG= Nod Scid Gamma.

OMS= Organización mundial de la salud.

OncomiRs= miRNAs oncogénicos.

OR= Odds ratio.

OS= Osteosarcoma.

P53= Proteína tumoral P53.

PCA= Análisis de componentes principales.

PIN= Neoplasia intraepitelial prostática.

PHI= Índice de salud de la próstata.

PN= Próstatas normales.

POMP= Proteína de maduración del proteasoma.

PSA= Antígeno prostático específico.

PSMD1= Subunidad del proteasoma 26S, no ATPasa 1.

PTEN= Homólogo de fosfatasa y tensina.

qPCR= Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.

RNA= Ácido ribonucleico.

RBP= Proteína de unión al RNA.

RDX= *Radixin*.

RISC= *RNA-induced silencing complex*.

RT= Retrotranscripción.

SFB= Suero fetal bovino.

SM= Síndrome metabólico.

TA= Tejido adiposo.

TLN1= *Talin 1*.

TNA= Tejido normal adyacente.

tsmiRs= miRNAs supresores tumorales.

TSS= Sitios de terminación de la transcripción.

UTR= Región no traducible

VPP= Valor predictivo positivo.

VS= Voluntarios sanos.

WNT2B= Proteína Wnt-2b.

Xpo5= Exportina 5.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1

EL CÁNCER DE PRÓSTATA

Características del cáncer de próstata

El cáncer es una enfermedad multifactorial que consiste en el crecimiento anormal y desmedido de las células de un individuo, que se dividen de manera desregulada y adquieren la capacidad de invadir tejidos próximos y/o distantes al lugar de origen. El proceso de tumorigénesis, el cual se caracteriza por la transformación de una célula normal a una célula maligna, se desarrolla en varias etapas por medio de una acumulación de defectos en los circuitos regulatorios de las células, alterando su proliferación y homeostasis. Aquellas características claves compartidas por todos los tipos de cánceres que les permiten sobrevivir, proliferar y diseminarse han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas (Hanahan & Weinberg, 2011). Dentro de las mismas se encuentran: autoabastecimiento y mantenimiento de señales proliferativas, inmortalidad replicativa, insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento, resistencia a muerte celular programada, inducción de la angiogénesis y activación de procesos de invasión y metástasis.

El cáncer de próstata (CaP) ocurre cuando las células de la glándula prostática adquieren la capacidad de crecimiento descontrolado e invasión a nuevos tejidos. En su mayoría, esta enfermedad se presenta de forma latente e indolora sin ocasionar síntomas clínicos. Cuando la enfermedad progresa se torna más agresiva diseminándose a los tejidos cercanos como vejiga, vesícula seminal y recto y/o metastatiza a los nódulos linfáticos, hueso, pulmón u otros órganos (Schulz et al., 2003).

El CaP es considerado multifocal ya que los tumores primarios a menudo contienen múltiples focos histológicos independientes que suelen ser genéticamente distintos (Shen & Abate-Shen, 2010). Sin embargo, análisis moleculares y citogenéticos mostraron que múltiples metástasis en el mismo individuo están relacionadas clonalmente, lo que indica que el CaP avanzado sería monoclonal. Estos resultados sugieren que el CaP metastásico surge de la selección de clones individuales durante la progresión de la enfermedad, como así también como consecuencia de intervenciones terapéuticas que atacan diferencialmente células de potencial maligno variable (Shen & Abate-Shen, 2010). Por esta razón, la heterogeneidad del CaP es relevante para entender y diferenciar entre un CaP latente o más agresivo (CaP clínicamente detectable) y la

correlación entre la progresión del CaP y la edad. Si bien el CaP es una enfermedad de hombres mayores, estudios a partir de muestras de próstatas de hombres sanos jóvenes de entre 20 y 40 años, han mostrado focos histológicos de CaP, lo que sugiere que la iniciación del CaP ocurriría en edades relativamente tempranas. En base a estas evidencias, se propone a la glándula prostática como sitio de múltiples eventos de transformación neoplásica, de los cuales muchos sólo darán lugar a un CaP latente que no progresará a una enfermedad clínicamente detectable (Shen & Abate-Shen, 2010). En particular, la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) ha sido asociada en los últimos años con la tumorigénesis prostática temprana (Figura 1). La PIN es una hiperplasia ocasionada por un incremento en la proliferación de las células epiteliales. Además de la hiperplasia epitelial luminal, la PIN se caracteriza por una reducción en las células basales, agrandamiento de núcleos, atipia nuclear e hiperchromasia citoplasmática. Por lo tanto, a diferencia del cáncer de próstata cuyas células portan marcadores de células basales, en la PIN se reduce el número de células basales (Schulz et al., 2003; Shen & Abate-Shen, 2010). La PIN de bajo grado (LGPIN) evoluciona a una PIN de alto grado (HGPIN) la cual ha sido propuesta como la principal lesión precursora del adenocarcinoma de próstata (De Marzo et al., 2016) (Figura 1). Sumado a esto, la HGPIN muestra una marcada elevación de marcadores de proliferación celular (Shen & Abate-Shen, 2010). Tal como se mencionó anteriormente, el CaP suele ser multifocal y en gran parte de ellos la mayoría de los focos de cáncer latentes no sufren eventos de activación críticos que conducen a un CaP clínico o permanecen bajo supresión activa suficiente para mantener estos focos en un estado subclínico, dando como resultado un CaP indolente. Sin embargo, en otros casos, estos focos sufren cambios que llevan a un CaP clínicamente evidente (Shen & Abate-Shen, 2010).

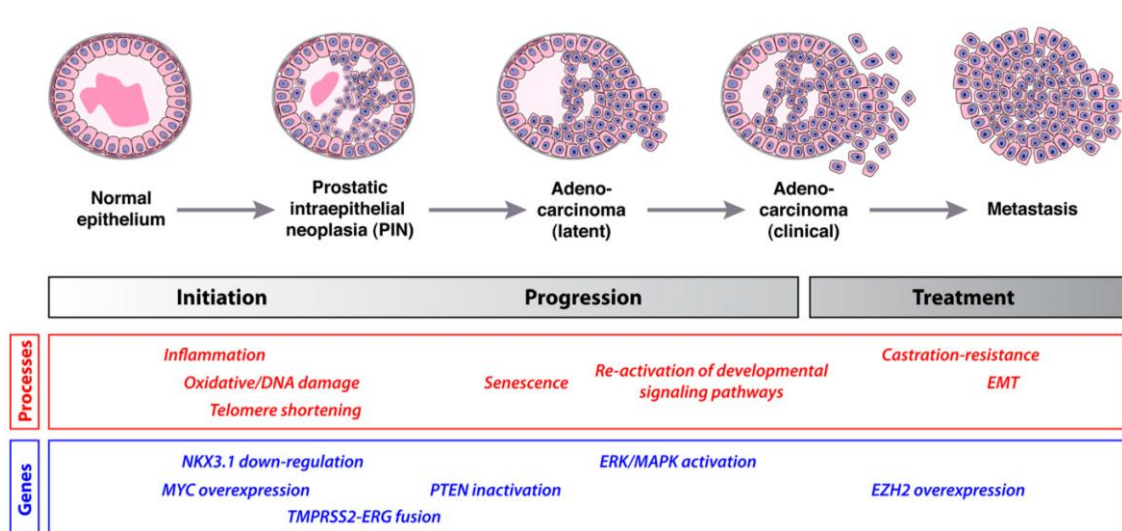


Figura 1: Esquema representativo de las etapas de desarrollo del CaP. Se muestran las etapas de progresión, junto con los procesos moleculares y genes/vías que probablemente sean significativas en cada etapa (Extraído de Shen & Abate-Shen, 2010).

A diferencia de otros tumores epiteliales, como el cáncer de mama, el CaP carece de subtipos histopatológicos distinguibles que difieran en su pronóstico o respuesta al tratamiento. La gran mayoría de los CaP corresponden a adenocarcinomas acinares que expresan al receptor de andrógenos (AR), mientras que otros subtipos de CaP como el adenocarcinoma ductal, el carcinoma mucinoso y el carcinoma de células en anillo de sello, son extremadamente raros (Shen & Abate-Shen, 2010).

El CaP se clasifica en cuatro estadios de acuerdo a la agresividad creciente del tejido (Figura 2). Muchos de los CaP corresponden a estadios I y II, que son aquellos carcinomas que conservan un patrón de crecimiento indolente, donde las células tumorigénicas se encuentran confinadas a la glándula prostática. Sin embargo, se estima que un tercio se vuelve localmente invasivo, siendo un estadio III, donde las células tumorales se extienden más allá de la cápsula del tejido, hacia las vesículas seminales. El estadio IV se caracteriza por la presencia de metástasis en los ganglios linfáticos locales y órganos distales, principalmente en hueso ocasionando lesiones osteolíticas que causan dolor y reducen la movilidad y calidad de vida de los pacientes, como así también en hígado y pulmón (Schulz et al., 2003); www.cancer.gov). Las metástasis del CaP rara vez son accesibles para el estudio, pero en general suelen ser indiferenciadas.

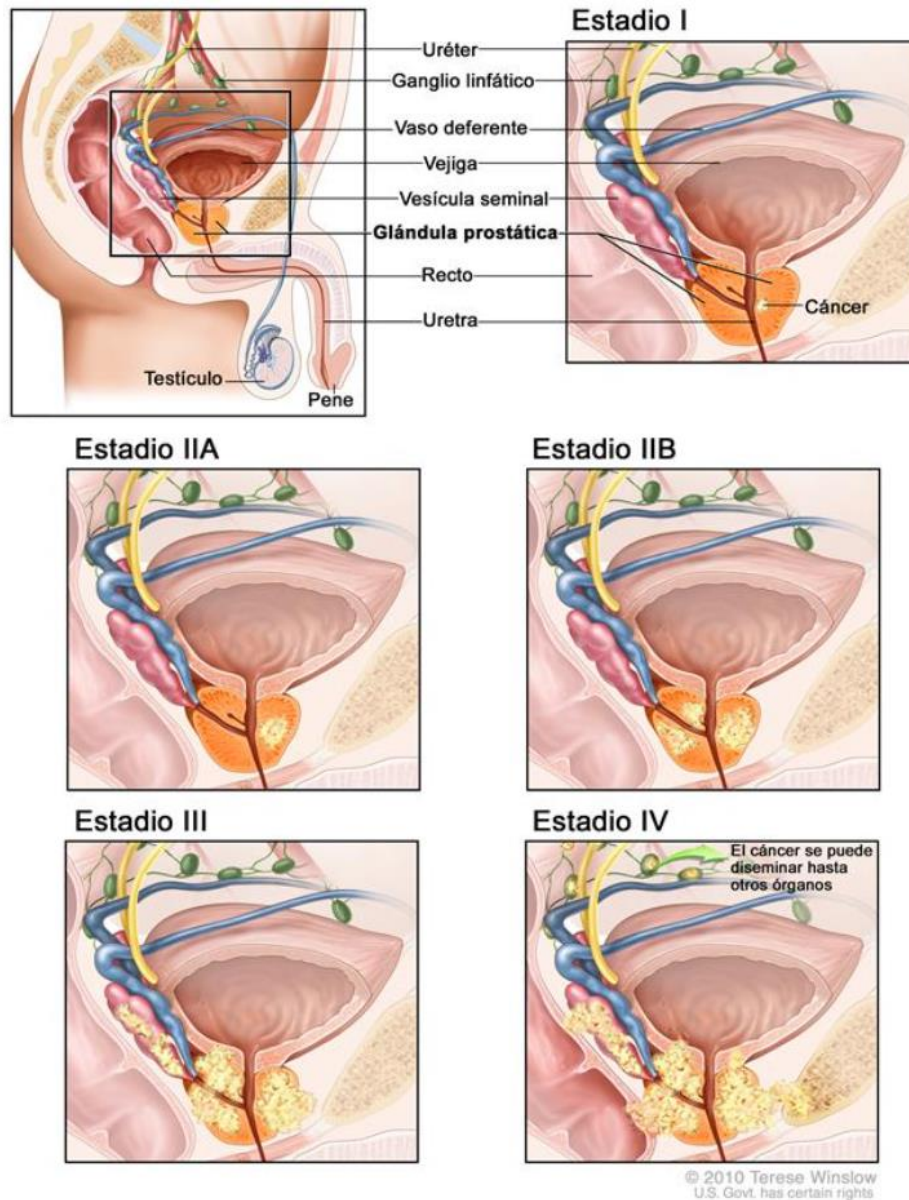


Figura 2: Ilustración de la localización del tumor de próstata y su propagación a lo largo de las diferentes etapas a las distintas regiones del organismo (Extraído del Instituto Nacional del Cáncer, Instituto Nacional de la Salud, EE.UU).

A lo largo de la progresión, la mayoría de los cánceres de próstata expresan el AR, donde una depleción de andrógenos disminuye la masa tumoral, probablemente por inducción de apoptosis y detención del crecimiento. Basado en estos conocimientos, el principal tratamiento para los CaP en estadios I a III resulta ser la terapia hormonal, también llamada ablación de andrógenos. Durante los primeros años de tratamiento los pacientes responden de manera satisfactoria, sin embargo luego de un tiempo, las

células tumorales pueden volverse resistentes al tratamiento y proliferar de manera descontrolada en ausencia de andrógenos. Cuando esto ocurre se dice que se ha llegado a un estadio final de la enfermedad, llamado cáncer de próstata independiente a andrógenos o resistente a la castración (Castration Resistant Prostate Cancer – CRPC). En este estadio los tratamientos utilizados tienden únicamente a mejorar la calidad de vida del paciente, ya que aún no se han identificado terapias eficaces para prolongar sustancialmente la sobrevida de los mismos (Schulz et al., 2003).

El cáncer de próstata también puede clasificarse según sus características histológicas a través de diferentes grados de Gleason. Este sistema se basa en la designación de un grado de 1 a 5 al patrón histológico más representativo del tumor y a la segunda morfología histológica más predominante, y luego ambo grados son sumados y reportados como el grado de Gleason del tumor (Gleason, 1966).

Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata

La tasa de mortalidad y la incidencia del CaP se encuentran disminuyendo desde 1990 a nivel mundial (Siegel et al., 2016). Sin embargo, el CaP es a nivel mundial el segundo cáncer más frecuente y la quinta causa de muerte por cáncer en hombres (Sung et al., 2021)(Figura 3). En particular, en Argentina el CaP resulta ser el cáncer con mayor incidencia (Figura 4) y la tercera causa de muerte por cáncer en hombres (Sung et al., 2021) (Figura 5).

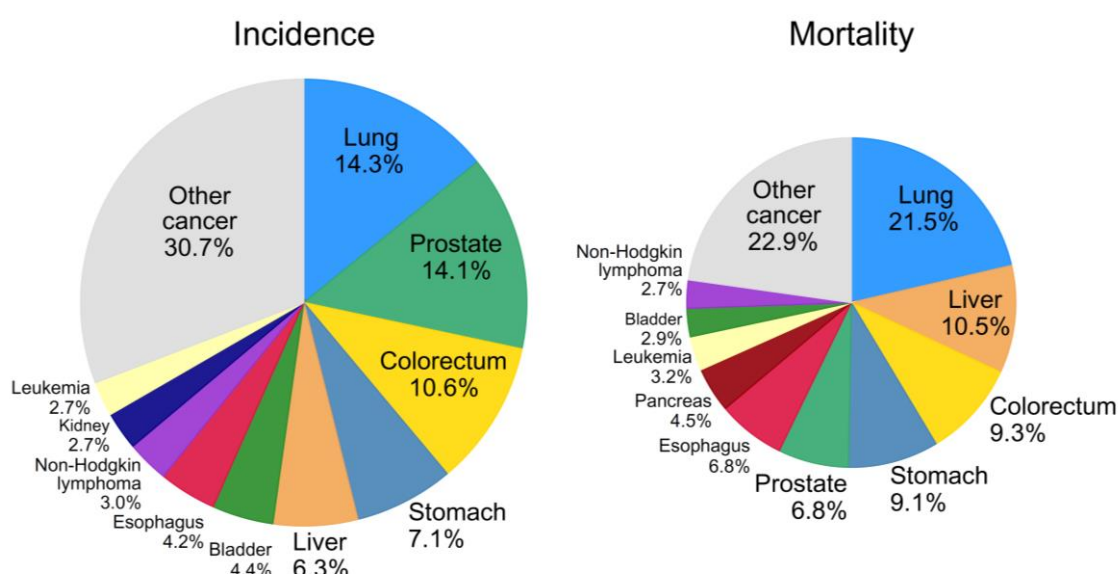


Figura 3: Distribución de casos y muertes para los 10 tipos de cánceres más comunes en 2020 en hombres a nivel mundial. El área del gráfico circular refleja la proporción del número total de casos o muertes; cánceres de piel no melanoma (excluyendo el carcinoma de células basales para la incidencia) se incluyen en la categoría “otros”. *GLOBOCAN 2020* (Sung et al., 2021).

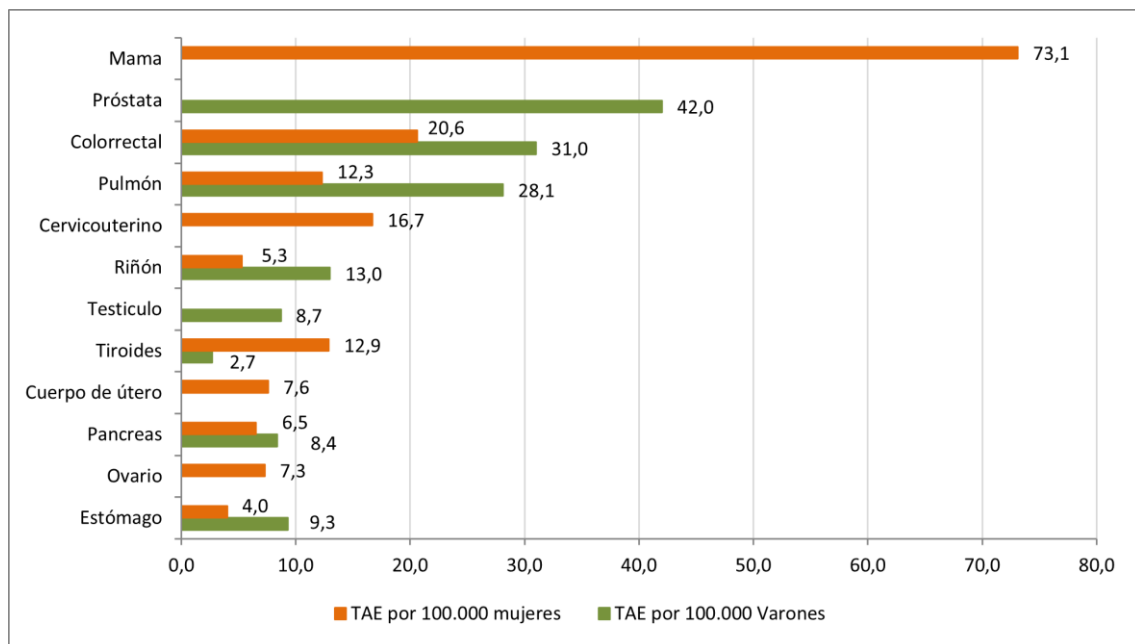


Figura 4: Tasas de incidencia por cáncer en varones y mujeres según principales localizaciones tumorales en Argentina. Tasas ajustadas por edad por 100.000 habitantes. *GLOBOCAN 2020* Adaptado de (Sung et al., 2021).

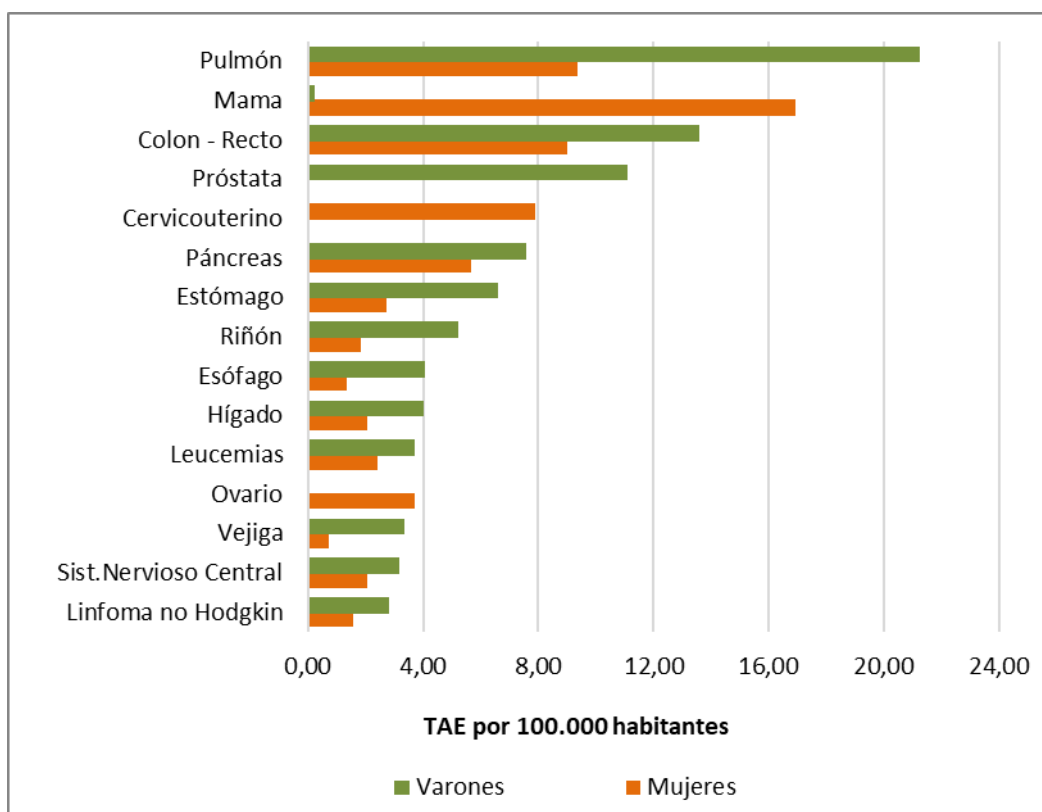


Figura 5: Tasas de mortalidad por cáncer en varones y mujeres según principales localizaciones tumorales en Argentina. Tasas ajustadas por edad por 100.000 habitantes. *GLOBOCAN 2020* Adaptado de (Sung et al., 2021).

Considerando que en Argentina y en el mundo el CaP sigue siendo un problema importante de salud pública, profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares que llevan al desarrollo de esta enfermedad permitirá identificar nuevos biomarcadores para mejorar el diagnóstico y el seguimiento de los pacientes.

Etiología del cáncer de próstata

La etiología del CaP es multifactorial. Como se mencionó anteriormente, el CaP es una enfermedad clínicamente heterogénea, donde la mayoría de los hombres tienen un CaP de crecimiento lento o indolente mientras que algunos tienen una forma agresiva de la enfermedad. La heterogeneidad clínica, en parte, se ve reflejada en la etiología subyacente de dicha enfermedad, ya que varios factores de riesgo muestran distintas

asociaciones para la enfermedad indolente en comparación con la letal (Pernar et al., 2018). Los factores de riesgo influyen en la patogenia del CaP, desde el inicio hasta la metástasis y muerte. Los factores de riesgo establecidos para la incidencia total del CaP resultan ser factores conocidos como innatos o endógenos. Dentro de ellos se encuentran la edad avanzada, la raza (Los afroamericanos tienen la tasa más alta de CaP, seguidos por los caucásicos y por último los asiáticos con la más baja) y antecedentes de CaP en la historial familiar (Matsushita et al., 2020; Pernar et al., 2018). Sumado a esto, estudios recientes asociados al genoma completo (GWAS) han mostrado evidencia de una predisposición genética al CaP (Pernar et al., 2018).

Por otro lado, varios factores exógenos o ambientales tales como la dieta, la obesidad y el tabaquismo, entre otros, están asociados con la forma agresiva y letal del CaP (Tabla 1) (Matsushita et al., 2020; Pernar et al., 2018).

Tabla 1: Evidencia de factores de riesgo asociados con el CaP avanzado o letal (Pernar et al., 2018).

Risk factor	Strength of evidence
<i>Increased risk</i>	
Taller height	Strong
Lipid levels	Possible
Obesity	Strong
Smoking	Strong
Dairy, calcium	Possible
<i>Decreased risk</i>	
Physical activity	Strong
Coffee	Limited
Tomatoes	Probable
Fish	Possible
Vitamin D	Possible
Statins	Probable

En este trabajo de tesis nos focalizaremos en los factores de riesgo ambientales, en particular en la dieta y aquellos que producen alteraciones metabólicas.

Numerosas evidencias determinaron que la dieta y los nutrientes pueden actuar como un factor de riesgo sumamente importante para el desarrollo y progresión del CaP. Estudios en animales han reportado que ciertos nutrientes, incluyendo grasas,

proteínas, carbohidratos, vitaminas (A, D y E) y polifenoles, están involucrados en la patogénesis y progresión del CaP a través de varios mecanismos, entre ellos la inflamación, efectos antioxidantes y efectos en hormonas sexuales (Tabla 2) (Matsushita et al., 2020).

Por otro lado, también es necesario considerar las interacciones y sinergias entre los factores nutricionales para determinar los efectos de las dietas sobre el CaP. En particular, el “patrón occidental” se caracteriza por un mayor consumo de carnes rojas, carne procesada, papa y productos lácteos ricos en grasas, mientras que el “patrón prudente” se compone por un mayor consumo de verduras, frutas, legumbres y pescado.

Estudios recientes compararon el riesgo de padecer CaP según los patrones dietarios mencionados anteriormente (Tabla 2). Se vio que el “patrón occidental” se asociaba con un mayor riesgo de CaP en hombres japoneses (HR= 1,22, IC del 95 %= 1,00–1,49), mientras que el “patrón prudente” fue asociado con una menor incidencia del CaP (HR= 0,71, IC 95%= 0,50-1,02) (Matsushita et al., 2020). En cuanto a la relación entre el “patrón occidental” y el CaP, varios estudios epidemiológicos han encontrado resultados similares en Argentina, Uruguay, Australia Occidental e Irán (Ambrosini et al., 2008; Askari et al., 2014; De Stefani et al., 2010; Niclis et al., 2015). Finalmente, un estudio de casos y controles de 50 hombres iraníes con CaP mostró que el “patrón prudente” redujo el riesgo de CaP, similar al estudio en Japón (Askari et al., 2014).

Tabla 2: Lista de nutrientes, patrones dietarios y evidencia de su asociación con el CaP
(Matsushita et al., 2020).

Subject	Type	Source Examples	Risk	Reported Mechanisms
Fat	Total fat	Animal meat, butter	Increased PCa risk	IL-6/STAT3 pathway MDSC, Macrophage infiltration GF-I signaling pathway Increase in local androgen
	Unsaturated fatty acid	Fish, vegetable oil	Decreased PCa risk (probable)	Decrease in estradiol, testosterone, and androgen receptors
Protein	Total protein	Animal meat, soy, dairy product,	No change in PCa risk	N/A
	Heterocyclic amine	Well-cooked meat	Increased PCa risk	Mast cell, Macrophage infiltration
	Dairy product	Milk, cheese	Increased PCa risk (probable)	N/A
Carbohydrate		Fruit, rice, potato, sugar	Increased PCa risk (probable)	IGF-I signaling pathway
Vitamin	VitaminA (Lycopene)	Tomato	Decreased PCa risk	Decrease in androgen metabolism Antioxidative effect
	VitaminD (Calcitriol)	Fish, dairy product, mushroom	Decreased PCa risk (controversial)	Promotion of immune cell differentiation
	VitaminE (Tocopherol)	Vegetable oil	No change in PCa risk (controversial)	Anti-inflammatory effects Endoplasmic reticulum stress Antioxidative effect
Polyphenol	Catechin	Green tea	Decreased PCa risk	IGF-I signaling pathway COX-2-mediated anti-inflammatory effects
	Isoflavone	Legume	Decreased PCa risk (probable)	Estrogenic effects Antioxidative effect Inhibition of tyrosine kinase Suppression of NFκB
Dietary pattern	Western pattern	Meat, potato, dairy product	Increased PCa risk (controversial)	N/A
	Prudent pattern	Vegetable, fruit, legume, fish	Decreased PCa risk (controversial)	N/A

La relación entre el tamaño corporal y la incidencia del CaP ha sido ampliamente estudiada a lo largo de los últimos años (Y. Cao & Ma, 2011; Discacciati et al., 2011; Giovannucci et al., 2007; MacInnis & English, 2006; Robinson et al., 2008). En particular, la obesidad se correlaciona positivamente con un alto riesgo de mortalidad y recurrencia del CaP. En un meta-análisis de seis estudios posteriores al diagnóstico de hombres con

CaP, un aumento de 5 kg/m² en el índice de masa corporal (IMC) se asoció con un 20 % más de riesgo de muerte por CaP (Y. Cao & Ma, 2011). De la misma forma, se observó una asociación de similar magnitud para el riesgo de recurrencia bioquímica (Pernar et al., 2018). Asimismo, el síndrome metabólico (SM), del cual se hablará en el capítulo 2, también se encuentra asociado a un peor pronóstico, aumento de la agresividad tumoral y alta tasa de recurrencia bioquímica (Gacci et al., 2017).

De esta forma, considerando la gran prevalencia de la obesidad y del SM en la población mundial resulta de manera imperiosa entender los mecanismos por los cuales estos factores impactan en el desarrollo y progresión del CaP.

Diagnóstico del cáncer de próstata

El tamizaje en el caso del CaP, está compuesto del examen digital rectal (DRE) y el antígeno prostático específico (PSA). El PSA es el biomarcador por excelencia para la detección, diagnóstico, estratificación del riesgo y seguimiento del CaP. Hace varias décadas, el PSA ha sido incorporado al tamizaje debido a que proporcionaba una mejor sensibilidad que sólo el DRE (Pezaro et al., 2014). Sin embargo, el PSA no es específico del CaP, y sus niveles se ven aumentados ante distintas afecciones no cancerosas como hiperplasia prostática benigna (HPB) y prostatitis (Jingpu Wang et al., 2020). A su vez, estudios poblacionales han demostrado que los valores de PSA aumentan con la edad, por lo tanto, un valor de PSA requiere de una interpretación que tenga en cuenta toda la situación clínica del paciente (Pezaro et al., 2014).

El diagnóstico del CaP se basa en la evaluación microscópica del tejido prostático obtenido mediante una biopsia con aguja (Litwin & Tan, 2017). De esta manera, un examen rectal anormal o un PSA elevado resultan en una biopsia de próstata. Sin embargo, debido a la poca especificidad del PSA se han generado una gran cantidad de biopsias innecesarias. Se encontró que sólo el 25% de los pacientes que tenían valores anormales de PSA (> 4ng/mL) tenían realmente CaP (Mistry & Cable, 2003). Por lo tanto, el uso del PSA redujo la mortalidad por CaP en un 20% a expensas de un sobre-diagnóstico. El sobre-diagnóstico de tumores biológicamente indolentes que no habrían

causado la muerte del paciente, resulta, también, en un sobre-tratamiento posterior. Éste último, expone a los pacientes a daños innecesarios relacionados con el tratamiento (Jingpu Wang et al., 2020). Otras limitantes a la hora del diagnóstico del CaP resultaron ser la naturaleza multifocal de dicha enfermedad y la heterogeneidad clonal dentro de cada paciente. Sumado a esto y la imposibilidad de muestrear todo el tumor, es que la información de una biopsia de un solo tejido suele ser insuficiente y no refleja la dinámica del tumor en toda la próstata (Jingpu Wang et al., 2020). La mayoría de los CaP son multifocales con agresividad variable, lo que limita la precisión de las pruebas genéticas basadas en un único foco. Por lo tanto, es necesario muestreos seriales de lesiones primarias y metastásicas. Sin embargo, esto no siempre es posible debido a la invasividad de la biopsia en una metástasis y dificultades logísticas para acceder a las muestras.

Por lo tanto, resulta urgente la elección de nuevos biomarcadores para la detección temprana y el diagnóstico del CaP de forma poco invasiva. Y más aún, biomarcadores que ayuden a la toma de decisión del médico en cuanto al tratamiento que recibirá el paciente, pudiendo así discriminar entre tumores indolentes y tumores de alto riesgo. En este trabajo de tesis proponemos identificar nuevos biomarcadores candidatos para el diagnóstico del CaP a través de la técnica conocida como biopsia líquida, que se desarrollará más adelante.

CAPÍTULO 2

EL SÍNDROME METABÓLICO

Características del síndrome metabólico

El síndrome metabólico (SM) es un grupo de factores de riesgo metabólicos para la diabetes mellitus tipo 2 y la enfermedad cardiovascular, y está asociado con una mayor mortalidad por estas y otras afecciones (Karzai et al., 2016; McGrowder et al., 2012). De acuerdo a un estudio, aproximadamente entre el 35 % y 39 % de la población adulta en Estados Unidos tiene síndrome metabólico con tasas similares en hombres y mujeres (Golden et al., 2009).

A lo largo de los años varias organizaciones han planteado diferentes definiciones de SM, incluyendo a la Asociación Estadounidense de Endocrinólogos Clínicos (AACE), el Grupo Europeo para el Estudio de la Resistencia a la Insulina (EGIR), la Federación Internacional de Diabetes (IDF), el Programa Nacional de Educación sobre el Colesterol para el tratamiento de adultos Panel III (NCEP –ATPIII) y la Organización Mundial de la Salud (OMS). Las distintas definiciones comparten varias similitudes, incluyendo la presencia de criterios relacionados con la dislipidemia, hipertensión, hiperglucemia y obesidad. Sin embargo, los valores de laboratorio que definen estos criterios y el número de criterios positivos necesarios para ser clasificado como SM varían entre las distintas organizaciones. La AACE, EGIR, IDF y la OMS requieren la presencia de ciertos criterios, como evidencia de obesidad central, hiperinsulinemia o resistencia a la insulina para cumplir con su clasificación de SM, mientras que el NCEP-ATPIII carece de esta restricción. Actualmente la definición más utilizada es la provista por el NCEP-ATPIII porque incorpora los conceptos clave del SM y se basa en estudios de laboratorio de uso común disponibles para la mayoría de los médicos (McGrowder et al., 2012). Según esta última definición el diagnóstico del SM requiere la detección de al menos 3 de los siguientes 5 parámetros: obesidad abdominal (circunferencia de cintura >102 cm en hombres), hipertrigliceridemia (≥ 150 mg/dL), colesterol HDL bajo (≤ 40 mg/dL en hombres), presión arterial alta ($\geq 130/85$ mmHg) y glucemia en ayunas elevada (≥ 110 mg/dL) (Karzai et al., 2016; McGrowder et al., 2012)) (Figura 6).

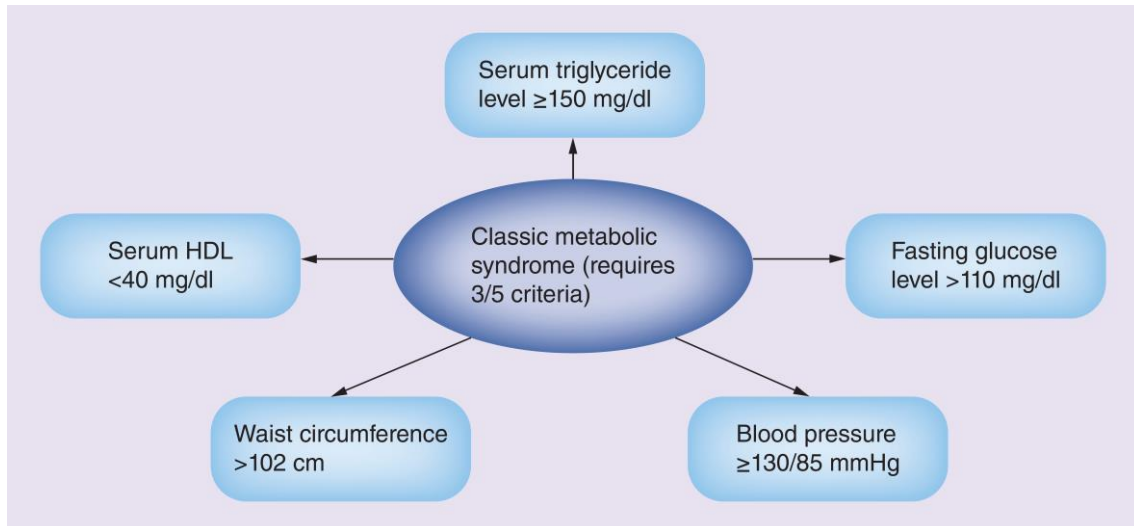


Figura 6: Criterios para el diagnóstico del SM. Criterios establecidos según la definición del NCEP-ATPIII del 2002 (Karzai et al., 2016).

El síndrome metabólico y el cáncer

Existe en la literatura un consenso que sostiene que los componentes individuales del SM son factores de riesgo para el cáncer. Por lo tanto, se podría inferir que pacientes con SM, que presentan varios factores de riesgo a la vez, deberían tener un riesgo mayor de desarrollar cáncer que individuos con ninguno o un solo factor asociado. Trabajos realizados en hombres de entre 20 y 88 años encontraron que individuos con SM presentan un incremento en la mortalidad por cáncer del 56% comparado con aquellos que presentan un sólo factor, y un 83% mayor que individuos sin SM (Jaggersa et al., 2009). Estudios epidemiológicos similares se han realizado para distintos tipos de cánceres en hombres y en mujeres (Figura 7) (Micucci et al., 2016).

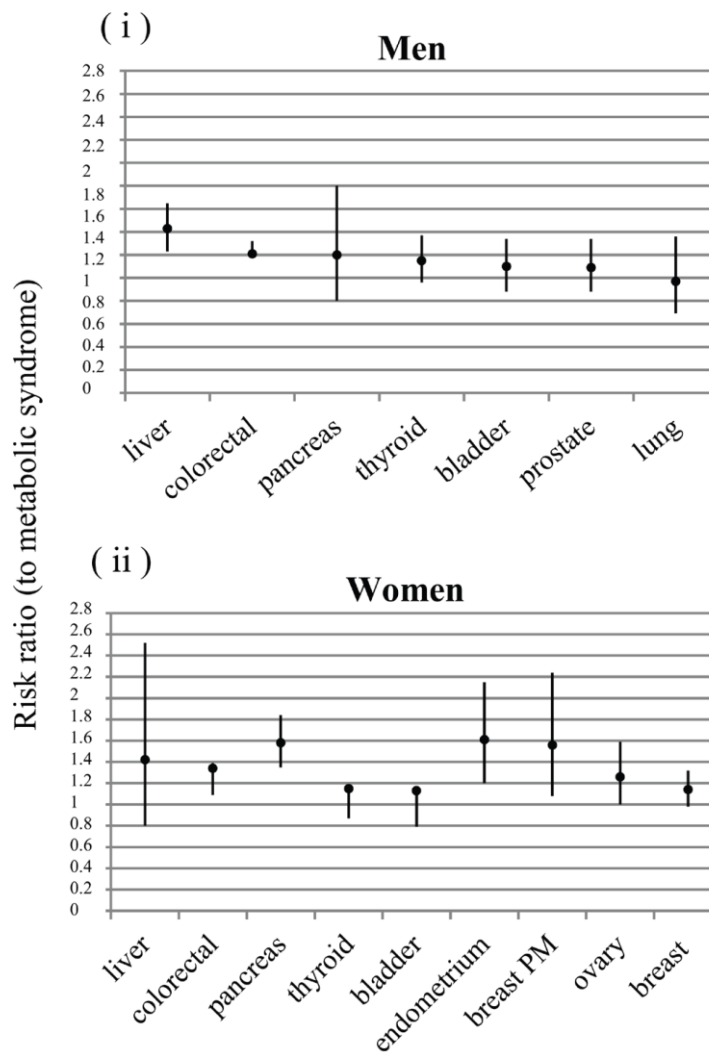


Figura 7: Asociación entre el SM y el riesgo de padecer cáncer. Probabilidad de riesgo de padecer distintos tipos de tumores en hombres (i) y mujeres (ii) en pacientes con y sin SM. Adaptado de (Micucci et al., 2016). Breast PM: cáncer de mama postmenopáusico.

A pesar de la evidencia epidemiológica todavía se encuentra en discusión cuáles son los principales mecanismos que vinculan el SM y el cáncer.

El síndrome metabólico y el cáncer de próstata

El SM es un factor de riesgo para los hombres con CaP. Por lo tanto, los cambios en el estilo de vida pueden tratar o incluso prevenir esta afección y, de esta forma, alterar el curso de la progresión del CaP (Karzai et al., 2016). Además, los parámetros individuales del SM han sido relacionados con un mayor riesgo de padecer CaP (Karzai et al., 2016).

Un estudio prospectivo basado en la población de Finlandia, ha demostrado que de 357 hombres que tenían SM según los criterios de la OMS, 183 desarrollaron algún tipo de cáncer y, en particular, 56 de ellos tuvieron CaP. Sumado a esto, un análisis multivariado mostró que los hombres con SM tenían casi el doble de riesgo relativo de desarrollar CaP. Ese riesgo fue aún mayor en hombres con sobrepeso u obesidad (Karzai et al., 2016). Xiang et al. encontró que el SM se asociaba con un aumento del 36% en la razón de posibilidades (OR: odds ratio) del grado de Gleason de 7 y un aumento del 37 % en el riesgo de estadio clínico avanzado (Xiang et al., 2013). En tres estudios analizados, el SM se asoció con un mayor riesgo de muerte específica por CaP (Xiang et al., 2013).

En 1997 Andersson et al demostró que las medidas antropométricas (altura y peso) y el IMC se asociaron positivamente con el riesgo de CaP y se relacionaron más con la mortalidad que con la incidencia (Andersson et al., 2012). Un estudio de cohorte prospectivo reveló que los hombres obesos de 50 a 59 años tenían un 58% más de riesgo de padecer CaP en comparación con aquellos con un IMC normal. El riesgo de padecer CaP aumentó tanto por el IMC como por la altura, y los hombres más altos tenían un mayor riesgo relativo en comparación con los hombres más bajos (Engeland et al., 2003). Otro estudio prospectivo que involucró hombres suecos con CaP clínico demostró que tanto el estadio como el grado del CaP están directamente asociados con el IMC, los triglicéridos, la medida de la cintura y la insulina plasmática en ayunas, e indirectamente con el colesterol HDL (Hammarsten & Högstedt, 2004).

Algunos estudios sugieren que los parámetros del SM también pueden provocar un CaP más agresivo y, en particular, que la mortalidad por CaP se vio asociada significativamente con un nivel más bajo de colesterol HDL y una alta relación cintura-cadera (McGrowder et al., 2012).

Finalmente, estudios preclínicos desarrollados en nuestro laboratorio han demostrado que el SM asociado a una dieta grasa administrada de manera crónica aumenta el desarrollo y la progresión del CaP, a través de la modulación de genes y miRNAs (Dalton et al., 2019; Massillo et al., 2019, 2020; Porretti et al., 2018).

En resumen, el SM afecta al 25% de la población mundial y se encuentra asociado con una mayor incidencia y progresión del CaP. Por lo tanto, entender el vínculo de estas

dos enfermedades resulta de gran relevancia para el diagnóstico y el tratamiento de este subgrupo de pacientes. En este trabajo de tesis proponemos identificar nuevos biomarcadores candidatos para el diagnóstico de pacientes con SM y CaP.

CAPÍTULO 3

BIOSÍNTESIS DE miRNAs, MECANISMOS GENERALES DE ACCIÓN Y BIOPSIAS LÍQUIDAS

Biosíntesis y mecanismos generales de acción de los miRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA monocatenario no codificantes de aproximadamente 21 a 23 nucleótidos de longitud. Los miRNAs tienen una uridina en su extremo 5' y es parcialmente complementario a las regiones no traducidas del extremo 3' del RNA mensajero (mRNA) (Vishnoi & Rani, 2017).

La biosíntesis de los miRNAs en humanos sigue un proceso de dos pasos con un evento de escisión nuclear y citoplasmática. En el núcleo, los miRNAs se transcriben dando lugar a un transcripto llamado pri-miRNA, ya sea por sus propios promotores o compartiendo promotores de su gen huésped. La mayoría de los miRNAs se transcriben a partir de genes de miRNAs específicos, excepto un 30% que proviene de intrones o exones de genes huésped que codifican para proteínas. Para la mayoría de los miRNAs, entre las dos RNA polimerasas RNA pol II y RNA pol III, la RNA pol II es la responsable de la transcripción del pri-miRNA. La preferencia por la RNA pol II resulta por la longitud del pri-miRNA, que es de 1 kb más largo que la transcripción por la RNA pol III. El pri-miRNA tiene una estructura local de stem-loop, que normalmente consta de un tallo de 33–35 pb (11 pb tallo inferior y 22 pb tallo superior) y un bucle terminal flanqueado por secuencias de RNA monocatenario (ssRNA). Estudios han demostrado que la mayoría de los pri-miRNAs de mamíferos contienen motivos de secuencia primaria, como el motivo GU en la unión basal, UGU en la unión apical y el CNNC río abajo, que sirven para posicionar correctamente y dirigir la escisión por el complejo microprocesador en el núcleo. El microprocesador es un heterodímero que está compuesto por una proteína llamada Drosha que alberga el sitio activo de la enzima RNasa III y dos proteínas del gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge (DCGR8; subunidad del microprocesador) con dominios de unión a RNA. Este complejo heterodimérico escinde el pri-miRNA en una posición específica ubicada a 11 pb de la unión basal y a 22 pb de la unión superior, generando un precursor con estructura de horquilla de 60 nucleótidos llamado pre-miRNA, con 2 nucleótidos sobresalientes en el extremo 3'. Estudios recientes demostraron que sólo la región del extremo C-terminal de 23 aminoácidos de DGCR8, que es la responsable de la unión de Drosha, es esencial para generar el complejo microprocesador activo. De esta forma, Drosha dirige prácticamente sin ayuda el reconocimiento del sustrato y la escisión, aunque la precisión de la escisión aumenta

con DGCR8 de longitud completa. Luego del procesamiento por parte de Drosha, el pre-miRNA es exportado al citoplasma a través de Exportin 5 (Xpo5), donde finaliza el proceso de maduración. Xpo5 forma un complejo transportador con una proteína nuclear de unión a GTP, RanGTP, y transporta al pre-miRNA al citoplasma. Acto seguido, el GTP unido se hidroliza, dando como resultado el desarmado del complejo y la liberación del pre-miRNA en el citoplasma. Los 2 nucleótidos sobresalientes del pre-miRNA generado por Drosha, es reconocido por otra enzima RNasa III, llamada Dicer, que sirve como “regla” molecular y escinde la estructura del bucle de aproximadamente 22 pb desde el final, dando lugar a un miRNA dúplex de 22 nucleótidos aproximadamente.

El miRNA dúplex se carga en la proteína Ago gracias a las chaperonas Hsc70/Hsp90 de forma dependiente de ATP y por el cofactor TRBP. El dominio N de Ago inicia el desenrollo del miRNA dúplex. Una hebra se retiene para formar el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC) mientras que la otra se disocia. La selección de la hebra depende, en parte, de las características del dúplex, la composición de nucleótidos y el perfil termodinámico del dúplex. Ambas hebras muestran el mismo potencial de silenciamiento génico, pero una de ellas (la hebra guía) suele ser más frecuente y biológicamente activa que la otra (hebra pasajera). El miRNA guía al complejo miRISC para que se dirija a los mRNAs e interfiera con su expresión al inducir una combinación de represión traduccional, deadenilación y descomposición del mRNA. Este proceso ha sido estudiado extensamente durante la última década, proponiéndose varios modelos diferentes. Aunque estos no son mutuamente excluyentes, el más prevalente actualmente es el reclutamiento mediado por Ago de una de las tres proteínas GW182 humanas, TNRC6A/B/C. TNRC6A/B/C interfiere con la estructura de bucle cerrado formada por eIF4G y PABPC entre el cap del mRNA y la cola de poli(A), y al mismo tiempo recluta el complejo deadenilasa CCR4/NOT. Esto reprime el reciclaje de los ribosomas en la traducción, lo que lleva a una reducción de la producción de proteínas y al mismo tiempo desestabiliza al mRNA al recortar la cola de poli(A). Los miRNAs de animales seleccionan canónicamente sus mRNA blanco en función de la complementariedad de bases entre la secuencia semilla de los miRNAs (2 a 7 nucleótidos desde el extremo 5') y las regiones en la región 3' no traducible (3' UTR) del mRNA. A su

vez, los nucleótidos río debajo de la secuencia semilla, en particular el nucleótido 8 y, en menor medida, del 13 al 16, también contribuyen al reconocimiento del mRNA blanco.

El modelo de silenciamiento mediado por la secuencia semilla, resulta ser un modelo tradicional y simplificado, que no explica el 100% de los casos, ya que en los últimos años se han informado en animales más interacciones de miRNA-mRNA no canónicas. Sin embargo, la complementariedad de secuencia por parte de la secuencia semilla permite que un solo miRNA tenga cientos de mRNAs blanco diferentes. Más del 60% de los genes del genoma humano que codifican para proteínas contienen al menos un sitio de unión a miRNA conservado, lo que hace que los miRNAs sean actores claves en la mayoría de los procesos biológicos y patológicos (Daugaard & Hansen, 2017; Vishnoi & Rani, 2017).

Todo el proceso de biogénesis de los miRNAs se encuentra representado en la Figura 8.

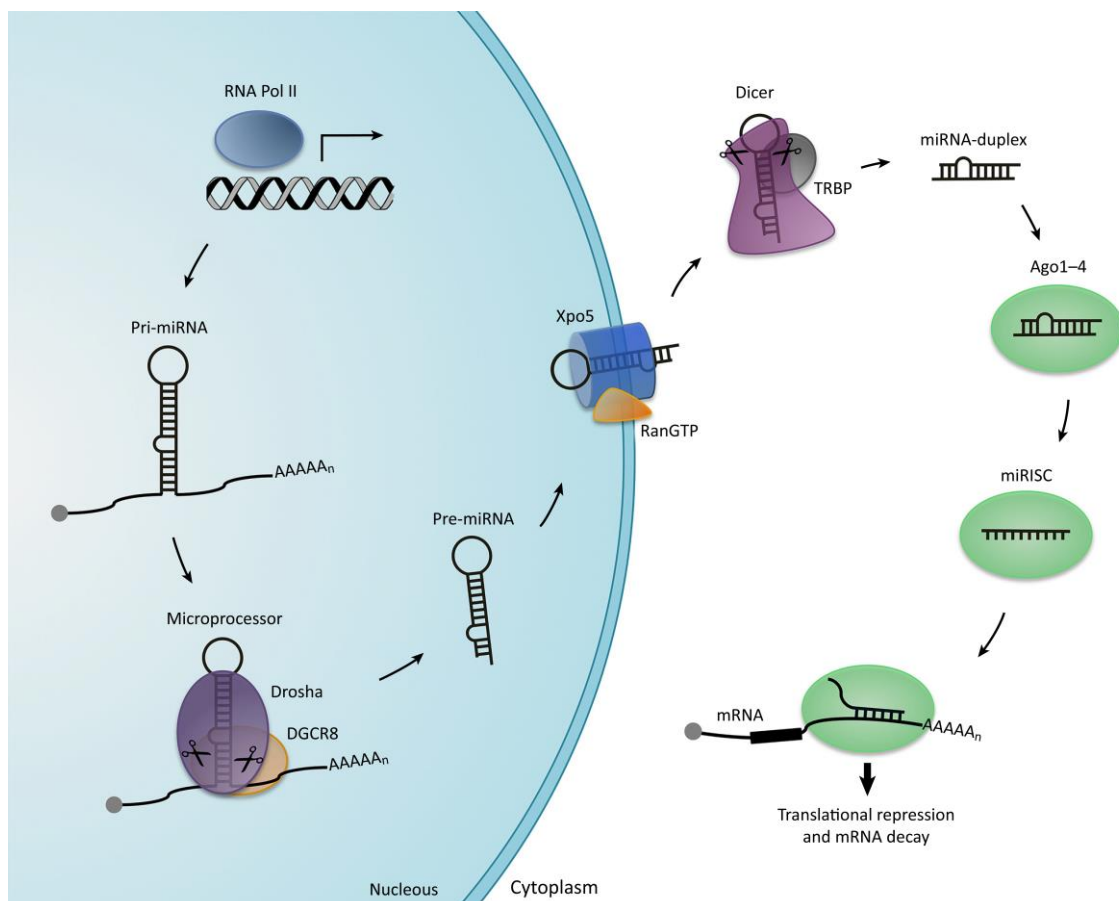


Figura 8: Biogénesis de los miRNAs. La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo con la síntesis de un pri-miRNA mediante la RNA polimerasa II. Estos transcriptos de más de 1 Kb conteniendo un CAP en el extremo 5' y una cola de poli(A) en el extremo 3', son procesados en fragmentos de 70 nt por el complejo microprocesador, formado por Drosha, una RNasa de tipo

III, y DGCR8, una proteína de unión al RNA. Este procesamiento da lugar a la formación de los pre-miRNAs, los cuales son exportados al citoplasma por Xpo5. En este compartimento, los pre-miRNAs son procesados por otra RNasa de tipo III, Dicer, que cliva el bucle terminal de la horquilla generando fragmentos doble cadena de 19 a 25 nt. Estos fragmentos son reconocidos por proteínas de la familia Argonauta (Ago1 a 4), las cuales seleccionan la hebra que dará como resultado el miRNA maduro que funcionará como guía del complejo miRISC principalmente al extremo 3'UTR de los mRNA blanco. Abreviaturas: DGCR8: proteínas del gen 8 de la región crítica del síndrome de DiGeorge; miRISC: complejo de silenciamiento inducido por miRNA; RNA Pol II: polimerasa II; UTR: región no traducible; TRBP: Proteína de unión a RNA sensible a la transactivación. (Daugaard & Hansen, 2017).

Desregulación de miRNAs en cáncer

Gracias al avance en las investigaciones científicas, en las últimas décadas, los miRNAs han surgido como nuevos componentes celulares diferencialmente expresados en células patológicas y normales. Gracias a ello, ha aparecido la posibilidad de tipificar los distintos tipos de cánceres a través de los miRNAs. Este procedimiento se basa en la identificación de miRNAs expresados específicamente en tejidos tumorales o miRNAs cuyo nivel de expresión es diferente al presente en tejidos normales (Shah & Shah, 2020; Smolarz et al., 2022). El perfil de expresión de miRNAs permite determinar el grado de desarrollo tumoral, generando nuevas posibilidades terapéuticas y permitiendo utilizar una terapia más adecuada según el caso.

La regulación por miRNAs se lleva a cabo mediante dos funciones: el mantenimiento homeostático de la regulación génica, que depende en gran medida del tipo celular y la especificación del destino celular y la preservación de la identidad celular a través de mecanismos de retroalimentación. Por lo tanto, por ejemplo, en respuesta al estrés, los cambios en los miRNAs ayudan a las células a adaptarse a las condiciones alteradas de su microambiente (Shah & Shah, 2020; Smolarz et al., 2022).

En células cancerosas se han observado alteraciones genéticas específicas de miRNAs, que llevan a una modificación en la unión a su gen blanco, procesamiento y cambios post-transcripcionales en el 3'UTR del mRNA (Shah & Shah, 2020).

De acuerdo a la función de los miRNAs en el desarrollo tumoral, los miRNAs se clasifican en: miRNAs supresores tumorales (tsmiR: que inhiben la expresión de oncogenes o genes que inducen la apoptosis) y miRNAs oncogénicos (oncomiRs: que activan la oncogénesis o inhiben la expresión de genes supresores tumorales). Sin embargo, esta clasificación es una simplificación ya que en el caso de muchos miRNAs el efecto de su actividad depende de la actividad total de sus genes blanco (Smolarz et al., 2022).

Una disminución o falta de expresión de miRNAs supresores da como resultado una mayor expresión de genes blanco importantes para la progresión tumoral, incluyendo proteínas anti-apoptóticas o factores de transcripción. Por otro lado, un aumento en la expresión de miRNAs puede ser producto de una amplificación en los genes que codifican para esos miRNAs, como así también por una biogénesis más eficiente, actividad constitutiva de sus promotores o una mayor estabilidad de las moléculas de miRNAs (Smolarz et al., 2022).

A través de múltiples estudios, en los últimos años, se ha identificado el papel regulador de varios miRNAs en distintos tipos de cáncer (Tabla 3).

Tabla 3: Papel regulador de miRNAs en diferentes tipos de cáncer (Shah & Shah, 2020).

Type of cancer	MicroRNA	Effect on CSCs property
Lung	miR-34a miRNA-200b	Inhibitory effect by targeting CD44 Inhibition of HDAC 1 and Suz-12
Breast	Let-7 miR-200 family	Inhibits self-renewal and dedifferentiation by targeting RAS and HMGA2 Inhibits EMT, self-renewal and mammosphere formation
Leukaemia (AML and MDS)	miR-22	Reduces expression of miR-200 family Promotes self-renewal
AML – acute myelogenous leukaemia MDS – myelodysplastic syndrome		
Prostate	miR-34a miR-320 miR-25	Inhibits self-renewal and metastasis by targeting CD44 Inhibits Wnt signalling pathway Inhibitory effect by targeting cytoskeleton α v- and α 6-integrin
Liver	miRNA-150	Inhibitory effect by targeting c-Myb
Pancreas	miR-200c	Inhibitory effect by targeting ZEB1 and E-cadherin
Brain	miR-17	Promotes cell proliferation of CD133+
Colon	miR-451	Inhibits tumorigenicity and self-renewal bt targeting COX-2

Se han encontrado una serie de miRNAs implicados en el inicio, la progresión y la metástasis del cáncer. En particular, en cuanto a la progresión celular se reportaron miRNAs implicados en el ciclo celular, proliferación y apoptosis celular, angiogénesis, EMT e invasión tumoral, desempeñando funciones importantes y complejas en la red regulatoria del cáncer (B. He et al., 2020) (Figura 9).

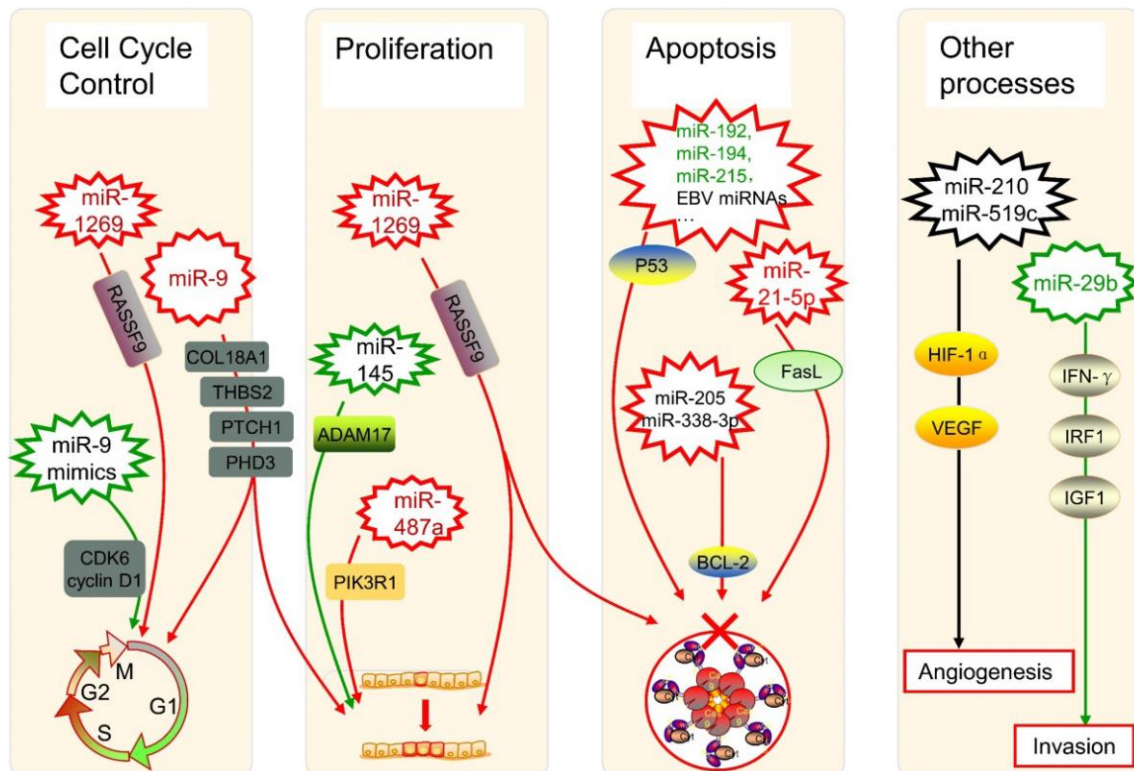


Figura 9: miRNAs implicados en la progresión del cáncer. El aumento o disminución en la expresión de los miRNAs (en rojo o verde) influye en el proceso de progresión del cáncer (los marcos y líneas rojos significan que promueven la progresión del cáncer, mientras que los verdes significan que inhiben). RASSF9: familia de dominios de asociación Ras 9; CDK6: quinasa 6 dependiente de ciclina; VEB: virus de Epstein-Barr; BCL-2: linfoma 2 de células B; FasL: ligando Fas; ADAM17: Desintegrina A y metaloproteinasa 17; PIK3R1: subunidad reguladora 1 de fosfoinositida-3-cinasa; HIF-1 α : factor 1 α inducible por hipoxia; VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular; IFN- γ : interferón- γ ; IRF1: factor regulador de interferón 1; IGF1: factor de crecimiento similar a la insulina 1 (B. He et al., 2020).

miRNAs y el cáncer de próstata

En la literatura se ha encontrado que los miRNAs tienen un rol relevante en el desarrollo del CaP. En particular, se ha visto que se encuentran involucrados en la carcinogénesis, proliferación celular, apoptosis, inducción de EMT, migración e invasión celular, metástasis, respuesta a la radioterapia y la resistencia a la terapia de ablación androgénica, entre otros procesos (Fabris et al., 2016; Ghafouri-Fard et al., 2020; Konoshenko et al., 2021; Luu et al., 2017; Sharma & Baruah, 2019; Thieu et al., 2014). A su vez, también se ha encontrado que los miRNAs se expresan diferencialmente según el grado de Gleason y, más aún, que el perfil de expresión de miRNAs permite distinguir entre tumores más y menos agresivos (Fabris et al., 2016; Ghafouri-Fard et al., 2020; Konoshenko et al., 2021; Luu et al., 2017; Sharma & Baruah, 2019; Thieu et al., 2014). A lo largo del presente trabajo se discutirá el rol de los diversos miRNAs estudiados tanto en el CaP como en distintos tipos de cáncer.

Biopsias líquidas y el uso de miRNAs circulantes

El diagnóstico del CaP se basa en la evaluación microscópica del tejido prostático obtenido mediante una biopsia con aguja (Litwin & Tan, 2017). De esta manera, un examen rectal anormal o un PSA elevado resultan en una biopsia de próstata. Sin embargo, debido a la poca especificidad del PSA se han generado una gran cantidad de biopsias innecesarias. Es por ello que resulta de manera prácticamente urgente la elección de nuevos biomarcadores para la detección temprana y el diagnóstico del CaP.

Otras limitantes a la hora del diagnóstico del CaP resultaron ser la naturaleza multifocal de dicha enfermedad y la heterogeneidad clonal dentro de cada paciente. Sumado a esto y la imposibilidad de muestrear todo el tumor, es que la información de una biopsia de un solo tejido suele ser insuficiente y no refleja la dinámica del tumor en toda la próstata (Jingpu Wang et al., 2020). La mayoría de los CaP son multifocales con agresividad variable, lo que limita la precisión de las pruebas genéticas basadas en un único foco. Por lo tanto, es necesario muestreos seriales de lesiones primarias y metastásicas. Sin embargo, esto no siempre es posible debido a la invasividad de la biopsia en una metástasis y dificultades logísticas para acceder a las muestras (Jingpu Wang et al., 2020). Como respuesta a este problema, surge la biopsia líquida. La biopsia líquida, por su naturaleza no invasiva, resulta en una gran herramienta para la detección temprana del cáncer, incluso antes de que aparezcan los síntomas (Jiang et al., 2019; Qu et al., 2011; Jingpu Wang et al., 2020). Dicha tecnología se basa en el estudio de células tumorales y ácidos nucleicos provenientes de los tumores en fluidos corporales de pacientes con cáncer, permitiendo tener una información más completa sobre el panorama genético y realizar un seguimiento de la evolución genómica a medida que los tumores progresan (Riaz et al., 2018; Jingpu Wang et al., 2020; Watanabe et al., 2021). Las biopsias líquidas permiten detectar células tumorales circulantes (CTCs) y materiales derivados de tumores como DNA, RNA, microRNA, proteínas y péptidos, en fluidos corporales como sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o heces (Watanabe et al., 2021).

El uso de miRNAs circulantes como biomarcadores

En vista de que los miRNAs resultan ser marcadores del proceso tumoral y pueden ser detectados a través de procedimientos no invasivos en fluidos corporales (como el plasma, líquido cefalorraquídeo, saliva, orina y líquido seminal), los mismos surgen como posibles biomarcadores para la detección temprana, diagnóstico y pronóstico del cáncer. Los miRNAs, a diferencia del mRNA, se caracterizan por su resistencia a las RNasas endógenas y exógenas, pH y temperaturas extremas, en plasma, suero, tejidos frescos congelados, bloques de parafina y saliva. Dichas moléculas tienen la capacidad de mantener una alta estabilidad durante un largo período de tiempo, incluso a

temperatura ambiente. Estas características hacen que los miRNAs sean excelentes biomarcadores desde el punto de vista del diagnóstico clínico (Smolarz et al., 2022).

Existen muchas hipótesis que explican el origen y las propiedades de los miRNAs circulantes. La primera teoría se basa en la afirmación de que la aparición de miRNAs en la sangre es una consecuencia de la destrucción celular y se produce como resultado de una fuga no energética de los miRNAs celulares. Esto ocurre como resultado del daño tisular característico de etapas individuales de carcinogénesis, entrada de las células en inflamación, apoptosis o durante la formación de las metástasis. La segunda hipótesis asume un proceso activo de liberación de miRNAs de la célula de manera dependiente de microvesículas (MV). La última teoría habla de la secreción activa y selectiva de miRNAs en forma independiente y libre de MV, que es consecuencia de la respuesta de las células a diversos estímulos. Las microburbujas son de origen celular y pueden liberarse de la célula por fusión con la membrana celular. Estas incluyen micropartículas (MP) (>100 nm de diámetro) y exosomas (50 a 90 nm de diámetro), así como cuerpos apoptóticos (AB) más grandes producidos en respuesta a estímulos apoptóticos. Se han detectado MV en plasma, orina y otros fluidos corporales. Los exosomas funcionan como vehículo para el transporte de miRNAs entre células, que termina afectando la producción de proteínas y actividad celular. Una estrategia para estudiar los miRNAs circulantes es aislarlos a partir de exosomas (Smolarz et al., 2022).

Por otro lado, la alta estabilidad de los miRNAs puede deberse a proteínas de unión a RNA (RBP) y lipoproteínas. La función de las proteínas de unión a miRNAs no sólo es protegerlo de la degradación, sino también participar activamente en el empaquetamiento controlado de miRNAs específicos en exosomas y su exportación fuera de la célula (Smolarz et al., 2022).

En la Figura 10, se representan los miRNAs circulantes que han sido propuestos como potenciales biomarcadores en varios tipos de cánceres.

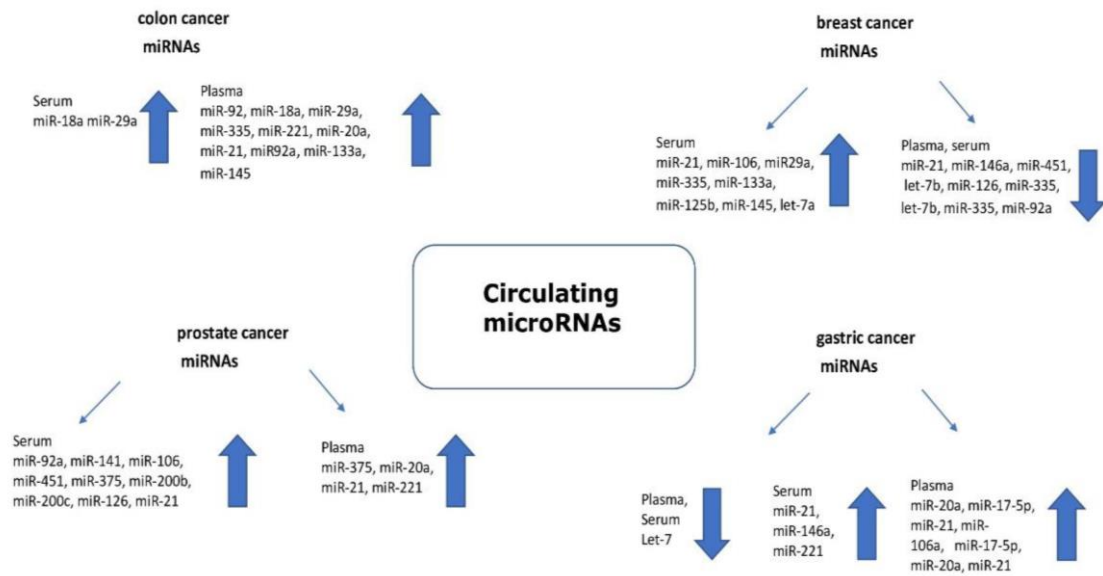


Figura 10: miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores en el cáncer. Las flechas indican los niveles de expresión (Smolarz et al., 2022).

Antecedentes del laboratorio en investigación con miRNAs

En el laboratorio donde se llevó a cabo la presente tesis, se han realizado diversos estudios sobre el rol del SM en la progresión del CaP y el cáncer de mama, así como también el estudio de diversos miRNAs y su rol en la tumorigénesis y metástasis.

C-terminal Binding Protein (CTBP1) es un factor que reprime la expresión de genes supresores tumorales y es activado por su unión al NAD⁺/NADH. Nuestro grupo fue el primero en determinar que CTBP1 controla la transcripción del gen supresor tumoral BRCA1 en el CaM. A partir de estos hallazgos y debido a que CTBP1 es una proteína que se activa en condiciones de alta energía (alto NADH), en nuestro laboratorio se generó un modelo murino para estudiar el efecto de la activación de CTBP1 sobre el desarrollo del CaP y cáncer de mama. Para ello, ratones nude fueron alimentados con una dieta enriquecida en grasa (DG) la cual aumentó el NADH intratumoral e indujo un estado similar al SM. El silenciamiento de la expresión de CTBP1 disminuyó drásticamente el crecimiento tumoral de mama y de próstata respecto a los tumores con expresión control de CTBP1 únicamente en los animales que tenían un estado similar al SM, validando de ésta manera nuestra hipótesis (Dalton et al., 2019; De Luca et al., 2016;

Farré et al., 2018). Por lo tanto, CTBP1 surge como una proteína que asocia el desarrollo de estos tipos de cánceres y el SM.

Utilizando microarreglos de expresión de mRNA y herramientas bioinformáticas, se encontró que CTBP1 modula la expresión de genes involucrados en vías de adhesión y comunicación celular, apoptosis y procesos metabólicos. Además, se realizaron microarreglos de expresión de miRNAs a partir de xenotransplantes obtenidos por inyección de células tumorales de próstata o de mama que tienen silenciada la expresión de CTBP1 o células control en animales con SM. Estos estudios permitieron describir por primera vez que CTBP1 es capaz de modular la expresión de múltiples miRNAs en CaP y el cáncer de mama que regulan procesos relacionados con la progresión y el desarrollo del cáncer (Dalton et al., 2019; De Luca et al., 2016; Farré et al., 2018).

Más recientemente, se generó un modelo murino no inmunodeficiente de SM y CaP. Este modelo permitió determinar que el SM aumenta el crecimiento tumoral de alotransplantes murinos de próstata y que estos ratones tenían una mayor cantidad de tejido adiposo, hipertrofia de adipocitos, mayor densidad de estructuras en forma de corona e inducción de la expresión de genes y miRNAs que regulan la inflamación y la adipogénesis, lo cual lleva a un fenotipo pro-inflamatorio, una característica importante del SM (Massillo et al., 2019). Estos resultados describen un nuevo mecanismo por el cual el tejido adiposo asociado al SM aumenta el crecimiento tumoral prostático. En otro trabajo del grupo se observó que CTBP1 y la DG aumentaron la migración y disminuyeron la adhesión celular, las metástasis a pulmón y la enfermedad neoplásica en el hígado modulando la expresión de diversos genes y miRNAs (Farré et al., 2018).

En resumen, en los últimos años nuestro laboratorio se focalizó en la investigación acerca del rol de los miRNAs en modelos animales asociados al SM y cáncer, lo cual permitió, en este trabajo de tesis comenzar a trabajar en la detección de miRNAs en circulación en ratones para posteriormente pasar a ensayos clínicos, adaptando las técnicas ya utilizadas previamente en el laboratorio.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis se basa en la siguiente hipótesis: **el estudio de miRNAs específicos del tejido adiposo (TA), su liberación y su interacción con las células tumorales de próstata permitirá por un lado entender el mecanismo por el cual el SM aumenta el desarrollo y la agresividad del CaP, y por otro lado, facilitará la identificación de candidatos a biomarcadores útiles para el diagnóstico del CaP asociado al SM. La identificación, estudio, caracterización y validación de estos miRNAs permitirá generar en el futuro nuevos biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de estas enfermedades.**

En base a esto, el objetivo general de este trabajo de tesis es identificar y estudiar la función de miRNAs que puedan ser utilizados como biomarcadores para mejorar el diagnóstico y/o pronóstico del CaP en pacientes con SM.

Los objetivos específicos propuestos son:

Objetivo 1. Identificar nuevos biomarcadores de diagnostico y/o pronóstico para el CaP insensible a andrógenos y el SM.

En este trabajo de tesis proponemos desarrollar un modelo murino con CaP insensible a andrógenos y SM para luego, utilizando técnicas de biología molecular, determinar el perfil de expresión de miRNAs en los tumores, tejido adiposo (TA) y sangre periférica de esos modelos animales. Además, utilizando herramientas de bioinformática y bases de datos de repositorios públicos estableceremos la relevancia de los biomarcadores identificados en muestras humanas.

Objetivo 2. Identificar nuevos biomarcadores de diagnostico y/o pronóstico para el CaP sensible a andrógenos y el SM.

Para ello proponemos desarrollar un modelo murino con CaP sensible a andrógenos y SM para luego determinar el perfil de expresión de miRNAs en los tumores, tejido adiposo (TA) y sangre periférica de esos modelos animales. Además, al igual que en el objetivo 1, utilizando herramientas de bioinformática y bases de datos de repositorios públicos estableceremos la relevancia de los biomarcadores identificados en muestras humanas.

Objetivo 3. Establecer y validar miRNAs circulantes en sangre de pacientes con CaP como biomarcadores candidatos para la detección de esta enfermedad

Previamente hemos desarrollado un microarreglo de expresión de miRNAs circulantes en pacientes con CaP. En este proyecto de tesis proponemos establecer nuevos biomarcadores utilizando la técnica de miRNA-seq y validar los resultados del microarreglo de expresión y del miRNA-seq en un número mayor de pacientes y voluntarios sanos para determinar la fuerza de los miRNAs identificados como candidatos a biomarcadores. Asimismo, proponemos validar estos resultados utilizando bases de datos de repositorios públicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 1

LÍNEAS CELULARES, EXPERIMENTOS *IN VIVO* Y MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN

Condiciones de crecimiento de las líneas celulares

La línea celular murina de CaP sensible a andrógenos TRAMP-C1 (ATCC: CRL-2730) se cultivó en medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, GIBCO) suplementado con 0,25 UI/ μ l de insulina recombinante humana (Lilly). La línea celular humana de CaP insensible a andrógenos PC3 (ATCC: CRL-1435) fue cultivada en medio RPMI 1640 (Invitrogen). Todas las líneas fueron suplementadas con 10% suero fetal bovino (SFB) y antibióticos (100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y 0,5 μ g/ml de anfotericina) y se crecieron en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO₂ 5%.

Experimentos *in vivo*

Modelo murino de xenotransplantes de CaP y SM en ratones inmunosuprimidos

Ratones machos NOD scid gamma (NSG) de 4 semanas de edad (N=12) gentilmente cedidos por el laboratorio de la Dra. Claudia Lanari, se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo a las normas de cuidado del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). El protocolo fue aprobado por el CICUAL del IBYME con fecha 30/06/2017, número de protocolo 019/2017. Los animales fueron aleatorizados en 2 grupos y se alimentaron *ad libitum* durante 20 semanas con una DC (n=6) o una DG (n=6) generada por el agregado de grasa bovina a los pellets en una proporción 30%. La DG presenta un valor energético de 4520 Kcal/kg mientras que la DC 3120 Kcal/kg. Los animales se pesaron una vez por semana utilizando balanza digital. Al cabo de 16 semanas de dieta, los animales fueron inoculados s.c. con $4,5 \times 10^6$ de células PC3 en el flanco izquierdo del animal. Se midió el tamaño tumoral de los xenotransplantes tres veces por semana, utilizando un calibre digital y el volumen tumoral se calculó utilizando la fórmula: $0,523 \times \text{ancho}^2 \times \text{largo}$, donde el ancho representa la dimensión de menor tamaño del tumor. Luego de 4-6 semanas post-inoculación, cuando el tamaño de los xenotransplantes generados fue alrededor de 1500 mm³, los animales se sacrificaron y se obtuvieron, por un lado, sangre de manera intracardiaca, y por otro lado muestras de tumor, pulmón e hígado. La sangre fue colectada en tubos conteniendo 60 μ L de EDTA 0.5M (pH=8), luego se centrifugó para obtener el plasma, para la posterior extracción de miRNAs circulantes. Los tejidos fueron

sumergidos en formalina 10% para el posterior análisis histopatológico y, por otro lado, los tumores fueron inmediatamente sumergidos en Tri-Reagent (Molecular Research Center) y congelados a -80°C para su posterior extracción de RNA total como se detalla en el siguiente capítulo.

Modelo murino de alotransplantes de CaP y SM en ratones no-inmunodeficientes

Ratones machos C57BL/6J de 6 semanas de edad (N=12) se mantuvieron en condiciones libres de patógenos de acuerdo a las normas de cuidado del bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME). El protocolo fue aprobado por el CICUAL del IBYME con fecha 30/06/2017, número de protocolo 019/2017. Los animales fueron aleatorizados en 2 grupos y se alimentaron *ad libitum* durante 20 semanas como se comentó anteriormente. Al cabo de 12 semanas de dieta, se determinaron parámetros metabólicos tales como los niveles de glucosa y colesterol en ayunas en suero y, posteriormente, los animales fueron inoculados s.c. con 5×10^6 de células TRAMP-C1 en el flanco izquierdo del animal. El volumen tumoral se determinó como se describió anteriormente. Los animales se sacrificaron en la semana 20 de dieta y se colectaron muestras de tumor, pulmón, hígado, tejido adiposo y sangre.

En cuanto a los parámetros metabólicos, la determinación de la glucemia en ayunas en sangre fue realizada una semana antes de la inyección de las células tumorales por el Stan “Evaluación de los efectos biológicos de insulinas: Test de tolerancia a la insulina” brindado por la Dra Victoria Lux (STAN IBYME-CONICET Código: ST5221). Por otro lado, por cuestiones de tiempo y para evitar un aumento en el estrés de los animales, la determinación de los niveles de colesterol en ayunas en suero se realizó una semana después de la inyección de las células tumorales a partir sangre obtenida de la punta de la cola del ratón que se dejó coagular para separar la fracción plasmática del suero (Colestat enzimático AA, Wiener Lab).

Microarreglos de expresión de miRNAs

Se hibridaron microarreglos de expresión de miRNAs con el RNA total aislado de tumores TRAMP-C1 DC o DG usando Tri-Reagent (Molecular Research Center). La concentración y la pureza de los miRNAs se evaluaron utilizando NanoDrop 2000, teniendo en cuenta que el 10 % de la concentración que arroja el NanoDrop corresponde

a la cantidad de miRNAs como se indica en Garcia-Elias et al., 2017. Los miRNAs obtenidos de los alotransplantes de CaP se hibridaron con microarreglos de expresión de miRNAs GeneChip® miRNA 4.0 Array (Affymetrix), que poseen 1908 miRNAs de ratón diferentes que corresponden a todos los miRNAs publicados hasta la fecha. La hibridización de los miRNAs se llevó a cabo en el servicio técnico a terceros del IFEVA (Facultad de Agronomía, UBA). Para el análisis de la expresión de miRNAs, se emplearon los paquetes *Limma* y *pd.mirna.4.0* del proyecto R/Bioconductor. Para el análisis de expresión diferencial, se utilizó el método de producto de rango para datos no apareados de dos clases y una tasa de descubrimiento de veces (FDR) < 0,05 (Breitling et al., 2004).

CAPÍTULO 2

MÉTODOS PARA EL ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE mRNA Y miRNAs

Aislamiento de RNA total y miRNAs

A partir de tejido

El aislamiento del RNA total (incluidos los miRNAs) a partir de tejidos se realizó a partir de las muestras sumergidas en Tri-Reagent como se mencionó anteriormente. Al momento de la extracción, los mismos fueron descongelados y homogeneizados dando tres pulsos de 10 segundos a máxima potencia utilizando un homogeneizador PRO 200 (PRO Scientific). Los homogenatos obtenidos fueron incubados a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se llevó a cabo el aislamiento del RNA como lo detalla el fabricante, incubando las muestras alrededor de 16 horas en isopropanol a -20°C, para favorecer el precipitado de RNA pequeños como ser los miRNAs. El pellet de RNA total se secó a 60°C en intervalos de a 5 minutos hasta que los restos del etanol utilizado para los lavados se hubiera evaporado completamente, se resuspendió en 60 µl de H₂O libre de RNAsas, incubando las muestras durante 10 minutos a 55-60°C. El RNA se conservó a -80°C luego de evaluar la concentración y la pureza del mismo con NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

Para la extracción de RNA total proveniente de tejido adiposo (TA), después de la homogeneización, se realizó una centrifugación a 12000 g durante 10 min a 4°C para eliminar el exceso de lípidos que forma una capa en la superficie del homogenato. A continuación, se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se continuó con el paso de separación de fases como lo detalla el fabricante.

A partir de plasma (miRNAs circulantes)

El aislamiento de RNA total (incluidos los miRNAs) proveniente de plasma de ratones o de pacientes y VS se realizó utilizando Tri-Reagent (Molecular Research Center). A 200 µl de plasma se le agregaron 10 fmoles de un miRNA sintético (spike in = cel-miR-39-3p) y luego se le adicionaron 600 µl de Trireagent. Se homogeneizó, se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos y luego se agregaron 120 µl de cloroformo. Se agitó vigorosamente durante unos segundos y luego se incubó a temperatura ambiente durante 2 a 3 minutos. Luego de la incubación, se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos a 4°C. Luego se tomaron 350 µl de la fase acuosa, se le agregó 300 µl de isopropanol y se incubaron las muestras por aproximadamente 16 horas a -20°C. Al día

siguiente, se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con etanol 75% frío centrifugando luego de cada lavado a 7500 rpm durante 5 minutos a 4°C. Luego de los lavados, se dejó secar el pellet a 55-60°C durante unos minutos hasta que el etanol se hubiera evaporado completamente. Se resuspendió el pellet en 22 µl de agua libre de RNAsas y se incubó durante 10 minutos a 55-60°C. Las muestras luego se conservaron a -80°C. La concentración y pureza en este caso no se evaluó, dado que, al ser concentraciones muy bajas, el NanoDrop no llega a analizar la muestra con certeza.

Análisis de la expresión de miRNAs por Stem-loop RT-qPCR

Stem-loop RT-qPCR para miRNAs en tejido

La retrotranscripción se realizó utilizando el método Stem-Loop descrito en Chen et al (C. Chen et al., 2005) y el kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA). El cDNA se sintetizó a partir de 100 ng de RNA total, con una relación A260/A280 (pureza respecto de proteínas) mayor a 1,8 y una relación A260/A230 (pureza respecto de compuestos orgánicos) mayor a 1,6. Se mezclaron el RNA, agua libre de RNAsas y una mix de hasta 6 primers stem-loop específicos para cada miRNA (Tabla 4) (se utiliza 1 µl de cada primer STEM específico 1 µM), los cuales se utilizan para alargar el producto original de 22 a 60 nt (Figura 11), y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Luego se agregó una mix de 5 µl de Buffer 5X específico para la enzima, 1 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de la enzima RT. Se incubó luego durante 30 minutos a 16°C, paso clave para la técnica de stem-loop, luego 60 minutos a 42°C para la síntesis y 5 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Para realizar la qPCR, se utilizaron 1 o 2 µl de cDNA puro o diluido (1/40) obtenido mediante la RT, que se amplificaron en una mezcla de reacción 0.2 µl de EasyTaq DNA Polymerase 5U/µl (TransGen Biotech Co.), 2.5 µl de Buffer de reacción 10x, 1.25 µl de una mix de oligos Fw específico y Rv universal 2 µM, 0.5 µl de dNTPs 10 mM, 0.25 µl de SYBR Green (Sigma) y agua ROUX hasta completar un volumen total de reacción de 25 µl. La reacción de PCR se llevó a cabo en un equipo StepOne Plus (Applied Biosystems) o en un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El programa de amplificación se detalla a continuación:

94°C 2 min	
95°C 15 seg	
T annealing 20 seg	} 40 ciclos
72°C 25 seg	
Lectura fluorescencia	

Curva de “melting” de 60 a 95°C + 0,3° cada 6 seg

Cada reacción de qPCR se realizó por duplicado y la temperatura de annealing utilizada para los miRNAs se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4: Lista de oligos utilizados para la técnica de Stem-loop RT-qPCR a partir de tejido.

Oligo	Secuencia (5'-3')	T ann (°C)
RT-Stem-loop-Rv	TGGTGCAGGGTCCGAGGTATT	-
RT-hsa-miR-19b-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCAGTT	-
RT-hsa-miR-19b-3p Fw	GGCGGTGTGCAAAATCCATGC	65
RT-hsa-miR-320a-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCCGG	-
RT-hsa-miR-320a-5p Fw	GGCGGGCCAACACAACCCGGA	65
RT-hsa-miR-101-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTTCAGT	-
RT-hsa-miR-101-3p Fw	CGCGCGTACAGTACTGTGATA	62
RT-hsa-miR-3613-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCGGT	-
RT-hsa-miR-3613-3p Fw	CCGCCACAAAAAAAAGCCCA	65
RT-hsa-miR-1207-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCCCTC	-
RT-hsa-miR-1207-5p Fw	GGCGGTGGCAGGGAGGCTGG	65
RT-hsa-miR-5095-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCGGT	-
RT-hsa-miR-5095 Fw	GGCGCTTACAGGCGTGAACC	65
RT-hsa-miR-2277-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGACTGG	-
RT-hsa-miR-2277-5p Fw	GGCGGAGCGCGGGCTGAGCGCTG	65
RT-hsa-miR-4497-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGCCAG	-
RT-hsa-miR-4497 Fw	CGCGCTCCGGGACGG	65
RT-hsa-miR-320e-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCTTCT	-
RT-hsa-miR-320e Fw	GCGCGGAAAGCTGGGTTG	65
RT-hsa-miR-4532-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCCGG	-
RT-hsa-miR-4532 Fw	GAGACCCCGGGGAGC	65
RT-hsa-miR-4668-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGACAAA	-
RT-hsa-miR-4668-5p Fw	GGCGGAGGGAAGAAAAAAGGA	65
RT-hsa-miR-30b-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGCTGAG	-
RT-hsa-miR-30b-5p Fw	CCGCGCTGTAAACATCCTACAC	70
RT-hsa-miR-221-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGAAACC	-
RT-hsa-miR-221-3p Fw	GGCGGAGCTACATTGTCTGCTG	65
RT-hsa-miR-195-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGCCAAT	-
RT-hsa-miR-195-5p Fw	GGGGGGTAGCAGCACAGAAAT	65
RT-hsa-miR-21-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCAACA	-
RT-hsa-miR-21-5p Fw	CGGGGGGTAGCTTATCAGACTG	65
RT-hsa-miR-16-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCCAA	-
RT-hsa-miR-16-5p Fw	GGCCCGTAGCAGCACGTAAATA	65
RT-mmu-miR-133a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAGCTG	-
RT-mmu-miR-133a-3p Fw	CGGGCGGTTTGGTCCCCTTCAAC	65
RT-mmu-miR-1a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACATACAT	-
RT-mmu-miR-1a-3p Fw	CGGGCGGTGGAATGTAAAGAAG	67
RT-mmu-miR-29c-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTAACCG	-
RT-mmu-miR-29c-3p Fw	GCGGCGGTAGCACCATTGAA	62
RT-mmu-miR-18a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAGAAG	-
RT-mmu-miR-18a-3p Fw	GTCTACTGCCCTAAGTGCTC	65
RT-mmu-miR-148a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACACAAAG	-
RT-mmu-miR-148a-3p Fw	GGTATTCAGTGCCTACAG	62
RT-mmu-miR-223-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTGGGGT	-
RT-mmu-miR-223-3p Fw	GGGCGGCTGTCAGTTTGTC	65
RT-hsa-miR-191-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAGCTG	-
RT-hsa-miR-191-5p Fw	GCGGCAACGGAATCCAAAAG	70
RT-hsa-miR-103a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCATAG	-
RT-hsa-miR-103a-3p Fw	GGGAGCAGCATTGTACAGGG	67
RT-miR-Cel39-STEM	GTCTCCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAAGCT	-
RT-miR-Cel39 Fw	CGGGGTACCGGGGTGTAAATC	65

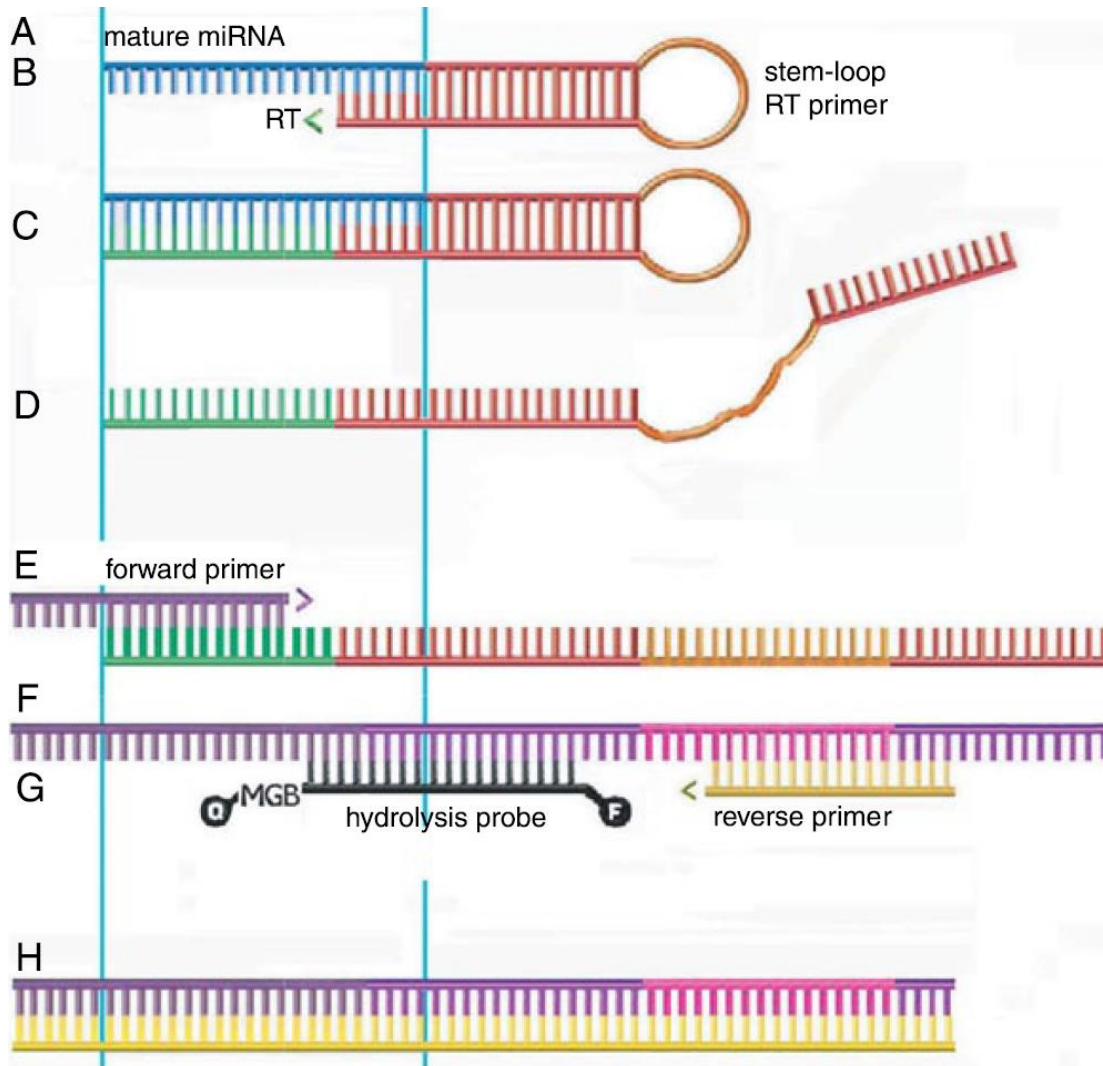


Figura 11: Stem-loop RT-qPCR. A) miRNA maduro (azul). A-H) Las líneas celestes muestran el límite de la secuencia del miRNA maduro dentro de las secuencias "extras" añadidas para realizar la RT y qPCR. Las puntas de flecha indican las direcciones de polimerización. B) 6 nucleótidos del primer stem-loop hibridan con el miRNA maduro. RT: retrotranscriptasa. C y D) primera cadena de cDNA luego de la polimerización (C) y luego de la desnaturalización por calor (D). E) El primer forward añade 5 nucleótidos. F) segunda cadena de cDNA. G) El primer reverse universal hibrida con la secuencia del stem-loop. H) Producto de PCR definido por los extremos 5' de los primers forward y reverse (Kramer, 2011).

El cálculo de los niveles de expresión de los miRNAs analizados se realizó por el método del delta-CT ($\Delta\Delta CT$), normalizando los niveles de expresión del miRNA de interés al miR-103a-3p o a la media geométrica del miR-191-5p y miR-103a-3p como se indicara en

cada gráfico. Para ello, utilizando el programa StepOne Software v2.3, se determinó el ciclo al cual cada muestra alcanzó el umbral de fluorescencia automático del programa (CT) (Current Protocols in Molecular Biology). Cabe destacar que el umbral automático del programa asegura que, en ese umbral, todas las muestras se encuentren en la fase exponencial de amplificación. Para cada muestra analizada, se determinó el promedio de los valores de CT para el miRNA a evaluar (X) y para el miRNA de expresión constitutiva (miRNA control de carga: miR-103a-3p o media geométrica del miR-191-5p y miR-103a-3p) de la siguiente manera:

$$\underline{CT} = \frac{CT_1 + CT_2}{2}$$

La diferencia en los valores de CT del miRNA X y del miRNA de expresión constitutiva para cada muestra determina el primer delta-CT (ΔCT). Esto se resume en la siguiente expresión:

$$\Delta CT = \underline{CT_{miRNA X}} - \underline{CT_{miRNA \text{ control de carga}}}$$

Finalmente, debido al exponente natural de qPCR, los valores son transformados a medidas relativas a los niveles de expresión del miRNA X de cada muestra normalizado con el miRNA constitutivo de la siguiente manera:

$$Exp_{relativa} = 2^{-\Delta CT}$$

Finalmente se calculó el valor promedio y desvío estándar de este valor obtenido en “n” réplicas biológicas.

En todos los casos se corrió el control negativo NRT (pool de RNA de todas las muestras de ratones) que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa.

Stem-loop RT-qPCR para miRNAs circulantes

La retrotranscripción se realizó utilizando el método Stem-Loop descrito en Chen et al (C. Chen et al., 2005) y el kit M-MLV Reverse Transcriptase (PROMEGA). A diferencia de lo descrito para el tejido, en el caso de miRNAs circulantes, el cDNA se sintetizó a partir de 4 µl de RNA total. Luego, se mezcló el RNA con agua libre de RNAsas y una mix de hasta 6 oligos stem-loop específicos para cada miRNA (Tabla 5) (se utiliza 1 µl de cada

primer STEM específico), los cuales se utilizan para alargar el producto original de 22 a 60 nt (Figura 11), y se incubaron a 70°C por 5 minutos. Posteriormente se agregó una mix de 4 µl de Buffer 5X específico para la enzima, 1 µl de dNTPs 10 mM y 1 µl de la enzima RT. A continuación, se incubó durante 30 minutos a 16°C, paso clave para la técnica de stem-loop, luego 60 minutos a 42°C para la síntesis y 5 minutos a 70°C para inactivar la enzima.

Para realizar la qPCR, se utilizó 1 µl de cDNA puro, 3.5 µl de agua ROUX, 0.5 µl de una mix de oligos Fw específico del miRNA que se quiere detectar y Rv universal que se aparea con el stem-loop y 5 µl de la mix FastStart Universal SYBR Green Master (ROCHE). La reacción de PCR se llevó a cabo por duplicado en un equipo CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad). El ciclado de amplificación se detalla a continuación:

50°C 2 min	
95°C 10 min	
95°C 15 seg	
T annealing 15 seg	} 40 ciclos
60°C 1 min	
Lectura fluorescencia	
72°C 1 min	
Curva de "melting" de 60 a 95°C + 0,3° cada 6 seg	

Tabla 5: Lista de oligos utilizados para la técnica de Stem-loop RT-qPCR a partir de plasma.

Oligo	Secuencia (5'-3')	T _{ann} (°C)
RT-Stem-loop-Rv	TGGTGCAAGGTCAGGATT	-
RT-hsa-miR-19b-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCAGTT	-
RT-hsa-miR-19b-3p Fw	GGCGGTGTGCAAATCCATGC	65
RT-hsa-miR-101-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTTCAGT	-
RT-hsa-miR-101-3p Fw	CGCGGTACAGTACTGTGATA	62
RT-hsa-miR-3613-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCGGT	-
RT-hsa-miR-3613-3p Fw	CCGGCCACAAAAAAGCCCA	65
RT-hsa-miR-1207-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCCCTC	-
RT-hsa-miR-1207-5p Fw	GGCGGTGGCAGGGAGGCTGG	65
RT-hsa-miR-2277-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGACTGG	-
RT-hsa-miR-2277-5p Fw	GGCGGAGCGCGGCTGAGCGCTG	65
RT-hsa-miR-4532-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCGCCGG	-
RT-hsa-miR-4532 Fw	GAGACCCGGGGAGC	65
RT-hsa-miR-4668-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGACAAA	-
RT-hsa-miR-4668-5p Fw	GGCGGAGGGAAAAAAGGA	65
RT-hsa-miR-221-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACGAAACC	-
RT-hsa-miR-221-3p Fw	GGCGGAGCTACATTGTCTGCTG	65
RT-hsa-miR-21-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTCAACA	-
RT-hsa-miR-21-5p Fw	CGGGGGGTAGCTTATCAGACTG	65
RT-mmu-miR-133a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCACTG	-
RT-mmu-miR-133a-3p Fw	CGGGCGGTTTGGTCCCTTCAAC	65
RT-mmu-miR-1a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACATACAT	-
RT-mmu-miR-1a-3p Fw	CGGGCGGTGGAATGTAAAGAAG	67
RT-mmu-miR-29c-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTAACCG	-
RT-mmu-miR-29c-3p Fw	GCGGCGGTAGCACCATTGAA	62
RT-mmu-miR-18a-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAGAAG	-
RT-mmu-miR-18a-3p Fw	GTCTACTGCCCTAAGTGCTC	65
RT-mmu-miR-223-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTGGGGT	-
RT-mmu-miR-223-3p Fw	GGGCGGCTGTCAGTTTGTC	65
RT-hsa-miR-101-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTTCAGT	-
RT-hsa-miR-101-3p Fw	CGCGGTACAGTACTGTGATA	62
RT-hsa-miR-214-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACTGCC	-
RT-hsa-miR-214-3p Fw	GCGACAGCAGGCACAGACAG	62
RT-hsa-miR-324-3p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAGCAGC	-
RT-hsa-miR-324-3p Fw	GTCTGCCACTGCCCAGG	65
RT-hsa-miR-181d-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACACCCAC	-
RT-hsa-miR-181d Fw	GGGCGAACATTATTGTTGTCGG	65
RT-hsa-let-7a-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAACCTAT	-
RT-hsa-let-7a-5p Fw	CGCGCTGAGGTAGTAGGTTGTG	65
RT-hsa-let-7c-5p-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACAACCAT	-
RT-hsa-let-7c-5p Fw	CGGCGTGAGGTAGTAGGTTGTG	65
RT-miR-Cel39-STEM	GTCTCCTCTGGTGAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGGAGACCAAGCT	-
RT-miR-Cel39 Fw	CGGGGTCACCGGGTGTAATC	65

El cálculo de los niveles de expresión de los miRNAs analizados se realizó mediante el método del $\Delta\Delta CT$ como se mencionó anteriormente, normalizando los niveles de expresión del miRNA de interés al cel-miR-39-3p. En todos los casos se corrió el control negativo NRT (pool de RNA de todas las muestras de pacientes y voluntarios) que había sido incubado en las condiciones de la reacción de RT, pero en ausencia de la enzima retrotranscriptasa. Finalmente se calculó el valor promedio y desvío estándar de este valor obtenido en “n” réplicas biológicas.

Análisis estadístico y representación gráfica de los resultados

Todos los experimentos fueron analizados como se indica en cada caso utilizando los programas GraphPad 8.0.1 y RStudio 1.4.1106. La significancia estadística fue del 5% en todos los casos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el uso del software R versión 4.0.5., utilizando las librerías indicadas en el próximo capítulo. Los gráficos representan el promedio de los experimentos realizados con su desvío estándar normalizado al control o la distribución de las muestras utilizando boxplots graficando la mediana y los rangos intercuartílicos, según corresponda en cada caso. Para evaluar normalidad y homogeneidad de varianzas se utilizaron Shapiro-Wilks y el test de Levene respectivamente. En caso de cumplirse los supuestos, se utilizó la Prueba T-Student, en caso contrario Mann-Whitney, Wilcoxon o el test de la mediana fueron utilizados.

CAPÍTULO 3

MUESTRAS DE PACIENTES, MICROARREGLOS DE EXPRESIÓN DE miRNAs, SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS BIOINFORMÁTICOS

Diseño del estudio y enrolamiento de individuos

Se enrolaron pacientes con CaP y voluntarios sanos (VS) entre enero del 2017 y diciembre del 2021. Los Comités de Ética de las instituciones revisaron y aprobaron la recolección de muestras de sangre y la recopilación de datos clínicos y patológicos de los pacientes y VS. El estudio se condujo de acuerdo a los principios éticos para investigación médica delineados en la Declaración de Helsinki, y se obtuvieron consentimientos informados (CI) firmados de todos los pacientes y VS. Se establecieron y aprobaron los protocolos clínicos con el Instituto Fleming (CABA) (25/06/2019) y Hospital Municipal de Vicente López “Prof. Dr. Bernardo Houssay” (GBA) (19/04/2021) para enrolar pacientes con diagnóstico de CaP. Los criterios preestablecidos de inclusión para el estudio fueron: Pacientes de cualquier edad con diagnóstico de adenocarcinoma de próstata documentado con o sin informe de anatomía patológica, que no hayan sido sometidos a cirugía y/o terapia (quimioterapia o radiación). El estadio tumoral de los pacientes con CaP se estableció de acuerdo al grado de Gleason (Gleason, 1966). Por otro lado, se establecieron protocolos para VS en el Hospital Militar Central Dr. Cosme Argerich (CABA) (7/07/2017). Los criterios de inclusión fueron hombres mayores de 18 años que no poseen diagnóstico previo o actual de cáncer. Luego de la firma del CI el/la médico/a interviniente completó un anexo con datos filiatorios y clínicos de los pacientes y VS y extrajo una muestra de sangre. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción venosa (un mínimo de 8 ml y hasta un máximo de 15 ml), la cual se colocó en tubos estériles libres de RNAsas que contenían 1 mL de EDTA 0.5 M pH 8. Las muestras fueron transportadas con triple envoltorio al IBYME. Una vez que las muestras arribaron al laboratorio de Oncología Molecular y Nuevos Blancos Terapéuticos, se procedió a la codificación de las mismas. La codificación de las muestras se llevó a cabo por el responsable a cargo de la investigación básica, que cambió en forma totalmente confidencial, el nombre, apellido y DNI del paciente por un código alfa-numérico previamente diseñado. A partir de dicho momento los demás investigadores o colaboradores que tuvieron acceso a dichas muestras no accedieron a la identidad de cada paciente. Únicamente el responsable clínico y el responsable científico tuvieron acceso a la base de datos completa. Luego, se aisló el plasma mediante centrifugación de la sangre a 2000 rpm durante 10 minutos, se alicuotaron las muestras y almacenaron

a -70 °C bajo llave. Se separaron a los pacientes y VS en distintas cohortes: una cohorte exploratoria, donde se incluyó el suero de 11 pacientes con CaP y 24 VS, y el plasma de 6 pacientes con CaP y 4 de VS, y una cohorte validatoria, donde se incluyeron 65 pacientes con CaP y 68 VS. Las características clinicopatológicas para cada individuo enrolado en este estudio se pueden encontrar en la **Tabla suplementaria 1 del Anexo** (pacientes con CaP y VS).

Microarreglos de expresión de miRNAs (Affymetrix)

La metodología y el diseño del microarreglo de expresión de miRNAs con muestras de pacientes con CaP y VS se encuentran reportados en la tesis doctoral de Guillermo Nicolás Dalton 2018 (Tesis Doctoral Guillermo Nicolás Dalton, 2018).

Secuenciación de miRNAs

Para la secuenciación de miRNAs, 1 mL de plasma de 6 pacientes con CaP y 4 VS fue enviado a GenoHub (REAL SEQ BIOSCIENCES INC, USA). Allí los miRNAs fueron aislados, secuenciados y analizados comparando entre CaP y VS utilizando los siguientes sistemas y sus versiones: Ubuntu 18.04.2 LTS x86_64-pc-linux-gnu (64-bit), R versión 3.6.0 -- "Planting of a Tree", FastQC v0.11.5, cutadapt versión 2.3, bowtie versión 1.2.2, DESeq2_1.22.2, Rsubread_1.32.4, BiocParallel_1.16.6, Ggplot2_3.1.0. El listado de miRNAs correspondientes a la secuenciación fue luego comparado con los miRNAs candidatos obtenidos del microarreglo de expresión, tal como se describe en la sección de Resultados (Capítulo 3, Figura 62).

Desarrollo de modelos estadísticos

Selección del modelo

- **Variables predictoras**

Se utilizaron 5 variables predictoras, que fueron la expresión de 5 miRNAs analizados mediante Stem-loop RTqPCR en plasma de pacientes con o sin CaP a listar: hsa-miR-101-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-324-3p y hsa-miR-181d-5p.

- **Análisis de datos y estadístico**

Se realizó un análisis descriptivo de los datos. Se evaluó la distribución de los datos, y se eligió transformar las variables predictoras utilizando el logaritmo en base 10, dado que presentaban distribuciones muy asimétricas. Al momento de armar el modelo predictivo, dado que uno de los objetivos del presente trabajo fue elegir el modelo que mejor prediga y no el que mejor explique el comportamiento de los datos, si bien se evaluaron todos los parámetros, se eligió el modelo que mejor sensibilidad tuviera, sin tener en cuenta la colinealidad de las variables. En cuanto a la selección de variables para ser incluidas en el modelo, se utilizaron 2 abordajes: i) seleccionar los miRNAs de acuerdo importancia de estas en el modelo, a partir de un valor p asociado ii) se seleccionaron mediante el AUC asociado a cada miRNA por separado.

La significancia estadística fue del 5%. Los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el software R versión 4.0.5. Los paquetes utilizados se mencionan a continuación: ggplot2, Rmisc, psych, car, “nlme”, emmeans, multcompView, readxl, Proc, ROCit, tidyverse, glmnet, caret, tableone, dplyr, ggpubr, kableExtra, ResourceSelection, InformationValue, gridExtra, foreach, boot, randomForest, epiDisplay, jtools, ggstance, sjPlot, sjlabelled, sjmisc, rstatix, broom, mgcv.

Análisis bioinformático

Bases de datos públicas

- **XENA**

Los datos de expresión génica y de expresión de miRNAs maduros a partir de tejido de CaP (n=497) y tejido normal adyacente (TNA) (n=52) de pacientes y de próstatas normales (PN) (n=100) se obtuvieron de la cohorte de pacientes incluidas en el proyecto TCGA Prostate Cancer (PRAD) o en el proyecto GTEx, disponibles en la herramienta bioinformática UCSC Xena (<https://xena.ucsc.edu/>) (Goldman et al., 2020). Los valores de expresión de miRNAs y de RNA, medido mediante miRNA-seq [miRNA-Seq (IlluminaHiSeq_miRNASeq)] o RNA-seq [RNAseq (IlluminaHiSeq)], se informaron como log2 (LPM+1) siendo LPM la abreviatura de lecturas por millón. En este trabajo, al evaluar la expresión entre TNA y CaP se utilizaron 52 muestras de cada tejido las cuales se encuentran pareadas. Al momento de evaluar solamente la correlación entre la

expresión de los miRNAs y sus genes blanco en los tumores de CaP se utilizaron 495 muestras.

Al momento del análisis estadístico, la normalidad se evaluó utilizando Shapiro-Wilk, y la homogeneidad de varianzas se evaluó analizando los boxplots. Para analizar los datos pareados, se utilizó la prueba-T pareada cuando los datos así lo permitieron. Cuando no se cumplieron los supuestos, se utilizó el test de Wilcoxon. Se utilizó un nivel de significancia del 5%. Los análisis fueron llevados a cabo con el software R y graficados utilizando GraphPad Prism 8.0.1.

- **Gene Expression Omnibus (GEO)**

Para el análisis del perfil de expresión de miRNAs en pacientes con CaP metastásico y CaP no metastásico se utilizaron los resultados de secuenciación de nueva generación del miRNoma completo del trabajo de Nam (Nam et al., 2018). disponibles en el repositorio público Gene Expression Omnibus (GEO) (GSE117674). Se utilizó una cohorte de 19 pacientes con diagnóstico de metástasis después de una prostatectomía radical (CaPM) y 19 pacientes sin evidencia de recurrencia de la enfermedad (CaP). El GSE117674 fue generado por secuenciación de alto rendimiento Ion Torrent S5 XL (Homo sapiens).

Por otro lado, se analizó el perfil de expresión de miRNA circulante en la sangre periférica de una cohorte de pacientes con diabetes tipo 2 (n=6) y voluntarios sanos (VS) (n=4) utilizando datos de microarreglos de expresión disponibles de GSE27645. Los datos de intensidad de señal normalizados fueron descargados. GSE27645 fue generado por miRCURY LNA microRNA Array, v.11.0.

Para el estudio de la expresión de miRNAs en circulación de pacientes con CaP y VS, se utilizaron datos de expresión a partir una secuenciación y microarreglo de expresión de miRNAs de suero y plasma, respectivamente, de dos cohortes diferentes. Se utilizaron 282 pacientes con CaP y 282 VS (GSE112264), y 27 pacientes con CaP y 27 VS (GSE113234).

La normalidad de los datos y la homogeneidad de las varianzas se evaluaron mediante la prueba de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene. Cuando los supuestos se cumplieron, se

utilizó Prueba T-Student, y cuando no se cumplieron Mann-Whitney o el test de la mediana fue utilizado.

- **miTED**

Para analizar los niveles de expresión de los miRNAs en tumores de pacientes con CaP y CaP resistente a la castración (CaPRC), se utilizó la herramienta bioinformática miTED (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/mited/#/expressions>). Esta herramienta permite estudiar la expresión de miRNAs en tejidos y líneas células de interés. A partir de la misma se obtuvieron de los datos del archivo de lectura de secuencia (ALS) (PRJDB5095). En el presente estudio se incluyeron 3 muestras de PCa y 3 de CaRPC, cuyos datos se descargaron como valores log2 (LPM). Debido al pequeño número de pacientes incluídos en este estudio, para comparar la expresión entre las muestras de CaP y CaPRC, se realizó el test de Mann-Whitney (prueba-T no paramétrica). Se utilizó un nivel de significancia del 5%.

- **EVmiRNA**

Para evaluar el perfil de expresión de miRNAs en exosomas, se utilizó la base de datos de miRNA de vesículas extracelulares (EVmiRNA) (Liu et al., 2019) (<http://bioinfo.life.hust.edu.cn/EVmiRNA>). Los niveles de expresión de hsa-miR-101-3p en exosomas del torrente sanguíneo de pacientes con CaP (n = 23) y VS (n = 58) se descargaron y representaron en un heatmap usando los paquetes del software R: heatmap.plus, gplots y RColorBrewer.

Análisis de componentes principales (PCA)

El listado de los genes blanco predichos del hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p fueron descargados de la herramienta bioinformática microT-CDS disponible en DIANA-mirPath v.3 (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php?r=mirpath>) (Vlachos et al., 2015). Para identificar los genes blanco en común, se utilizó el diagrama de Venn (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>).

Para la lista de genes compartidos obtenida, los valores de expresión génica fueron descargados de TCGA PRAD y de GTEx mencionados anteriormente. El análisis de componentes principales (PCA) fue realizado para determinar la distribución de las

muestras de CaP (n=495), PN (n=100) y TNA (n=52) basadas en la expresión de los 38 genes blanco predichos que comparten los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p. Finalmente para los gráficos de PCA, se utilizó el software R, en particular se utilizó la función “prcomp” incluida dentro del paquete stats (versión 4.0.5). Se determinó la variabilidad comprendida entre las distintas dimensiones, y se eligió graficar las primeras dos componentes, dado que entre ellas sumaban aproximadamente el 42% de la variabilidad total explicada por dicho análisis. A su vez, se graficó el bi-plot, gráfico que se utiliza para ver el aporte de cada una de las variables a las componentes. En particular en este caso, cada variable es un gen de los 38 utilizados.

Análisis de curvas ROC

Para evaluar el poder de los miRNAs y genes seleccionados para distinguir entre CaP y TNA, y entre CaPM y CaP no metastásico, se realizó un análisis de curvas ROC utilizando los datos de expresión disponibles en los conjuntos de datos TCGA-PRAD y GEO mencionados anteriormente. Se graficaron y calcularon la curva ROC, el área bajo la curva (AUC), la sensibilidad, la especificidad y el punto óptimo para los miRNAs, genes y su combinación según corresponda, usando la función del software R “roc” del paquete pROC (versión 4.0.5)

Análisis de enriquecimiento funcional

Para identificar los genes blanco experimentalmente validados modulados por los miRNAs hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-1207-5p, miR-3613-3p y miR-2277-5p, se utilizó la herramienta bioinformática DIANA TARBASE v8 (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/diana/web/index.php?r=tarbasev8%2Findex>) (Karagkouni et al., 2018). Mientras que para identificar los genes blanco predichos de los miRNAs hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p se usó la herramienta bioinformática microT-CDS disponible en DIANA-mirPath v.3 (<https://dianalab.e-ce.uth.gr/html/mirpathv3/index.php?r=mirpath>) (Vlachos et al., 2015). Luego, se realizó el análisis de enriquecimiento funcional a partir de los genes blanco de los miRNAs seleccionados, utilizando la herramienta DIANA-mirPath v.3. Por otro lado, para establecer los términos y las vías de señalización, se utilizaron aquellos pertenecientes a KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) y GO (Gene Ontology). Se seleccionaron los primeros 10 o 25 términos estadísticamente

significativos (Valor $p < 0,01$ o Valor $p < 0,05$), según corresponda. Con los resultados obtenidos se construyó un dot-plot utilizando el paquete ggplot2 del software R.

Por otro lado, para explorar el papel funcional de los genes blanco del hsa-miR-19b-3p y el miR-101-3p por separado, e identificar las vías reguladas, se realizó un análisis de enriquecimiento de la vía KEGG utilizando la herramienta bioinformática DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://david.ncifcrf.gov/>). Solo se analizaron los términos significativamente enriquecidos (Valor $p < 0,05$).

Matriz de correlación

Para identificar la correlación entre los genes blanco y los miRNAs en CaP, datos de expresión génica y de los miRNA se obtuvieron a partir de tumores de pacientes con CaP (n=495) pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD utilizando la herramienta XENA como fue explicado anteriormente. Se realizó una matriz de correlación entre los genes y los miRNAs seleccionados utilizando el software R, en particular el paquete Hmisc, y se calculó el coeficiente de correlación de Spearman y su significancia estadística. Para el hsa-miR-19b-3p, los genes blanco que mostraron una correlación negativa con el miRNA con un coeficiente de correlación $\rho < -0,4$ y un pValor $< 0,05$ fueron seleccionados para un análisis posterior. Además, se seleccionaron genes blanco que se correlacionaron negativamente con el hsa-miR-101-3p con un coeficiente de correlación $\rho < -0,2$ y un pValor $< 0,05$. En el caso de los miRNAs hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p se seleccionaron los genes blanco con un coeficiente de correlación ρ negativo y un pValor $< 0,05$ para su posterior análisis. Finalmente, para la representación gráfica de la matriz de correlación se utilizó la función del software R “chart.Correlation” del paquete PerformanceAnalytics (versión 4.0.5).

Análisis de agrupamiento y base de datos STRING

Para estudiar la relación entre los genes blanco seleccionados de los miRNAs hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p, se realizó un análisis de conglomerados jerárquico con "promedio" como método de aglomeración utilizando la función “hclust” del paquete stats del software R (versión 4.0.5). Además, se realizó un análisis de interacción génica utilizando la base de datos STRING (<https://string-db.org/>).

Análisis integrado de la expresión de miRNAs maduros y metilación de promotores

La metilación del promotor Hsa-miR-1-2/miR-133a-1 y miR-1-1/miR-133a-2 se evaluó en 52 muestras pareadas de CaP y TNA de la cohorte TCGA-PRAD. Los datos de metilación del DNA (Illumina Infinium HumanMethylation450) se descargaron como valor beta mediante el recurso UCSC Xena. Se empleó el navegador Ensembl (<http://www.ensembl.org>) para identificar los genes codificantes de los miRNAs mencionados: MIR1-2: chr18:19,408,965-19,409,049, MIR133A1: chr18:19,405,659-19,405,746, MIR1-1: chr20: 62 554 306-62 554 376, MIR133A2: chr20:62 564 912-62 565 013. Las sondas de metilación dirigidas a las regiones promotoras de los miRNAs se identificaron mediante el mapeo de 5000 pares de bases río arriba de los sitios de terminación de la transcripción (TSS) de los miRNAs (hsa-miR-1-2/miR-133a-1 promotor: chr18:19,409,049-19,414,049, hsa-miR-1-1/miR-133a -2 promotor: chr20:62,554,306-5000-62,544,306). La correlación entre la metilación del promotor y la expresión del miRNA maduro se evaluó mediante un análisis de correlación de Spearman en 497 muestras de CaP utilizando GraphPad Prism 8.0.1.

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

LA DIETA GRASA AUMENTA LA EXPRESIÓN DE oncomiRs EN TUMORES DE CÁNCER DE PRÓSTATA INSENSIBLE A ANDRÓGENOS

Los primeros dos objetivos específicos del presente trabajo de tesis doctoral se basaron en identificar el perfil de expresión de miRNAs en tumores, tejido adiposo (TA) y sangre periférica en modelos animales con CaP y un estado similar al SM. A su vez, el tercer objetivo específico consistió en establecer nuevos biomarcadores candidatos en biopsias líquidas de pacientes con CaP. En este primer capítulo, desarrollamos el primer objetivo específico para lo cual se utilizó un modelo de ratones NOD Scid Gamma (NSG) que fueron alimentados de manera crónica con dieta grasa (DG) o dieta control (DC) e inoculados con células de CaP humanas PC3 insensibles a androgenos. A partir del análisis de expresión de los tumores generados en esos animales, se seleccionó una firma de miRNAs aumentados en tejido tumoral de ratones DG en comparación con ratones DC, y se analizaron las vías moleculares en las que éstos se encontraban involucrados. Además, se estudio la relevancia de estos hallazgos en muestras de tejidos tumorales y sangre periférica de pacientes con CaP obtenidos de repositorios públicos. De esta manera se identificaron dos miRNAs que estaban aumentados tanto en tumores murinos DG en comparación con DC, como en suero de pacientes con CaP *versus* donantes sanos, en tumores humanos con respecto a los tejidos no tumorales y en tumores de pacientes con CaP metastásico comparado con tumores de pacientes sin metástasis. Además, utilizando un análisis de curvas ROC, se evaluó la capacidad del biomarcador diagnóstico para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP de ambos miRNAs seleccionados. Luego, a partir de herramientas bioinformáticas, se establecieron los genes blanco correspondientes a cada uno de los 2 miRNAs seleccionados, y se analizó la correlación entre la expresión de los miRNAs y los genes identificados utilizando bases de datos públicas. Posteriormente, se analizaron las vías en las que se encontraban los genes blanco que mostraron tener una correlación negativa con su respectivo miRNA. Finalmente, se seleccionaron las vías significativamente enriquecidas y los genes involucrados en ellas. Se realizó un análisis de agrupamiento para de los mismos en tumores y TNA.

Descripción del modelo murino utilizado

Se desarrolló un modelo murino de CaP insensible a andrógenos utilizando ratones machos NOD SCID Gamma (NSG) de 4 semanas de edad. Los mismos fueron aleatorizados en 2 grupos y se alimentaron *ad libitum* durante 20 semanas con una DC o una DG. Al cabo de 16 semanas de dieta, los ratones fueron inoculados con células de CaP humanas PC3, tal como se observa en la Figura 12. Luego de 4-6 semanas post-inoculación los animales fueron sacrificados y se colectó sangre vía intracardíaca la cual se dejó coagular para separar la fracción plasmática del suero y muestra tumoral.

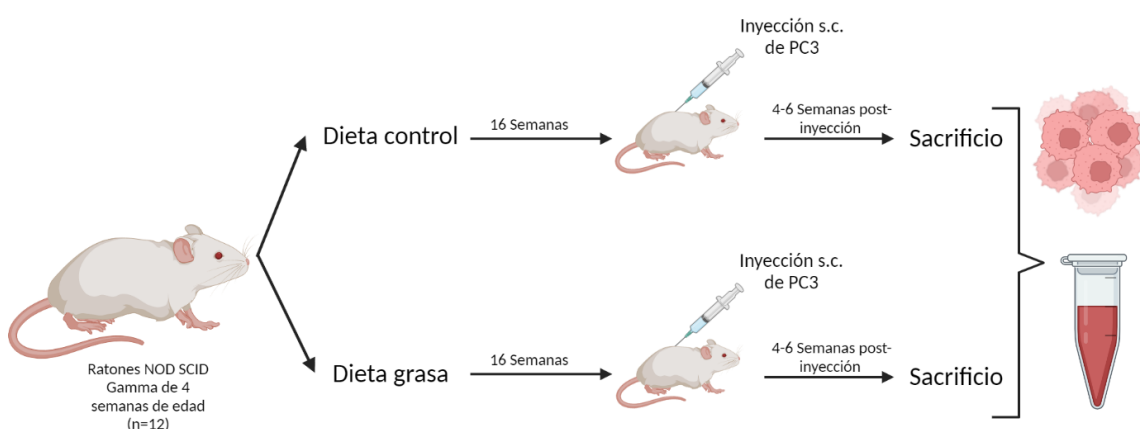


Figura 12: Esquema del modelo murino desarrollado. Ratones machos NSG de cuatro semanas de edad fueron alimentados de manera crónica con una DC o DG (n=6 por grupo) durante 20-22 semanas. A la semana 16 de dieta, los ratones fueron inoculados en el flanco izquierdo de manera subcutánea con $4,5 \times 10^6$ de células humanas de CaP insensibles a andrógenos PC3. Luego de 4-6 semanas post-inyección, los ratones fueron sacrificados y se colectaron tumores y sangre vía intracardíaca para su posterior análisis.

La DG induce la expresión de miRNAs en xenotransplantes de PC3

Como se mencionó en la Introducción, estudios previos de nuestro laboratorio informaron diferentes modelos de CaP y SM en ratones (Dalton et al., 2019; Massillo et al., 2019, 2020; Porretti et al., 2018). Nuestro grupo ha identificado varios enlaces moleculares que asocian el CaP y SM, incluyendo al corregulador transcripcional la proteína 1 de unión al extremo C-terminal (CTBP1) (Dalton et al., 2019; Massillo et al., 2019; Moiola et al., 2014; Porretti et al., 2018). En particular, utilizando microarreglos

de expresión de miRNAs a partir de xenotransplantes obtenidos por inyección de células tumorales de próstata PC3 que tienen disminuida la expresión de CTBP1 o células control en ratones alimentados con DC o DG, se encontró que la depleción de CTBP1 disminuye la expresión miRNAs relacionados con la adhesión celular, mientras que otro miRNAs eran modulados por la DG (Dalton et al., 2019). Además, se vio que CTBP1 y la DG reducen los niveles plasmáticos del hsa-miR-30b-5p en ratones NGS (Dalton et al., 2019). En base a estos resultados, en este trabajo de tesis se decidió estudiar el efecto de la DG en el perfil de expresión de los miRNAs en el CaP. Para ello, se generó un modelo murino inmunodeficiente de CaP y un estadio similar al SM. Ratones NGS alimentados crónicamente con DG o DC fueron inoculados de manera subcutánea con células PC3 insensibles a andrógenos. Entre 4 y 6 semanas después de la inoculación celular, se sacrificaron los ratones, se recogió el plasma y se extirpó el tumor para el aislamiento del RNA. Tal como se describió en trabajos anteriores de nuestro grupo (Dalton et al., 2019), no se observaron diferencias significativas en cuanto al crecimiento tumoral y el peso corporal entre los tratamientos (Figura 13).

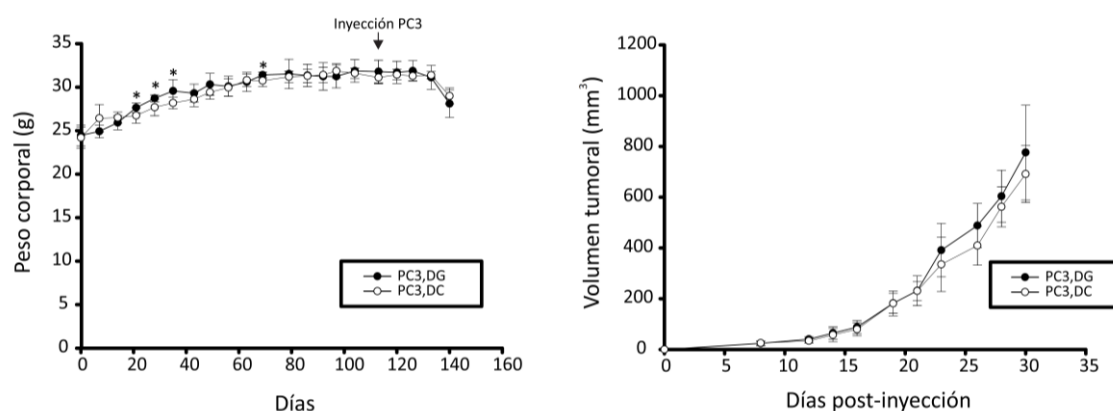


Figura 13: Modelo de CaP y DG. Se alimentaron ratones NSG de cuatro semanas de edad con DC o DG durante todo el experimento. El peso corporal se midió una vez a la semana y en la semana 16 de la dieta, los ratones se inocularon en el flanco izquierdo con células PC3. El tamaño del tumor se midió tres veces por semana.

Se seleccionó un conjunto de miRNAs a partir de la literatura y nuestros trabajos previos (Dalton et al., 2019; Massillo et al., 2020) y se evaluó mediante la técnica de RT-qPCR.

Como se muestra en la Figura 14, los xenotransplantes de próstata de ratones alimentados con DG mostraron un aumento significativo en la expresión de 7 miRNAs que llamamos "candidatos": hsa-miR-19b-3p, miR-320a-5p, miR-101-3p, miR-3613-3p, miR-1207-5p, miR-5095 y miR-2277-5p, en comparación con ratones alimentados con CD. No se detectaron cambios en la expresión de los siguientes miRNAs: hsa-miR-4497, miR-320e, miR-4532, miR-4668-5p, miR-30b-5p, miR-221-3p, miR-195-5p, miR-21-5p y miR-16-5p (Figura 14).

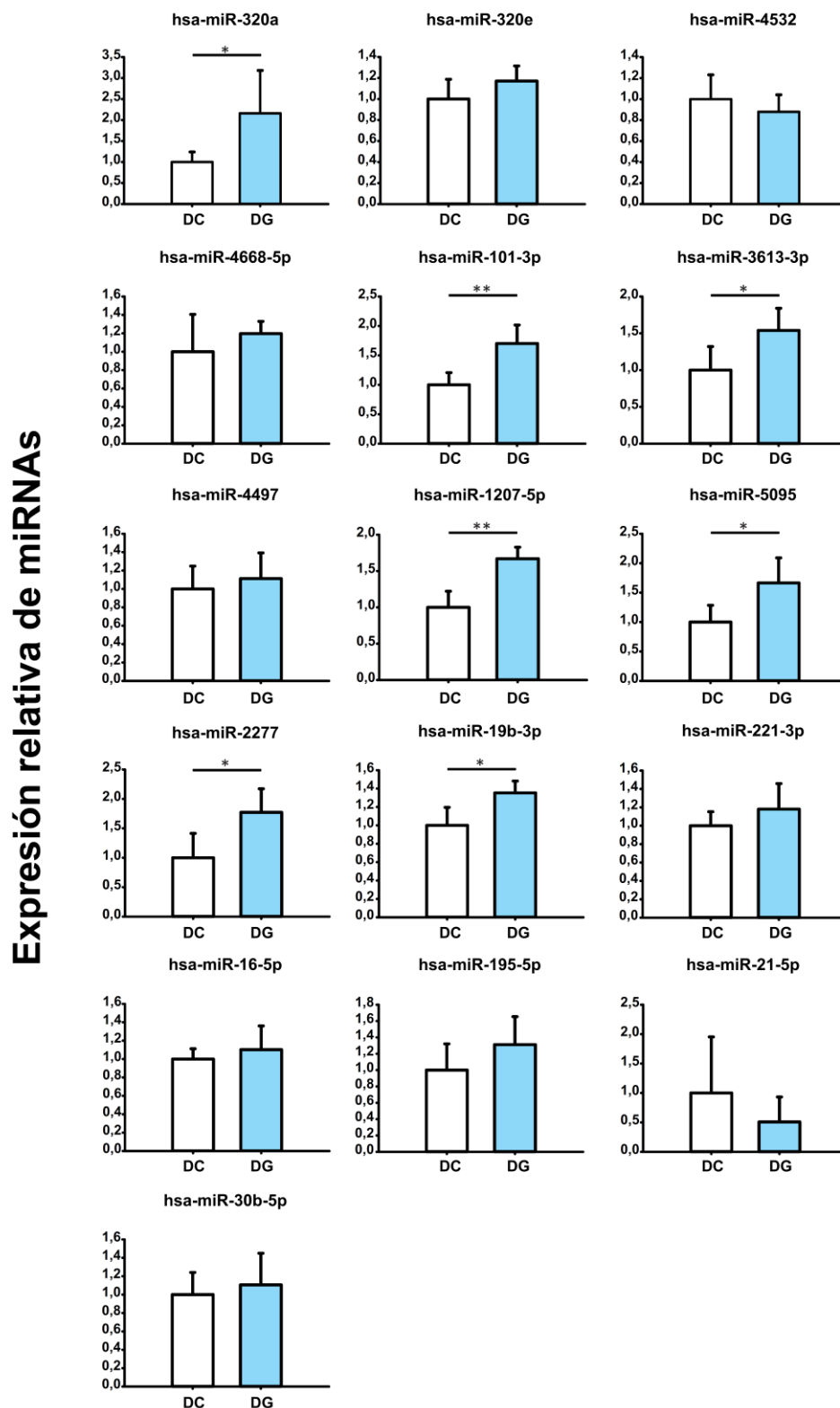


Figura 14: La DG modula la expresión de miRNAs en tumores de próstata insensibles a andrógenos. Se muestra la RT-qPCR Stem-loop de xenotransplantes de PC3 obtenidos de ratones NSG alimentados con DC o DG utilizando primers específicos para los miRNAs indicados.

Los datos se normalizaron al hsa-miR-103a 3p y DC. El análisis estadístico se realizó utilizando una prueba-T.

Además, se determinó el perfil de expresión de los miRNA candidatos en el torrente sanguíneo de los ratones. Como se muestra en la Figura 15, se detectaron en plasma 9 miRNAs: hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-3613-3p, miR-1207-5p, miR-2277-5p, miR-4532, miR-4668-5p, miR-221-3p y miR-21-5p. Curiosamente, el hsa-miR-2277-5p y miR-21-5p se encontraron significativamente disminuidos en el plasma de ratones DG en comparación con los animales de control (Figura 15). El hsa-miR-320^a-5p, miR-5095, miR-4497 y miR-320e fueron indetectables en plasma de ratones.

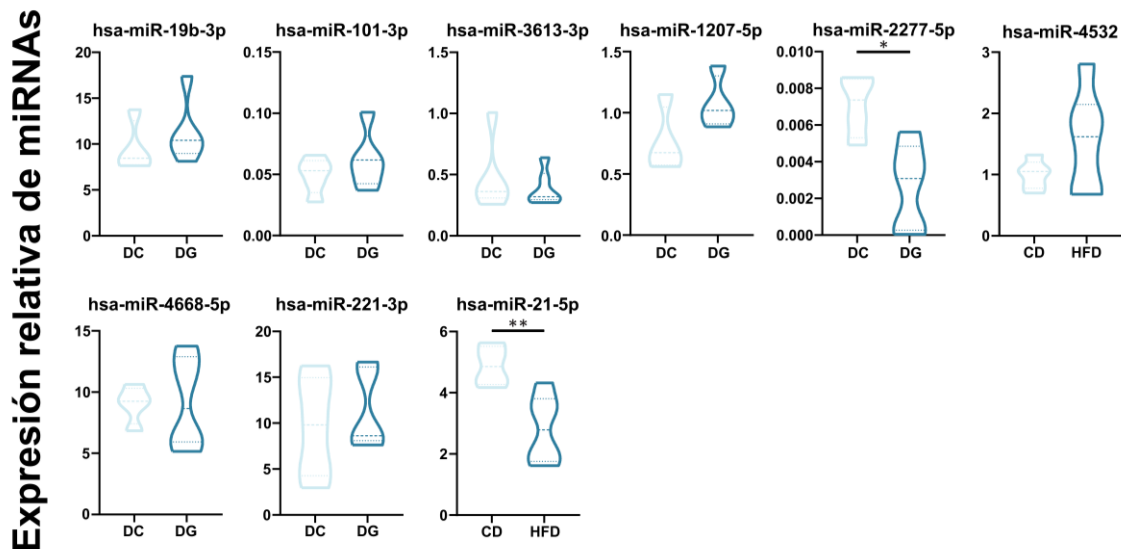


Figura 15: La DG modula la expresión de miRNAs en el plasma de ratones con CaP insensible a andrógenos. Las muestras de plasma de ratones se analizaron mediante stem-loop RT-qPCR para los miRNAs indicados y se normalizaron al miRNA sintético añadido, cel-miR-39. Se grafica $2\Delta Ct$ (valor de $\Delta Ct = Ct_{cel-39} - Ct_{sample}$). Los datos se analizaron mediante la prueba-T.

Los miRNAs candidatos modulan vías metabólicas específicas y relacionadas con cáncer

Para investigar los mecanismos funcionales de los 7 miRNAs candidatos, se utilizó la herramienta bioinformática DIANA-miRPath v3. Dado que no todos los genes blanco

predichos por los algoritmos bioinformáticos finalmente resultan ser blanco verdaderos, se usó DIANA-TarBase v7 de la herramienta bioinformática miRPath, que posee la información de los genes blanco validados experimentalmente para cada miRNA. Cinco de los 7 miRNA candidatos mostraron tener genes blanco validados, mientras que el hsa-miR-5095 no tenía genes blanco y miR-320a-5p no se encontró en la herramienta DIANA-miRPath v3, por lo que no se lo consideró en los análisis posteriores (Figura 16). Los miRNA Hsa-miR-19-3p y miR-101-3p fueron los miRNA que mostraron el mayor número de genes blanco, con más de 1100 genes validados (Figura 16).

miRNAs aumentados por DG	# genes blanco validados
hsa-miR-19b-3p	1326
hsa-miR-101-3p	1137
hsa-miR-1207-5p	277
hsa-miR-3613-3p	226
hsa-miR-2277-5p	3
hsa-miR-5095	0

Figura 16: Número de genes blanco validados de los miRNAs candidatos. El listado de genes blanco validados experimentalmente para cada miRNA fue obtenido de la herramienta bioinformática DIANA-TarBase v7.

Luego, con todos los genes blanco validados, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) utilizando un valor $p < 0,01$. Este análisis reveló que los genes blanco de los miRNAs candidatos se asocian con procesos como la biosíntesis de ácidos grasos, proteoglicanos en el cáncer, carcinogénesis viral, uniones adherentes, la vía de señalización de p53, metabolismo central del carbono en cáncer, la mala regulación transcripcional en cáncer y el CaP, entre otros (Figura 17). En particular, los genes blanco hsa-miR-19b-3p estaban implicados principalmente en proteoglicanos en el cáncer, mientras que los genes blanco del miR-101-3p estaban implicados en la biosíntesis de ácidos grasos. En menor medida, los genes blanco del hsa-miR-3613-3p se asociaron principalmente con la enfermedad de Huntington y miR-1207-5p y miR-2277-5p compartían la vía KEGG de uniones adherentes (Figura 18).

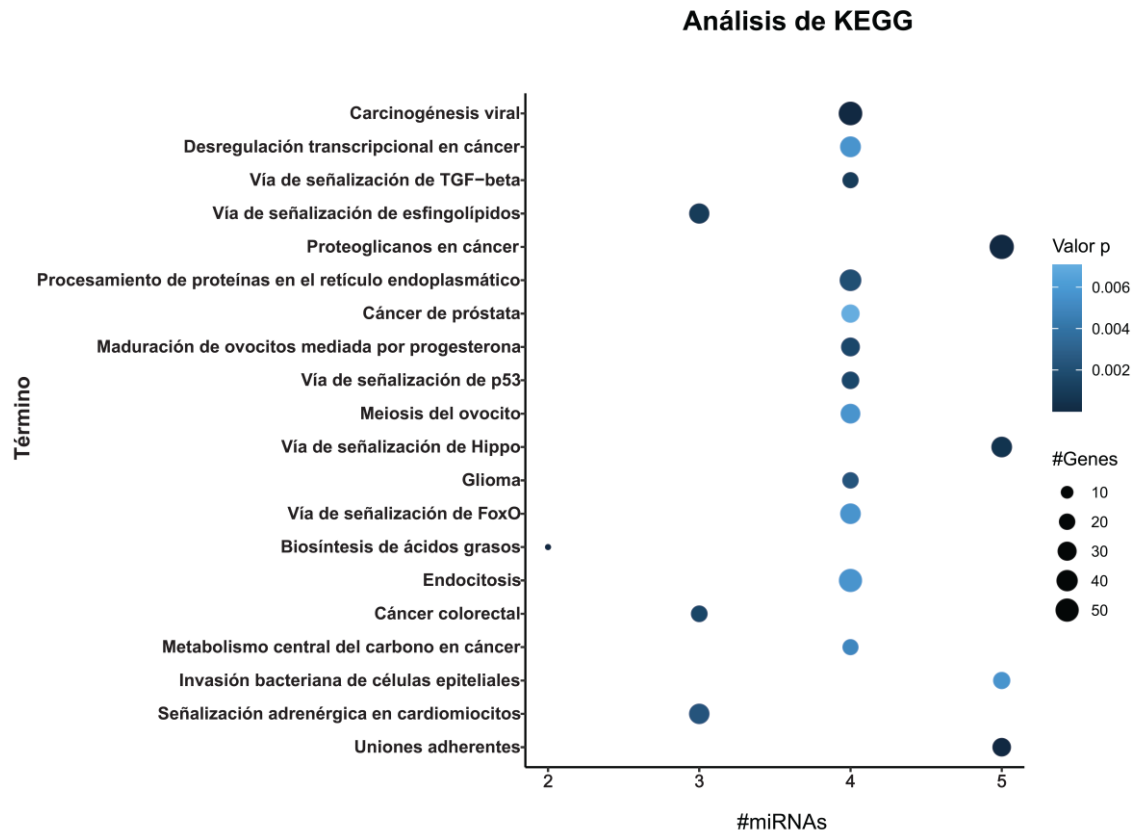


Figura 17: Análisis de enriquecimiento funcional de los miRNAs candidatos. Dotplot que representa las 25 principales vías significativas (valor $p < 0,01$) de KEGG asociadas a los genes blanco de los miRNAs candidatos.

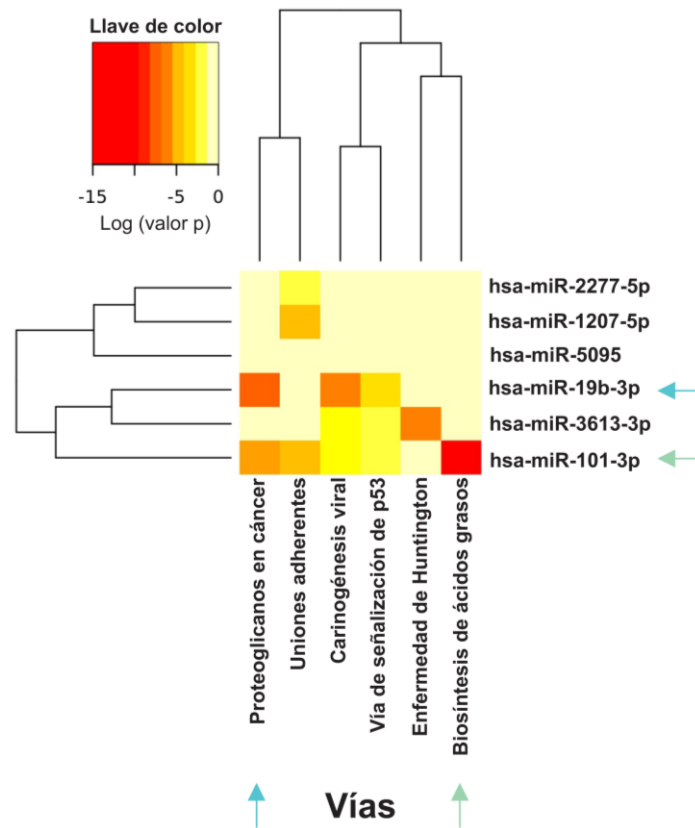


Figura 18: Mapa de calor de los miRNAs y sus vías relacionadas. Las flechas indican los 2 miRNAs con el mayor número de genes blanco validados y las vías en las que están más implicados.

Además, a partir de DIANA-miRPath v3, se realizó un análisis de GO (Gene Ontology) a tres niveles: procesos biológicos, componentes celulares y función molecular. Los primeros 25 términos estadísticamente significativos (valor $p < 0,01$) se muestran en la Figura 19. Los genes blanco de los miRNAs regulados por la DG se enriquecieron en procesos asociados con la expresión génica, el ciclo celular mitótico y la respuesta al estrés (Figura 19). Curiosamente, los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p fueron los miRNAs más involucrados en estos términos además del término de muerte celular (Figura 20).

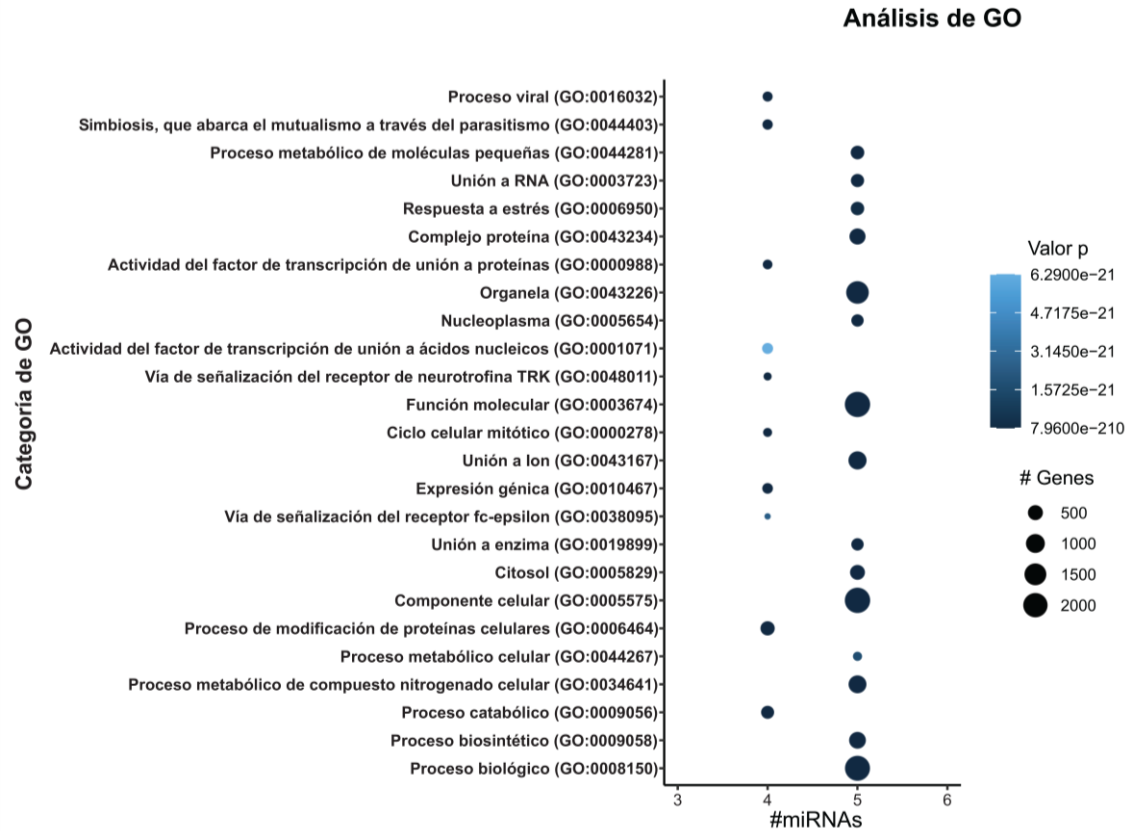


Figura 19: Análisis de Gene Ontology de los miRNAs candidatos. Dotplot que representa las 25 principales vías significativas (valor $p < 0,01$) de GO asociadas a los genes blanco de los miRNAs candidatos.

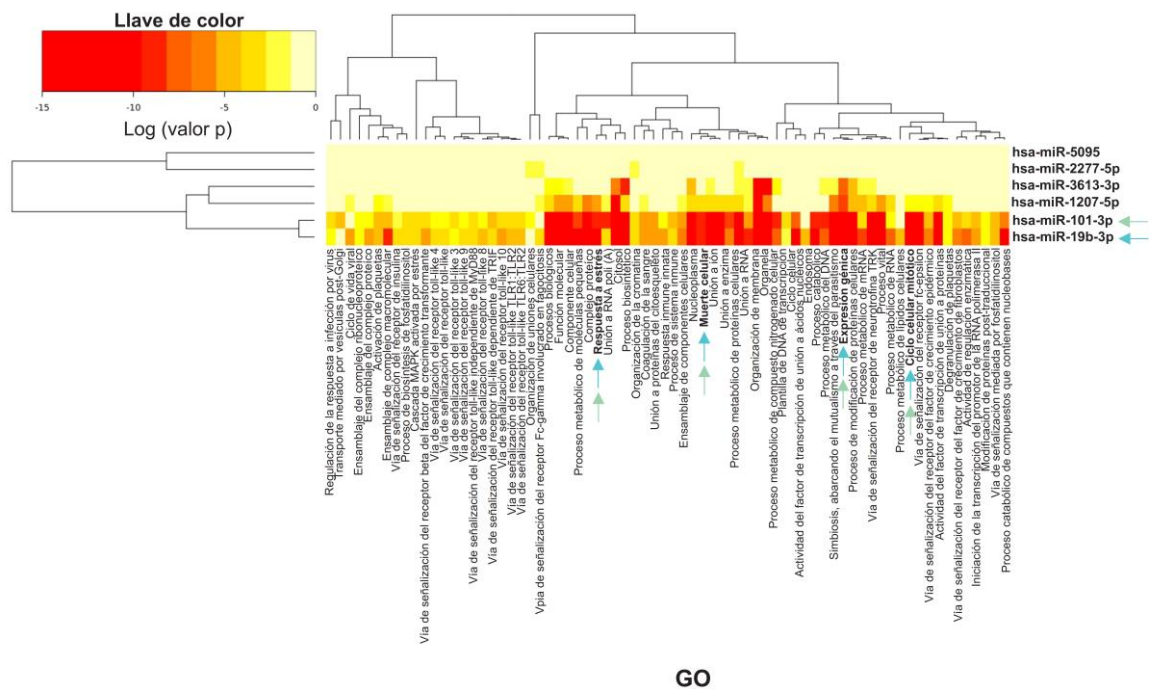


Figura 20: Mapa de calor de los miRNAs y sus términos GO relacionados. Las flechas indican los 2 miRNAs con el mayor número de genes blanco validados y los términos GO en los que están más implicados.

En resumen, la dieta grasa aumenta la expresión de miRNAs en xenotransplantes de próstata que modulan vías metabólicas específicas y relacionadas con cáncer.

Los miRNAs: hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-1207-5p y miR-5095, se encuentran aumentados en la sangre de pacientes con CaP

Para determinar el uso de los miRNAs candidatos como biomarcadores potenciales para el diagnóstico o el pronóstico del CaP, se exploraron los datos de expresión disponibles en el set de datos de GEO (Gene Expression Omnibus). El grupo de Urabe y Matsuzaki, utilizando tecnologías de microarrays, realizó un perfil de miRNA en suero de 1591 muestras masculinas, incluyendo 809 CaP, 241 pacientes con CaP negativo, 41 controles sin cáncer y otros 500 cánceres sólidos (GSE112264) (Urabe et al., 2019). Por lo tanto, se utilizaron estos resultados de microarrays para investigar los niveles de los 7 miRNA candidatos en muestras de suero de una cohorte de 282 CaP y 282 pacientes sin cáncer (pacientes con CaP negativos + controles sin cáncer). Como se muestra en la Figura 21, los hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-1207-5p y miR-5095 se encontraron aumentados en el torrente sanguíneo de pacientes con CaP en comparación con pacientes sin CaP. No se encontraron diferencias en los niveles circulantes del hsa-miR-3613-3p y el miR-2277-5p, mientras que no se detectó al hsa-miR-320a-5p en esta cohorte de pacientes (Figura 21).

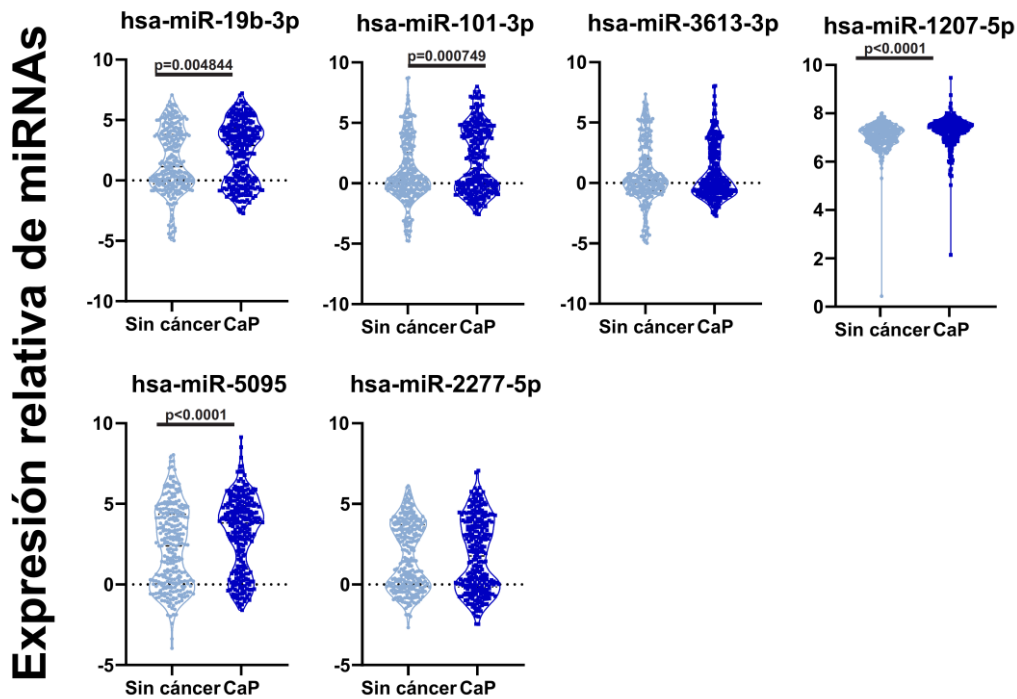


Figura 21: Expresión de los miRNAs candidatos en circulación de pacientes con CaP. Niveles de expresión de miRNAs circulantes hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-3613-3p, miR-1207-5p, miR-5095 y miR-2277-5p fueron analizados en el plasma de pacientes con CaP y voluntarios sin cáncer. Los valores de intensidad de señal normalizados fueron graficados. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba-T o test de Mann-Whitney, según correspondiera.

La expresión de hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p está aumentada en tumores de próstata de pacientes y en tumores metastásicos de CaP

Para analizar el perfil de expresión de los miRNAs candidatos en tumores de próstata de pacientes, se empleó la cohorte de cáncer de próstata de TCGA (PRAD) disponible en la herramienta bioinformática UCSC Xena (Goldman et al., 2020). Este conjunto de datos tiene la información de la expresión de los miRNAs maduros en tejido tumoral y tejido normal adyacente (TNA), obtenida por RNAseq. Descubrimos que los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p aumentan significativamente en el tumor de próstata en comparación con el TNA (Figura 22). No se encontraron diferencias significativas con respecto a la expresión del hsa-miR-3613-3p y el miR-2277-5p, mientras que no se encontraron datos de expresión para los siguientes miRNAs: hsa-miR-320a-5p, miR-1207-5p y miR-5095 (Figura 22).

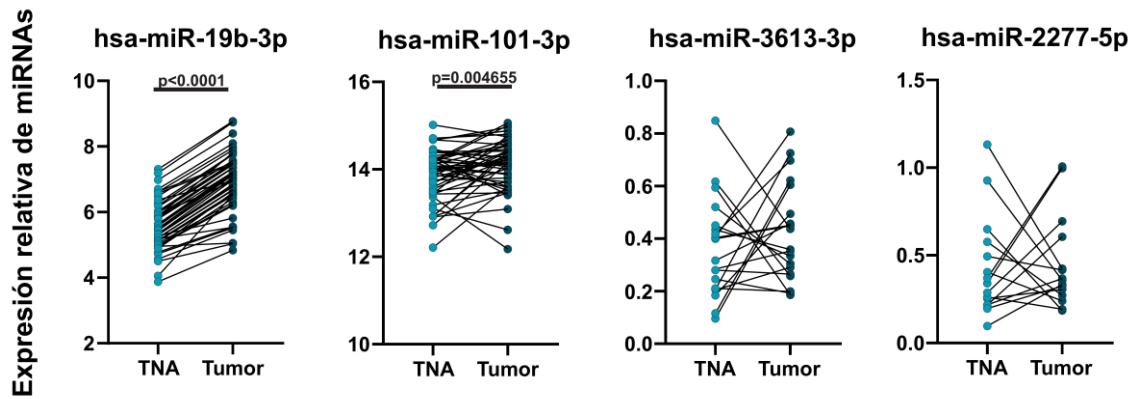


Figura 22: El hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p se encuentran aumentados en tumores de próstata de pacientes en comparación con TNA. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados a partir de los datos obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaP) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD informados como log2 (LPM+1) (n=52 por grupo). Para el análisis estadístico, se utilizaron la prueba-T pareada o test de Wilcoxon según correspondiera.

Se exploraron los resultados de una secuenciación de nueva generación del miRNoma completo presente en el trabajo de Nam et al., 2018; disponible en GEO (GSE117674) (Nam et al., 2018). El grupo de Nam analizó el perfil de expresión de miRNAs en tumores de próstata de pacientes a los que se les realizó una prostatectomía radical. Identificaron a aquellos pacientes a los que se les había diagnosticado metástasis después de la cirugía (n = 19) y compararon sus niveles de expresión con aquellos pacientes que no mostraron se analizaron los miRNAs candidatos. Como se muestra en la Figura 23, la expresión de los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p se encontraba aumentada en los tumores de pacientes metastásicos (después de la cirugía) en comparación con tumores de pacientes no metastásicos. No hubo diferencias en la expresión del hsa-miR-3613-3p y el miR-5095 (Figura 23). Además, no se detectaron los hsa-miR-320a-5p, miR-1207-5p, miR-2277-5p en esta cohorte de pacientes.

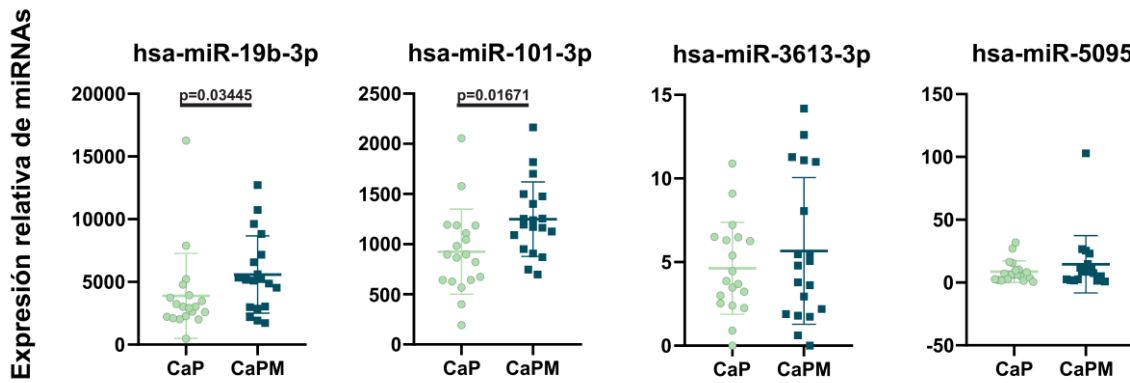


Figura 23: El hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p se encuentran aumentados en tumores de próstata de pacientes metastásicos en comparación con pacientes con CaP sin metástasis. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados en muestras de tumores de próstata no metastásico (CaP) y CaP metastásico (CaPM) a partir de los datos obtenidos de la herramienta GEO (GSE117674) informados como recuento de lecturas normalizadas (n=19 por grupo). Para el análisis estadístico, se utilizaron la prueba-T o test de Mann-Whitney según correspondiera.

Los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p son buenos biomarcadores en tejido, pero no en suero para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP

Para evaluar si los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p son buenos biomarcadores de diagnóstico para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP, se realizó un análisis de curvas ROC (receiver operating characteristic). Como se muestra en la Figura 24, se obtuvo un poder predictivo deficiente para discriminar entre pacientes con CaP y sin CaP cuando se calculó el área bajo la curva (AUC) para los hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p en suero (0,5563 y 0,5886, respectivamente).

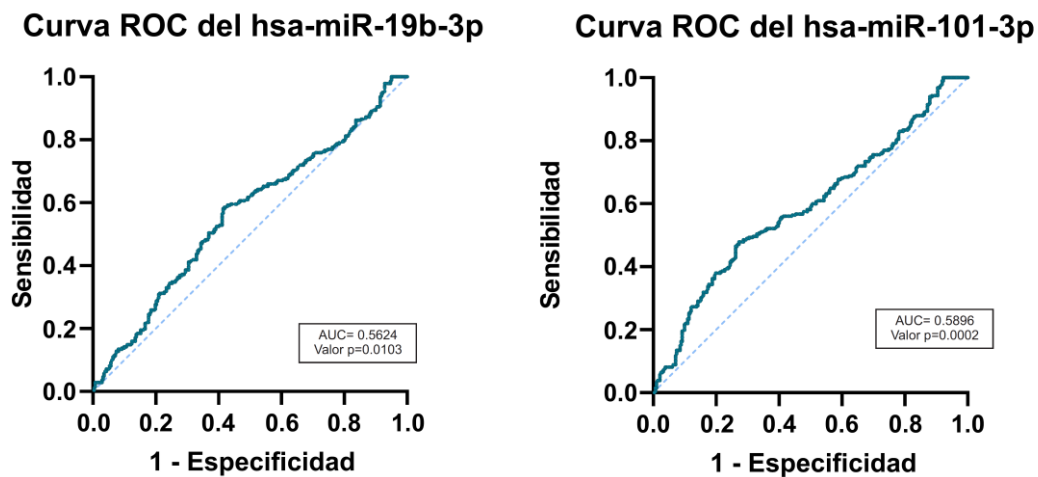


Figura 24: Curvas ROC correspondientes al hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en el suero de pacientes con CaP y voluntarios sanos. La curva ROC y el AUC se trazaron y calcularon para hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en el set de datos GSE112264.

En cuanto al tejido tumoral, el AUC para los hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p fue de 0,861 y 0,6307, respectivamente (Figura 25), lo que demuestra que ambos miRNA son útiles para distinguir entre tejido tumoral y TNA.

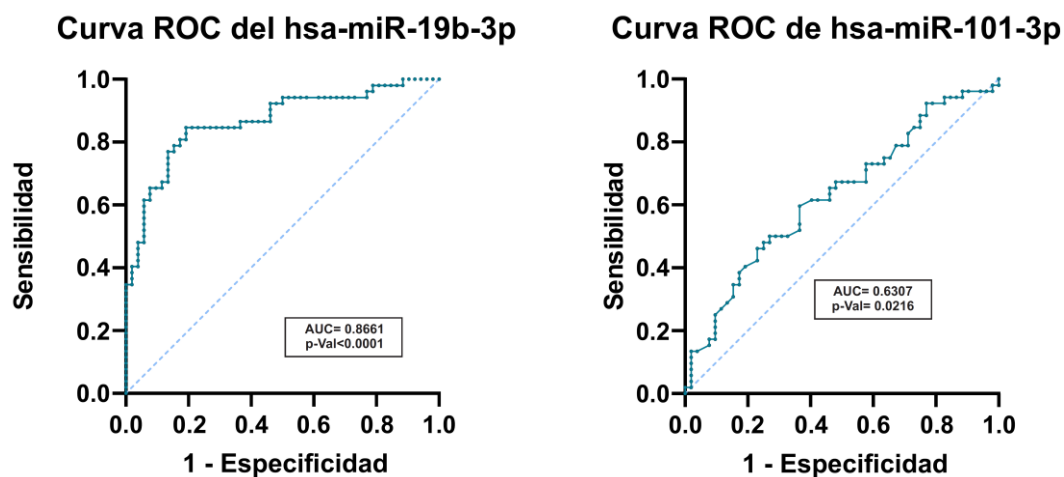


Figura 25: Curvas ROC correspondientes al hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en tumores primarios de próstata. La curva ROC y el AUC se trazaron y calcularon para hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en el set de datos TCGA-PRAD disponible en la herramienta bioinformática Xena.

Además, se encontró que tanto el hsa-miR-19b-3p como el hsa-miR-101-3p pudieron diferenciar entre la enfermedad de CaP metastásico (CaPM) y no metastásico debido a que el AUC fue 0,7008 y 0,7590, respectivamente (Figura 26). En particular, el hsa-miR-19b-3p mostró la mejor puntuación para discriminar entre tejido tumoral y TNA, mientras que el hsa-miR-101-3p fue más útil para diferenciar entre pacientes con CaP metastásico y no metastásico.

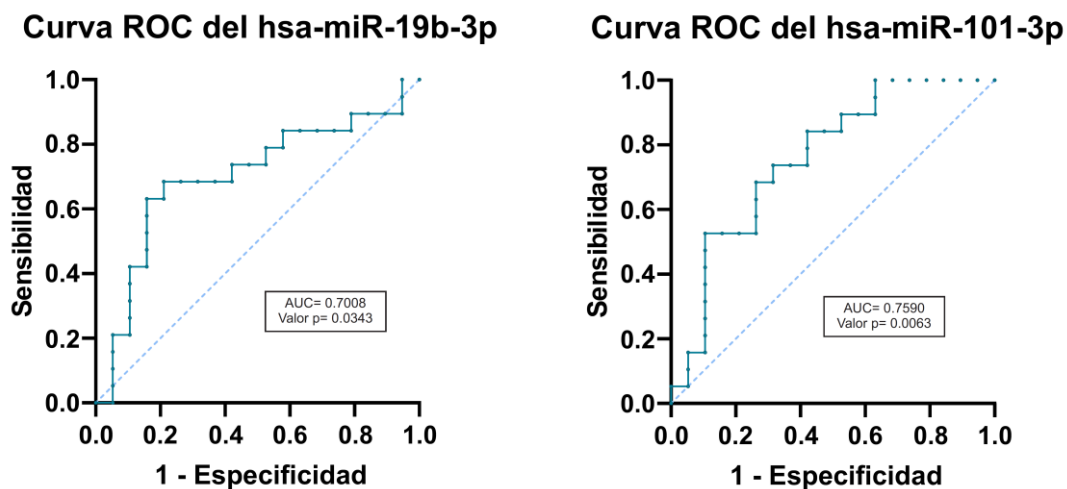


Figura 26: Curvas ROC correspondientes al hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en tumores de próstata metastásicos. La curva ROC y el AUC se trazaron y calcularon para hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en el set de datos GSE117674.

En resumen, se identificaron 2 miRNAs (hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p) con alto potencial diagnóstico y pronóstico para distinguir entre CaP y TNA, y entre pacientes metastásicos y no metastásicos. Sin embargo, estos miRNAs podrían ser útiles a nivel tumoral pero no en el suero de los pacientes.

Hsa-miR-101-3p aumenta en exosomas aislados de sangre de pacientes con CaP

Como los miRNAs pueden liberarse al torrente sanguíneo asociados a proteínas, HDL o dentro de exosomas, se analizó la presencia de los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en exosomas de muestras de sangre de pacientes con CaP (n=23) y donantes sanos (DS) (n=58), utilizando la base de datos EVmiRNA (Liu et al., 2019). Como se muestra en la Figura 27, el hsa-miR-101-3p se encuentra aumentado en exosomas de pacientes con

CaP en comparación con DS. El hsa-miR-19b-3p no se encontró en este conjunto de datos.

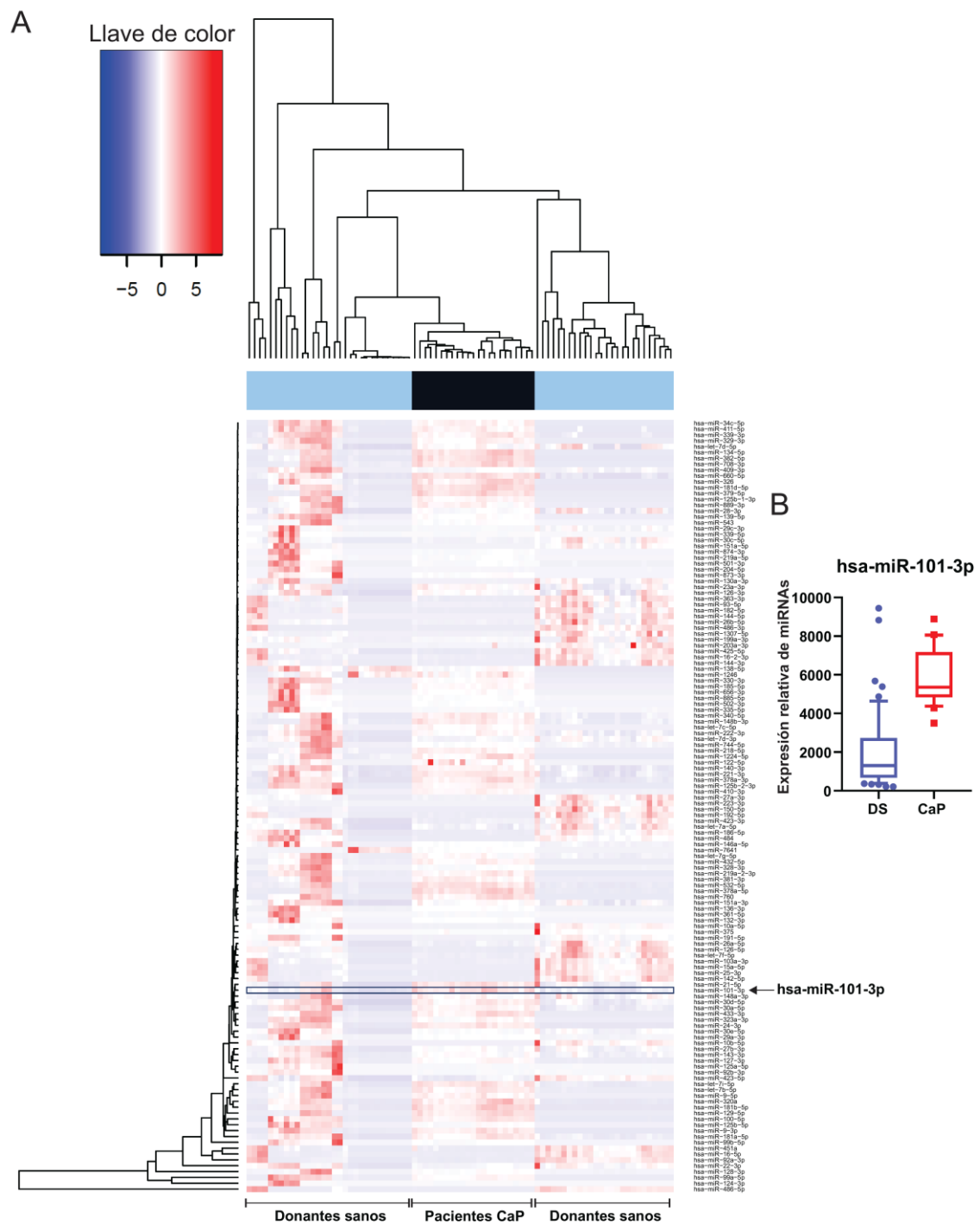


Figura 27: Expresión de miRNAs en exosomas de sangre de pacientes con CaP. (A) Mapa de calor de la presencia de miRNAs en exosomas del torrente sanguíneo de pacientes con CaP y donantes sanos. Las flechas indican el hsa-miR-101-3p. El sa-miR-19b-3p no se encontró en este conjunto de datos. (B) Diagrama de caja de la expresión del hsa-miR-101-3p.

Estos resultados sugieren que el hsa-miR-101-3p se libera al torrente sanguíneo de los pacientes con CaP a través de los exosomas, diseminándose a otros órganos, lo que refuerza el papel del miRNA en la metástasis.

El hsa-miR-19b-3p está involucrado en vías de proteoglicanos en el cáncer y adhesión focal

Como se mencionó anteriormente, se vio que el hsa-miR-19b-3p poseía 1326 genes blanco validados (Figura 16). Los miRNAs regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional principalmente al disminuir la expresión de su gen blanco. Para encontrar genes blanco relevantes para el hsa-miR-19b-3p, se seleccionaron blancos que se correlacionaron negativamente con la expresión del hsa-miR-19b-3p. Se realizó una matriz de correlación con paquetes de R, utilizando los datos de expresión del hsa-miR-19b-3p y sus genes blanco en los tumores de pacientes con CaP disponibles en el set de datos TCGA PRAD presente en UCSC Xena. Se seleccionaron para un análisis posterior aquellos genes blanco que mostraron una correlación negativa con el hsa-miR-19b-3p y un coeficiente de correlación $\rho < -0,4$ más un valor de $p < 0,05$ (Figura 28).

Gen	rho	Valor p	Gen	rho	Valor p	Gen	rho	Valor p
KPNA6	-0.57517333	0	REV3L	-0.46184968	0	USP8	-0.43099733	0
ACVR1	-0.57040301	0	PAFAH1B1	-0.46135803	0	PRKAR2A	-0.43086065	0
RNF111	-0.53642011	0	RRAGC	-0.46080959	0	B4GALT5	-0.43057052	0
ZBTB38	-0.53238855	0	CACNA2D1	-0.46028295	0	SPOPL	-0.42915855	0
TGOLN2	-0.53115324	0	ATP2B4	-0.46023784	0	PCDH7	-0.42716396	0
EIF4G2	-0.51940899	0	ITGB1	-0.45975885	0	RNF11	-0.42677837	0
BBX	-0.51839801	0	MBNL2	-0.45966827	0	ARHGAP5	-0.42649564	0
PRKD3	-0.51699493	0	ARPP19	-0.45930241	0	PHC3	-0.42618137	0
CRIM1	-0.51430892	0	USP34	-0.45907972	0	TAOK1	-0.42600475	0
SORT1	-0.51266816	0	ZNF516	-0.45723775	0	ARHGEF12	-0.42431906	0
NCKAP1	-0.51100862	0	PGR	-0.4570239	0	DYNC1H1	-0.42309733	0
LPP	-0.50774389	0	CLOCK	-0.45587822	0	CALCRL	-0.42179333	0
ATP2A2	-0.5076437	0	CLIC4	-0.45460021	0	ZMAT3	-0.42152734	0
EFR3A	-0.50116988	0	ITGA6	-0.45429699	0	LRCH1	-0.42149747	0
FAM114A1	-0.50049866	0	ACSL4	-0.45423575	0	PPP2R5E	-0.42099886	0
PJA2	-0.49961308	0	SMARCA5	-0.45415668	0	REST	-0.42033284	0
SERINC3	-0.49862301	0	IGF2R	-0.45226893	0	C2orf69	-0.42005287	0
PBX1	-0.49823245	0	TAB2	-0.45129061	0	UGCG	-0.41992231	0
CALD1	-0.49720974	0	RGL1	-0.44895927	0	ARMC8	-0.41900375	0
TRIP12	-0.49693359	0	ELK3	-0.44857816	0	BNC2	-0.41896134	0
ZMYND11	-0.49549147	0	STX12	-0.44837439	0	POLR2A	-0.41893578	0
ELF1	-0.49171959	0	HCF2	-0.44770958	0	NACC2	-0.41851515	0
ADAM10	-0.49092589	0	CPD	-0.44736307	0	UHMK1	-0.4168008	0
PRDM5	-0.49017103	0	FAM168A	-0.44710674	0	FAM63B	-0.41662664	0
RAB23	-0.48718063	0	BTBD3	-0.44674066	0	CAST	-0.41623228	0
HIPK1	-0.48546118	0	SOCS5	-0.44510666	0	CLTC	-0.41617006	0
TOR1AIP1	-0.4835288	0	KLHL20	-0.44480578	0	MED21	-0.41463279	0
EXOC6B	-0.48283261	0	NCOA3	-0.44378839	0	SLMAP	-0.41462556	0
MAP3K2	-0.48255187	0	ZFP91	-0.4437345	0	MECP2	-0.41352172	0
PPTC7	-0.48237974	0	CYLD	-0.4424464	0	ADAR	-0.41219483	0
PROX1	-0.48198466	0	ATF2	-0.4415354	0	SLC35D1	-0.41195842	0
CSRNP3	-0.48129189	0	TNRC6B	-0.4414944	0	PUM1	-0.41158901	0
TACC1	-0.48113728	0	PABPC4L	-0.44127215	0	CHM	-0.41077994	0
STOX2	-0.47962886	0	MID1	-0.44050853	0	MDFIC	-0.40978639	0
ITPR1	-0.47912753	0	NF1	-0.43947884	0	HIF1A	-0.40908146	0
TRAK2	-0.47872899	0	USP12	-0.43898177	0	BTBD7	-0.40894785	0
VANGL1	-0.4787083	0	TWF1	-0.43877664	0	IL1RAP	-0.40865765	0
HIPK3	-0.47672316	0	TMTC3	-0.43832889	0	MAPK1	-0.40820848	0
GLCE	-0.47521047	0	TOR1AIP2	-0.43791695	0	CEP76	-0.40781878	0
CPEB4	-0.47487024	0	FBN1	-0.43788215	0	RAB8B	-0.40735175	0
MTF1	-0.47452395	0	HUWE1	-0.43773684	0	ZNF704	-0.40639018	0
CBX6	-0.47167896	0	SAMD8	-0.43723912	0	WDR44	-0.40523615	0
ATXN1L	-0.471587	0	RDX	-0.43720653	0	ITGB8	-0.40499977	0
TLN1	-0.47156584	0	FRMD6	-0.43709781	0	SOCS4	-0.40482489	0
TMEM127	-0.46959772	0	EPC2	-0.43699215	0	KIF2A	-0.40422282	0
AHNAK	-0.46944922	0	FNDC3A	-0.43644194	0	PRICKLE2	-0.40414733	0
SERINC1	-0.46873099	0	FAM69A	-0.43562882	0	SF3A1	-0.40319495	0
SAMHD1	-0.46802305	0	PCDH10	-0.43489298	0	CALU	-0.40087579	0
UBQLN2	-0.46730574	0	MKL2	-0.43482599	0	FBN2	-0.40058732	0
PRDM2	-0.46663473	0	TGFBAP1	-0.43475563	0	FRS2	-0.40056913	0
HECTD1	-0.46561426	0	RSPRY1	-0.43436413	0	TAF3	-0.40027136	0
ASXL2	-0.46519274	0	SERINC5	-0.43436208	0	TMEM30A	-0.40021666	0
DCUN1D1	-0.46429995	0	EXOC5	-0.43190957	0			
LAMC1	-0.46326053	0	IREB2	-0.43185036	0			

Figura 28: Matriz de correlación entre hsa-miR-19b-3p y sus genes blanco validados.

Para estudiar el rol funcional de estos 160 genes blanco seleccionados e identificar las vías reguladas, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG utilizando la herramienta bioinformática DAVID. Los términos significativamente enriquecidos (valor $p < 0,05$) se trazaron y enumeraron en la Figura 29 y 30, respectivamente. Los términos KEGG enriquecidos más significativos fueron proteoglicanos en cáncer y adhesión focal (Figura 29 y 30). Siete de los genes objetivo seleccionados (MAPK1, HIF1A, RDX, ARHGEF12, ITGB1, FRS2, ITPR1) estaban implicados en proteoglicanos en cáncer, mientras que otros 7 (MAPK1, TLN1, ARHGAP5, ITGA6, ITGB8, LAMC1, ITGB1) estaban implicados en adhesión focal (Figura 30). Ambas vías comparten solo dos genes: MAPK1 e ITGB1.

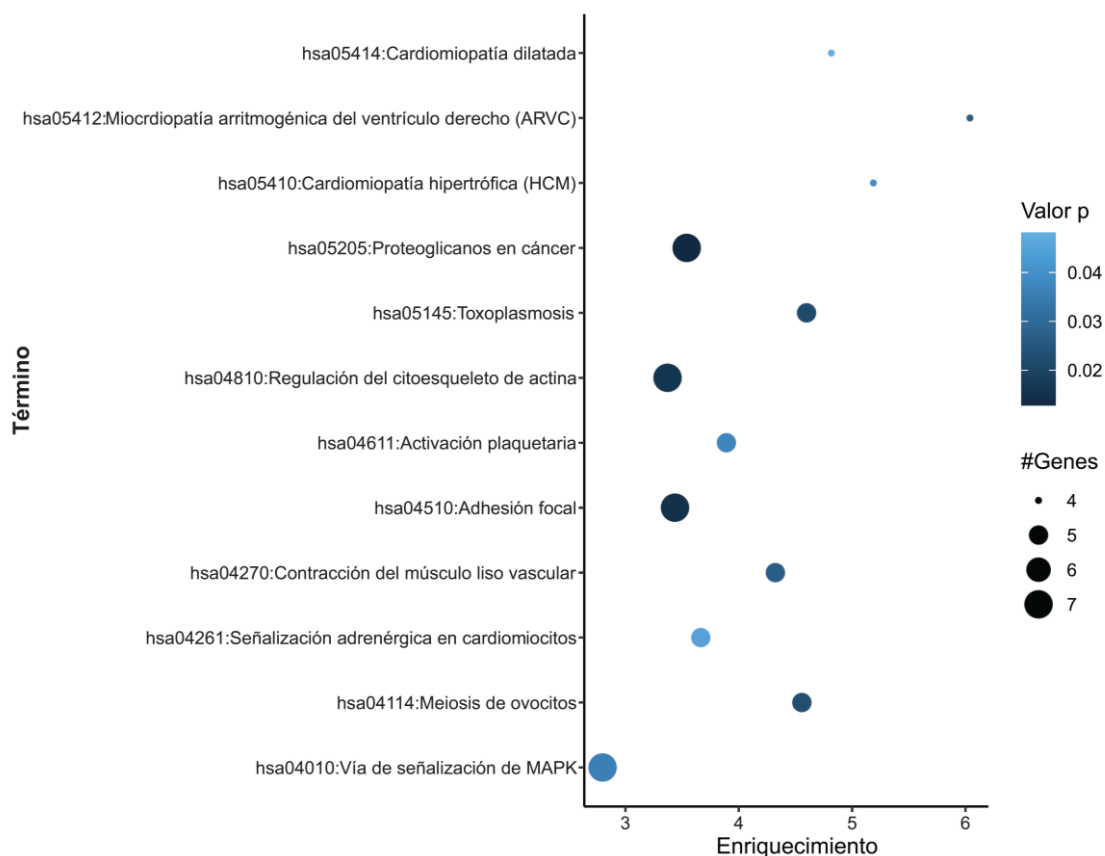


Figura 29: Análisis de enriquecimiento funcional de los genes blanco seleccionados del hsa-miR-19b-3p. Dot plot de las principales vías de KEGG significativas estadísticamente asociadas a los genes blanco seleccionados del hsa-miR-19b-3p.

Término	#Genes	Valor p	Genes
hsa05205:Proteoglicanos en cáncer	7	0.01282856	MAPK1, HIF1A, RDX, ARHGEF12, ITGB1, FRS2, ITPR1
hsa04510:Adhesión focal	7	0.01467336	MAPK1, TLN1, ARHGAP5, ITGA6, ITGB8, LAMC1, ITGB1
hsa04810:Regulación del citoesqueleto de actina	7	0.01600185	MAPK1, ITGA6, ITGB8, RDX, ARHGEF12, ITGB1, NCKAP1
hsa05145:Toxoplasmosis	5	0.02194989	MAPK1, ITGA6, LAMC1, TAB2, ITGB1
hsa04114:Meiosis del ovocito	5	0.02260745	PGR, MAPK1, CPEB4, PPP2R5E, ITPR1
hsa04270:Contracción del músculo liso vascular	5	0.02680594	MAPK1, CALD1, CALCRL, ARHGEF12, ITPR1
hsa05412:Miocardiopatía arritmogénica del ventrículo derecho (ARVC)	4	0.02717135	CACNA2D1, ITGA6, ITGB8, ITGB1
hsa04010:Vía de señalización de MAPK	7	0.03586387	MAPK1, CACNA2D1, TAOK1, MAP3K2, NF1, TAB2, ATF2
hsa04611:Activación plaquetaria	5	0.03742122	MAPK1, TLN1, ARHGEF12, ITGB1, ITPR1
hsa05410:Cardiomiopatía hipertrófica (HCM)	4	0.04003201	CACNA2D1, ITGA6, ITGB8, ITGB1
hsa04261:Señalización adrenérgica en cardiomiocitos	5	0.04500364	MAPK1, CACNA2D1, ATP2B4, PPP2R5E, ATF2
hsa05414:Cardiomiopatía dilatada	4	0.04813711	CACNA2D1, ITGA6, ITGB8, ITGB1

Figura 30: Principales vías de KEGG estadísticamente significativas y los genes blanco implicados en cada una de ellas.

Para analizar la relación e interacción entre los genes pertenecientes a estas dos vías seleccionadas en la Figura 30, se realizó un análisis de agrupamiento con paquetes de R. Los genes que se enriquecieron en la vía de proteoglicanos en cáncer están todos agrupados en el mismo grupo excepto FRS2 (Figura 31).

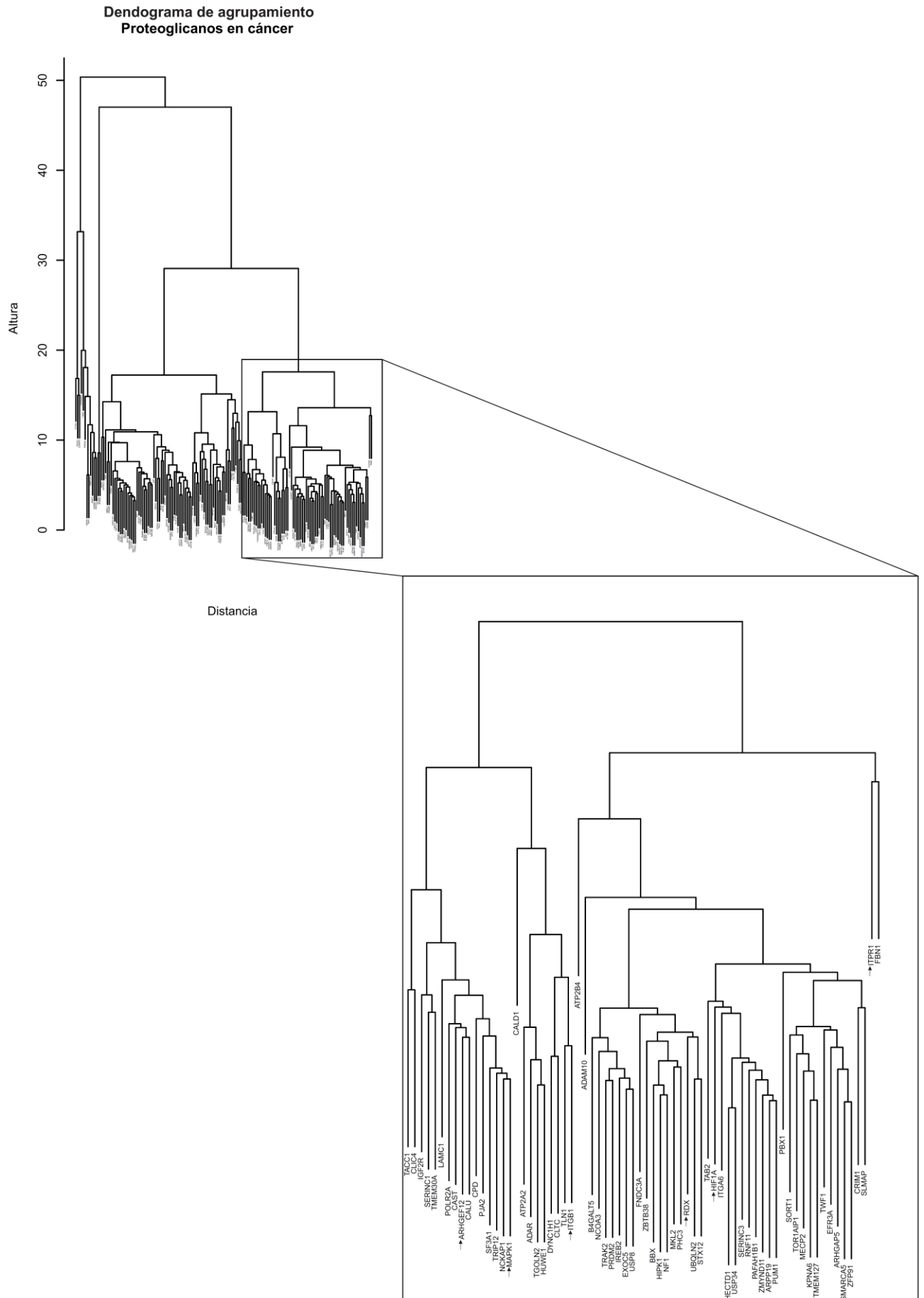
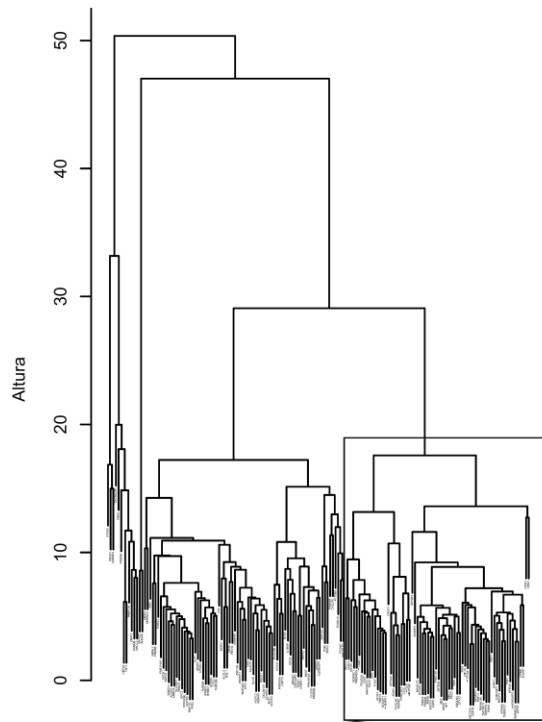


Figura 31: Análisis de agrupamiento de los genes blanco del hsa-miR-19b-3p. Análisis de conglomerados jerárquicos con "promedio" como método de aglomeración de los genes enriquecidos en la vía de Proteoglicanos en cáncer.

Además, los genes enriquecidos en la vía de adhesión focal se encontraron en el mismo grupo excepto ITGB8 (Figura 32).

Dendrograma de agrupamiento
Adhesión focal



Distancia

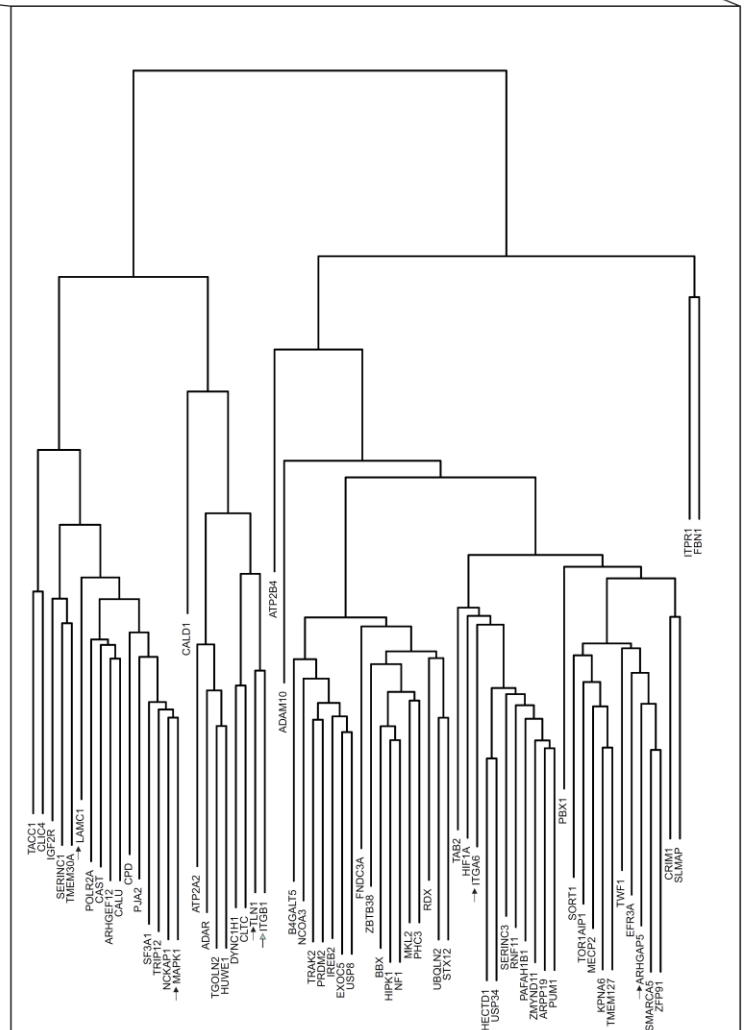


Figura 32: Análisis de agrupamiento de los genes blanco del hsa-miR-19b-3p. Análisis de conglomerados jerárquicos con "promedio" como método de aglomeración de los genes enriquecidos en la vía de Adhesión Focal.

Estos resultados sugieren que los genes pertenecientes a cada vía están relacionados entre sí.

Utilizando la base de datos STRING, se realizó un análisis de interacción entre los genes pertenecientes a cada vía. Solo 4 de los genes involucrados en proteoglicanos en cáncer interactúan entre sí (Figura 33A), mientras que en la adhesión focal la interacción se da entre todos los genes involucrados (Figura 33B).

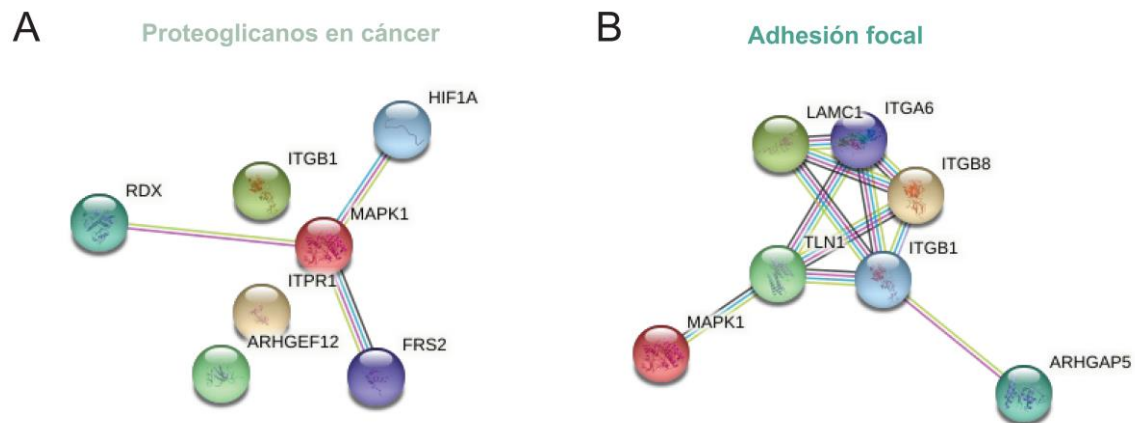


Figura 33: Análisis de interacción de los genes blanco seleccionados. (A) Red interaccional de los 7 genes implicados en la vía de Proteoglicanos en el cáncer. (B) Red interaccional de los 7 genes implicados en la vía de Adhesión Focal.

Usando los datos de expresión génica disponibles en la cohorte TCGA PRAD presente en Xena, se encontró que 3 de los genes involucrados en la vía de proteoglicanos en cáncer (RDX, ITGB1 e ITPR1) estaban regulados negativamente en tumores en comparación con TNA (Figura 34). Además, 4 de los genes involucrados en la vía de adhesión focal (ITGB8, TLN1, ITGA6 e ITGB1) mostraron una expresión disminuida en tumores en relación con TNA (Figura 34).

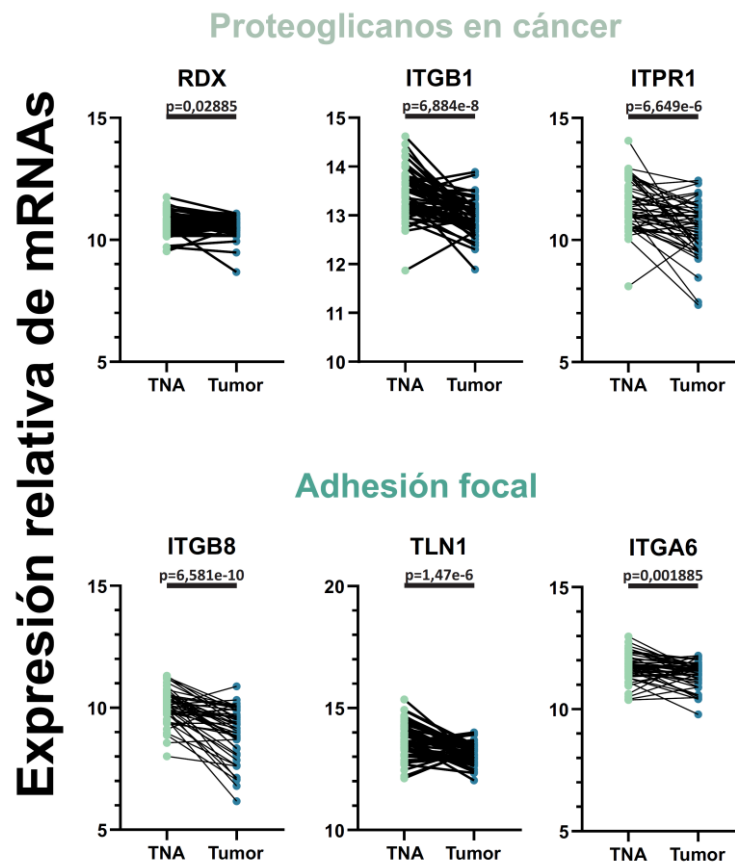


Figura 34: Genes blanco del hsa-miR-19b-3p se encuentran disminuídos en tumores en comparación con tejido normal adyacente (TNA). Niveles de expresión de RDX, ITGB1, ITPR1, ITGB8, TLN1 e ITGA6 en tumor sólido primario de próstata y TNA. Se grafican los valores $\text{Log}_2(\text{RPM}+1)$. Para el análisis estadístico, se utilizaron la prueba-T pareada o test de Wilcoxon según correspondiera.

El análisis de los genes blanco validados del hsa-miR-101-3p con TarBase v7 mostró 1137 genes blanco validados (Figura 16). A continuación, se realizó la matriz de correlación entre los datos de expresión del hsa-miR-101-3p y sus genes blanco validados disponibles en la cohorte TCGA PRAD presente en UCSC Xena. Se seleccionaron genes blanco que se correlacionaron negativamente con el hsa-miR-101-3p con un coeficiente de correlación $\rho < -0,2$ y un valor $p < 0,05$ (Figura 35).

Gen	rho	Valor p
SUB1	-0.27975221	2.92E-10
UBE2F	-0.22956531	2.79E-07
RHOA	-0.22632979	4.13E-07
CIAPIN1	-0.22026507	8.48E-07
POMP	-0.21985068	8.90E-07
PSMD1	-0.21835161	1.06E-06

Figura 35: Matriz de correlación entre hsa-miR-101-3p y sus genes blanco validados.

Utilizando la herramienta bioinformática DAVID, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG de seis genes blanco seleccionados. Los resultados mostraron solo un término significativo (valor de $p < 0,05$): proteasoma con dos genes blanco: PSMD1 y POMP (Figura 36).

Término	#Genes	Valor p	Genes
hsa03050:Proteosoma	2	0.01906911	PSMD1, POMP

Figura 36: Análisis de enriquecimiento funcional de los genes blanco seleccionados del hsa-miR-101-3p. Principal vía de KEGG estadísticamente significativa y los genes blanco involucrados en ella.

Un análisis de agrupamiento reveló que ambos genes estaban relacionados en un pequeño grupo (Figura 37).

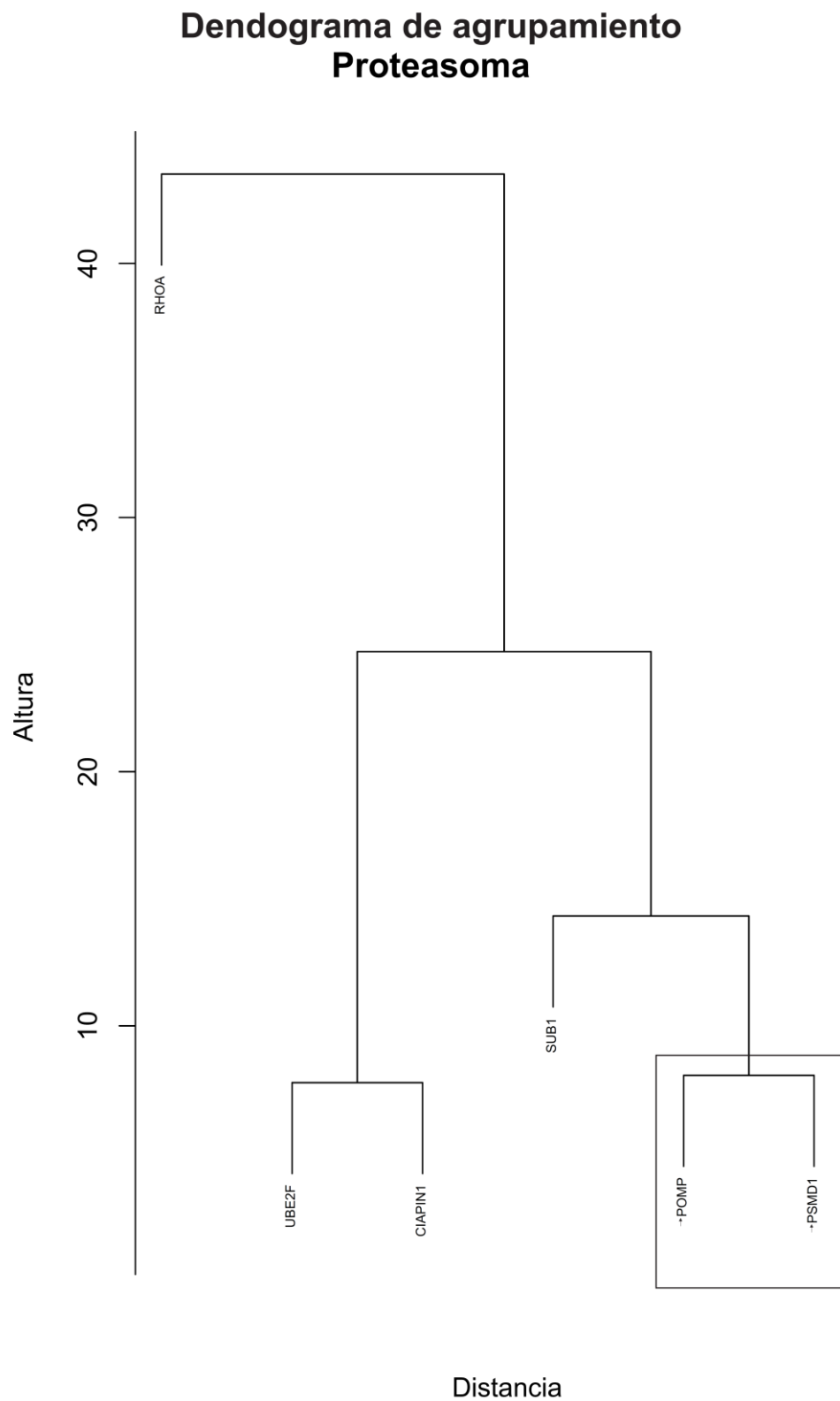


Figura 37: Análisis de agrupamiento de genes diana hsa-miR-101-3p. Análisis de conglomerados jerárquicos con "promedio" como método de aglomeración de los genes enriquecidos en la vía de Proteasoma.

Además, mediante un análisis con la base de datos STRING, hemos encontrado que ambos genes interactúan entre sí (Figura 38).

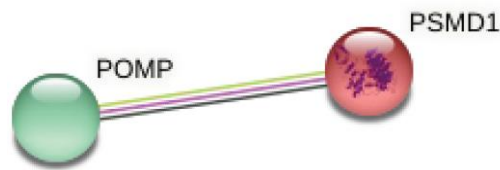


Figura 38: Red interaccional de los 2 genes implicados en la vía de Proteasoma.

Finalmente, utilizando el proyecto TCGA PRAD presente en Xena, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de expresión de PSMD1 y POMP entre los tumores de próstata y TNA (Figura 39).

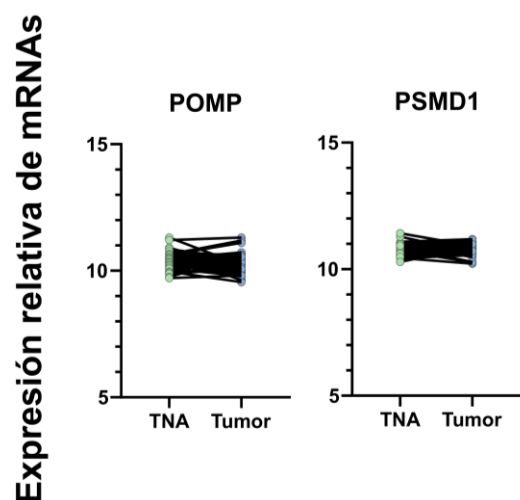


Figura 39: Los genes blanco del hsa-miR-101-3p no mostraron cambios en su expresión en muestras de tumores de próstata de pacientes. Niveles de expresión de POMP y PSMD1 en tumor sólido primario de próstata y TNA. Se grafican los valores Log2 (RPM+1). Para el análisis estadístico, se utilizaron la prueba-T pareada o test de Wilcoxon según correspondiera.

En conjunto, estos resultados sugieren que el hsa-miR-19b-3p podría actuar en el CaP a nivel de las vías de proteoglicanos en cáncer y adhesión focal mediante la regulación de la expresión de los siguientes genes blanco: RDX, ITGB1 e ITPR1 y ITGB8, TLN1, ITGA6 e ITGB1 respectivamente.

Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la expresión de los genes blanco del hsa-miR-101-3p en muestras tumorales en comparación con TNA. Por tanto, se creería que el hsa-miR-101-3p podría tener un papel relevante en los nichos metastásicos pero no en el tumor primario.

Los resultados del capítulo 1 de esta tesis muestran que la DG aumentó la expresión de 7 miRNAs en xenotransplantes murinos de próstata insensibles a andrógenos. Estos miRNAs están involucrados en vías metabólicas específicas y relacionadas con el cáncer, lo cual respalda la idea de que la modulación de la expresión de miRNAs por parte de una DG afecta el desarrollo del CaP.

Además, como se resume en el modelo hipotético de la Figura 40, se vio que sólo 2 de esos miRNAs (hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p) estaban aumentados en el torrente sanguíneo de los pacientes con CaP en comparación con los pacientes sin CaP, como así también en tumores de pacientes con CaP en comparación con TNA y en tumores de pacientes con CaP metastásico comparado con tumores de pacientes sin metástasis. Lo cual lleva a proponer a ambos miRNAs como posibles biomarcadores candidatos para el diagnóstico y pronóstico del CaP.

Se pudo determinar que los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p tienen alto potencial diagnóstico y pronóstico para distinguir entre CaP y TNA y entre pacientes metastásicos y no metastásicos, siendo útiles a nivel tumoral pero no así a nivel sérico.

Nuestros resultados proponen a los hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p como oncomiR a nivel del tumor y del sitio metastásico, respectivamente. Además, estos miRNA aumentaron con la DG en nuestro modelo murino. Por lo tanto, los pacientes en condiciones similares al SM podrían tener un CaP más agresivo debido a una mayor expresión de hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p. Estos resultados validan parte de nuestra hipótesis que propone que el SM aumenta el desarrollo y la agresividad del CaP a través de la modulación de miRNAs.

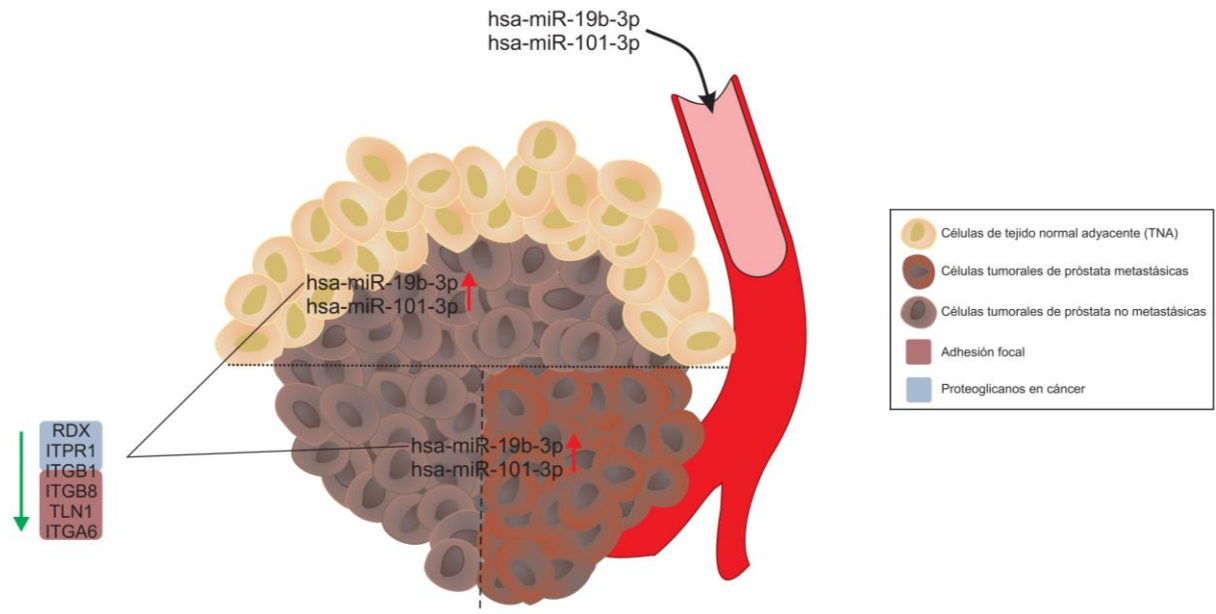


Figura 40: Modelo hipotético propuesto. Los hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p se inducen en tumores de próstata de pacientes en comparación con TNA, y en tumores de pacientes metastásicos *versus* tumores de pacientes no metastásicos. Ambos miRNAs aumentan en el torrente sanguíneo de los pacientes con CaP en comparación con los que no tienen cáncer. El hsa-miR-19b-3p regula negativamente la expresión de genes implicados en las vías de proteoglicanos en cáncer y adhesión focal, lo que podría contribuir a un fenotipo tumoral más agresivo.

CAPÍTULO 2

LA DIETA GRASA DISMINUYE LA EXPRESIÓN DE tsmiRs EN TUMORES DE PRÓSTATA SENSIBLES A ANDRÓGENOS

En este capítulo se desarrollará el segundo objetivo específico que hace referencia a identificar el perfil de expresión de miRNAs en tumores, tejido adiposo y sangre periférica en modelos animales con CaP y un estado similar al SM. En particular, se utilizó un modelo de ratones C57BL/6J que fueron alimentados de manera crónica con DG o DC e inoculados con células de CaP murinas sensibles a andrógenos, TRAMP-C1. De esta forma, se identificó un conjunto de miRNAs disminuidos en tejido tumoral de ratones DG en comparación con ratones DC. A su vez, se investigó la relevancia de estos hallazgos en tejidos tumorales de pacientes con CaP obtenidos de repositorios públicos. Se encontraron dos miRNAs que estaban disminuidos tanto en tumores murinos DG en comparación con tumores DC, como en tumores humanos con respecto a los tejidos no tumorales y en tumores de pacientes con CaP metastásico comparado con tumores de pacientes sin metástasis. Luego, a través de herramientas bioinformáticas, se identificaron los genes blanco predichos en común de los 2 miRNAs seleccionados y se analizaron las vías moleculares en las que éstos se encontraban involucrados. Luego se realizó un análisis de correlación entre la expresión de los miRNAs y los genes identificados utilizando bases de datos públicas. Se seleccionaron aquellos genes blanco que mostraron tener una correlación negativa estadísticamente significativa con ambos miRNAs. Posteriormente, se estudió la expresión de estos genes blanco en tumores de pacientes con CaP y muestras no tumorales disponibles en TCGA-PRAD. Además, utilizando un análisis de curvas ROC, se evaluó la capacidad de biomarcador diagnóstico para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP de los miRNAs y genes blanco seleccionados, como así también de la combinación de todos ellos. Finalmente, se analizó el estado de metilación de la región promotora de los genes de los miRNAs seleccionados y se comparó la metilación en estos loci con la expresión de los 2 miRNAs maduros.

Descripcion del modelo murino utilizado

Se desarrolló un modelo murino de CaP sensible a andrógenos utilizando ratones machos C57BL/6J de 6 semanas de edad (n=16). Los mismos fueron aleatorizados en 2 grupos (n=8 cada grupo) y se alimentaron ad libitum durante 20 semanas con una DC o una DG. Al cabo de 12 semanas de dieta, se midieron parámetros metabólicos tales como glucemia y colesterol. A continuación, los ratones fueron inoculados con células

de CaP murinas TRAMP-C1, tal como se observa en la Figura 41. Luego de 7-8 semanas post-inoculación los animales fueron sacrificados y se colectó sangre vía intracardíaca la cual se dejó coagular para separar la fracción plasmática del suero y muestra de tejido tumoral y tejido adiposo gonadal.

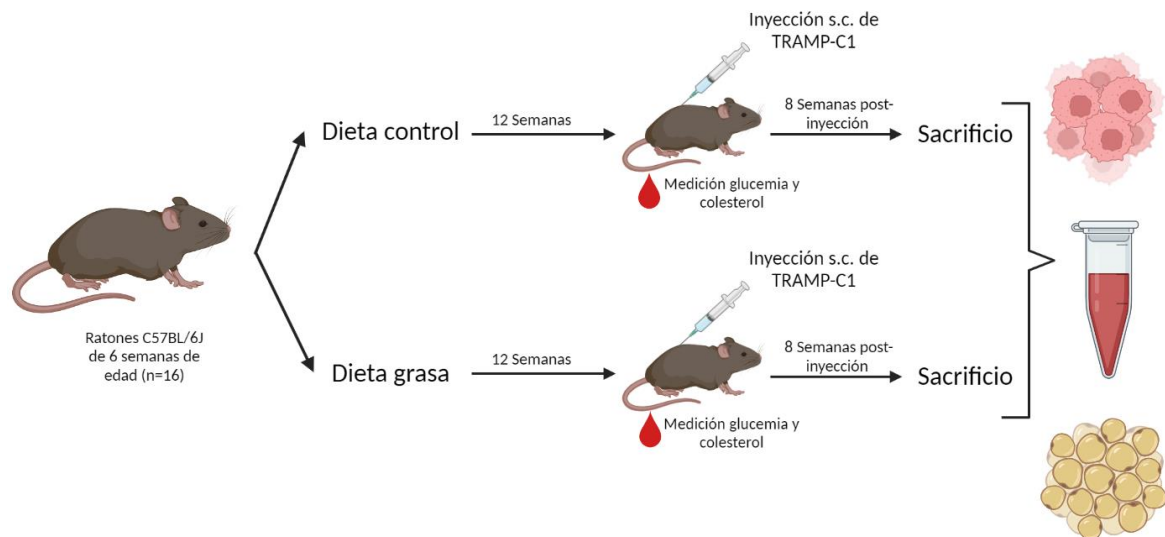


Figura 41. Esquema del modelo murino desarrollado. Ratones machos C57BL/6J (n=16) fueron alimentados de manera crónica con DC o DG (n=8 por grupo) durante 20 semanas. A la semana 12 de dieta, se les midió la glucemia y colesterol en ayunas y fueron inoculados en el flanco izquierdo de manera subcutánea con 5×10^6 de células de CaP murinas sensibles a andrógenos TRAMP-C1. Luego de ocho semanas post-inyección, los ratones fueron sacrificados y se colectaron tumores, sangre vía intracardíaca y tejido adiposo gonadal para su posterior análisis.

La DG modula la expresión de miRNAs en tumores TRAMP-C1

Anteriormente, trabajos pertenecientes a nuestro grupo reportaron que la DG aumentaba significativamente el crecimiento del tumor de próstata, la expresión de oncogenes y oncomiR en ratones macho (Massillo et al., 2020; Dalton et al., 2019; Massillo et al., 2019; Moiola et al., 2014). Como ya se mencionó en otras secciones, nuestro grupo estableció un modelo de ratones con un estado similar al SM y con CaP donde se identificó a CTBP1 como un vínculo novedoso que asociaba ambas enfermedades. En particular, se descubrió que un estado similar al SM indujo hipertrofia, hiperplasia e inflamación del tejido adiposo blanco en esos ratones (Massillo

et al., 2019). Estos cambios en el tejido adiposo blanco condujeron a un fenotipo pro-inflamatorio y aumentó la concentración sérica de estradiol. Además se vio que el estado similar al SM aumentó el crecimiento del CaP y los niveles de expresión de CTBP1, Fabp4 e IL-6 (Massillo et al., 2019). En base a estos resultados, se continuó investigando la interacción entre las células del tejido adiposo blanco y el CaP a través de miRNAs, en un modelo murino de SM y CaP sensible a andrógenos. Se encontró un grupo de cinco miRNAs (mmu-miR-221-3p, 27a-3p, 34a-5p, 138-5p y 146a-5p) que estaba aumentado en tejido adiposo blanco gonadal, tumores y plasma de ratones con un estado similar al SM en comparación con los ratones control (Massillo et al., 2020). Tres de estos cinco miRNA se detectaron en los medios de co-cultivos de tejido adiposo blanco gonadal y células de CaP murinas TRAMP-C1 (Massillo et al., 2020). Además, usando microarreglos de expresión de miRNAs, se encontró que 121 miRNAs se liberaron de manera diferencial en los medios de co-cultivo entre el tejido adiposo blanco gonadal proveniente de ratones alimentados con DG y células TRAMP-C1 en comparación con el co-cultivo de tejido adiposo blanco gonadal de ratones DC y TRAMP-C1 (Massillo et al., 2020). Los genes blanco de los 66 miRNAs más desregulados estaban involucrados en vías comunes, principalmente relacionadas con el metabolismo de los ácidos grasos, el procesamiento de proteínas ER, la degradación de aminoácidos, la señalización de PI3K AKT y CaP (Massillo et al., 2020). En base a estos resultados, en este trabajo de tesis se propuso seguir estudiando a los miRNAs como jugadores responsables, en parte, de los efectos de la DG en el CaP en ratones, como así también su papel en los pacientes con CaP y/o algún desorden metabólico.

Para ello se investigó el impacto de la DG en el crecimiento de tumores TRAMP-C1 desarrollados en ratones machos C57BL/6J (Figura 42).

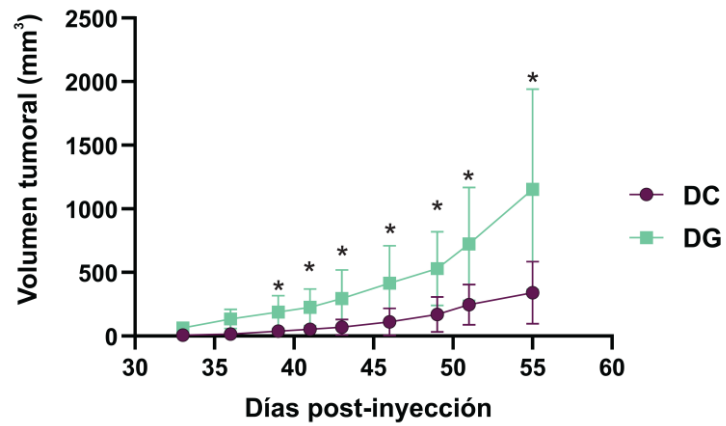


Figura 42. Crecimiento tumoral de ratones C57BL/6J DC o DG inoculados con la línea celular TRAMP-C1. El tamaño tumoral fue medido 3 veces a la semana. Las curvas indican los valores medios y el desvío estándar de un experimento representativo (n=8 por grupo). La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando el test de Mann-Whitney.

Se determinó el perfil de expresión de miRNAs en estos tumores mediante un microarreglo de expresión de miRNAs. El GeneChip miRNA 4.0 Affymetrix se hibridó con RNA total aislado de tumores TRAMP-C1 DC o DG. Después de la normalización de datos, se seleccionaron los miRNAs diferencialmente expresados con un FDR <0.05 y se identificaron 18 miRNAs regulados negativamente y 6 regulados positivamente en tumores DG en comparación con el grupo DC (Figura 43, Tabla 6).

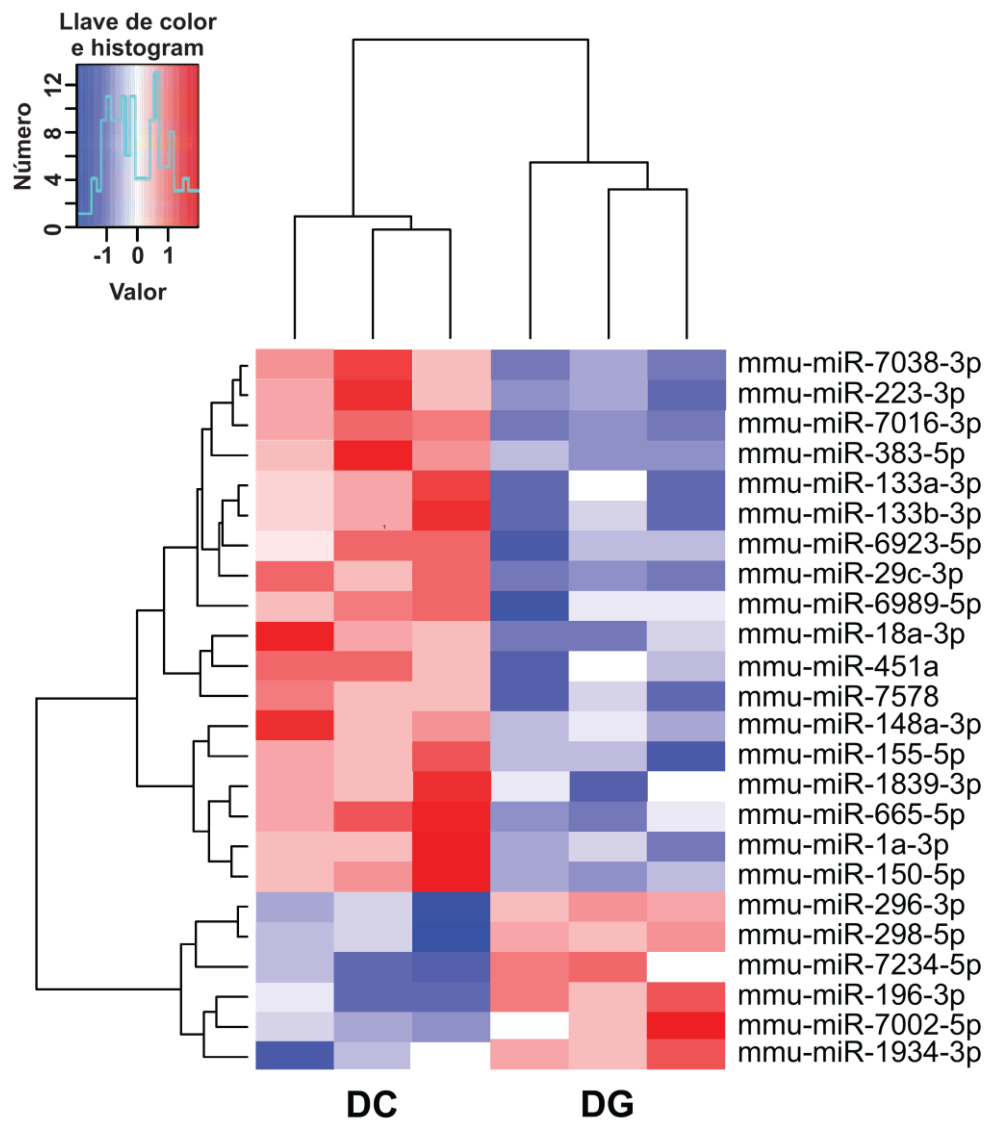


Figura 43. Representación en mapa de calor de la expresión de miRNAs en aloinjertos DC y DG.

El mapa de calor se generó en base a los miRNAs expresados diferencialmente con un FDR <0.05 en tumores TRAMP-C1 desarrollados en ratones DC en comparación con ratones alimentados con DG.

Tabla 6. Lista de miRNAs desregulados por la DG en tumores TRAMP-C1.

Sonda	miRNA	log2FoldChange	FDR
MIMAT0000665_st	mmu-miR-223-3p	- 0.95	0.04352941
MI0001730_x_st	mmu-miR-451a	- 1.06	0.03642857
MIMAT0000748_st	mmu-miR-383-5p	- 1.08	0.046842106
MIMAT0027880_st	mmu-miR-6989-5p	- 1.12	0.036666665
MIMAT0000165_st	mmu-miR-155-5p	- 1.12	0.03642857
MIMAT0017238_st	mmu-miR-665-5p	- 1.15	0.04222222
MIMAT0009457_st	mmu-miR-1839-3p	- 1.21	0.038125
MIMAT0027746_st	mmu-miR-6923-5p	- 1.23	0.016363636
MIMAT0004626_st	mmu-miR-18a-3p	- 1.26	0.01
MIMAT0027937_st	mmu-miR-7016-3p	- 1.29	0.017
MIMAT0000516_st	mmu-miR-148a-3p	- 1.31	0.03642857
MIMAT0000536_st	mmu-miR-29c-3p	- 1.39	0.0057142857
MIMAT0000160_st	mmu-miR-150-5p	- 1.49	0.0057142857
MI0024714_st	mmu-miR-7578	- 1.53	0.006
MIMAT0000123_st	mmu-miR-1a-3p	- 1.54	0.01
MIMAT0027981_st	mmu-miR-7038-3p	- 1.57	0.006
MIMAT0000769_st	mmu-miR-133b-3p	- 3.05	0
MIMAT0000145_st	mmu-miR-133a-3p	- 3.45	0
MIMAT0000376_st	mmu-miR-298-5p	- 2.12	0
MIMAT0028436_st	mmu-miR-7234-5p	1.63	0
MIMAT0004576_st	mmu-miR-296-3p	1.35	0.036
MIMAT0017341_st	mmu-miR-1934-3p	1.27	0.026666667
MIMAT0027906_st	mmu-miR-7002-5p	1.21	0.0225
MIMAT0017170_st	mmu-miR-196b-3p	1.13	0.036666665

Para validar estos resultados, se midió mediante stem-loop RT-qPCR la expresión de 6 miRNAs regulados negativamente (mmu-miR-133a-3p, 1a-3p, 29c-3p, 18a-3p, 148a-3p y 223-3p) en tumores TRAMP-C1 de ratones DG y DC. Los resultados mostraron una disminución significativa en la expresión de los mmu-miR-133a-3p, 1a-3p y 29c-3p en tumores DG en comparación con los tumores DC (Figura 44). No se detectaron cambios en los niveles de expresión de mmu-miR-18a-3p, 148a-3p y 223-3p (Figura 44).

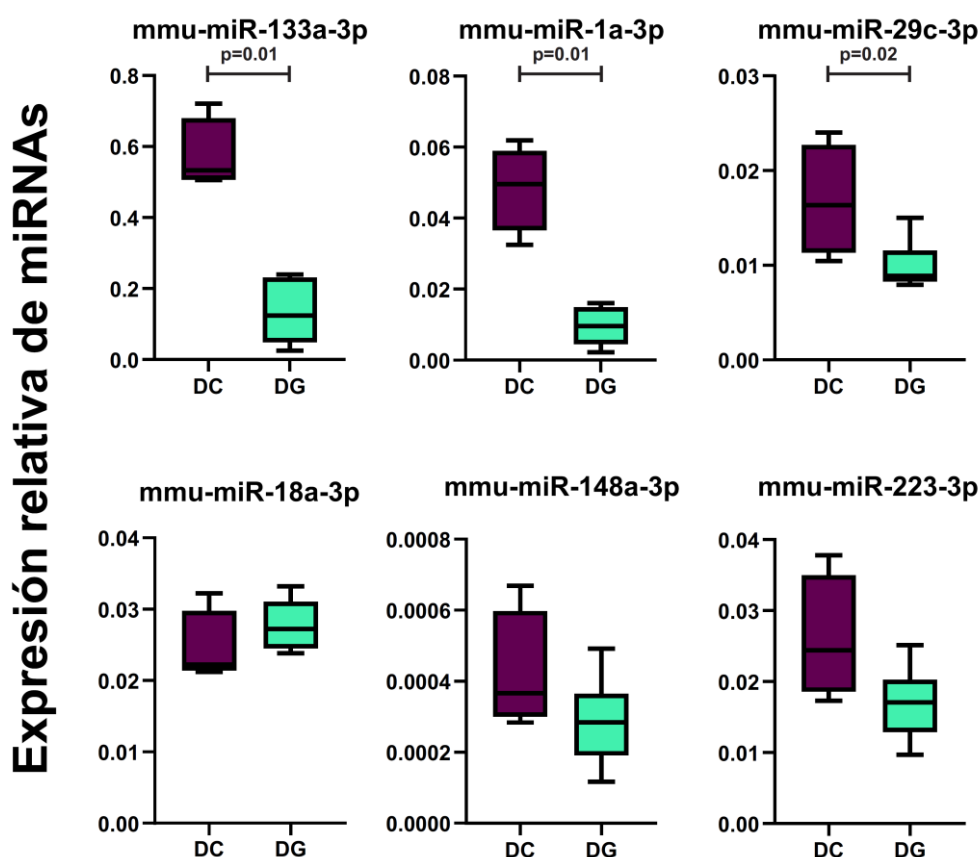


Figura 44. La DG disminuye la expresión de ciertos miRNAs en tumores TRAMP-C1 de ratones C57BL/6J. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados mediante stem-loop RT-qPCR en los tumores TRAMP-C1 generados en los ratones DC y DG, utilizando oligos específicos para los miRNAs indicados (n=8 por grupo; las corridas fueron realizadas por duplicado). Los datos fueron normalizados a la media geométrica de la expresión de los miRNAs mmu-miR-103a-3p y mmu-miR-191-5p. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Mann-Whitney.

Además, se determinó el perfil de expresión de los miRNAs en el torrente sanguíneo de ratones. Se vio que el mmu-miR-1a-3p se encontraba disminuido significativamente en el plasma de ratones DG en comparación con animales alimentados con DC (Figura 45). Los mmu-miR-133a-3p, miR-29c-3p, miR-18a-3p y miR-223-3p no mostraron cambios en los niveles de su circulación plasmática, mientras que el mmu-miR-148a-3p no se pudo detectar en circulación (Figura 45).

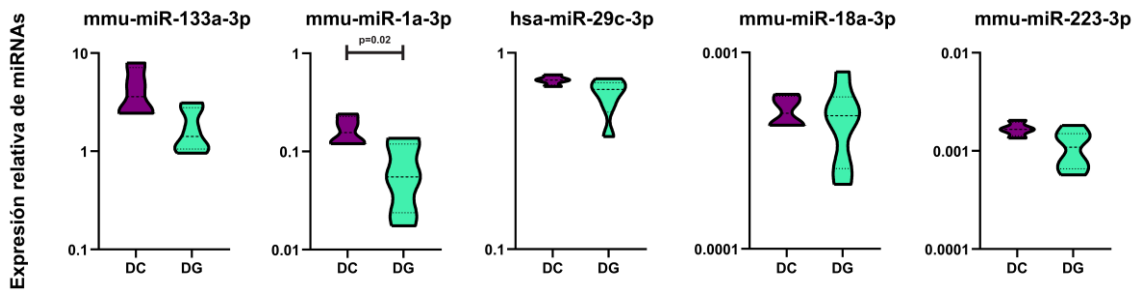


Figura 45. La DG disminuye la expresión del mmu-miR-1a-3p en el plasma de ratones inyectados con células TRAMP-C1. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados mediante stem-loop RT-qPCR en el plasma de ratones DC y DG inyectados con células TRAMP-C1, utilizando oligos específicos para los miRNAs indicados (n=8 por grupo; las corridas fueron realizadas por duplicado). Los datos se encuentran normalizados al spike-in cel-miR-39-3p. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Mann-Whitney o test de la mediana según corresponda.

Finalmente, se determinó el perfil de expresión de los miRNAs en el tejido adiposo blanco gonadal de los animales. Ninguno de los 6 miRNAs mostró cambios en su expresión por efecto de la DG (Figura 46).

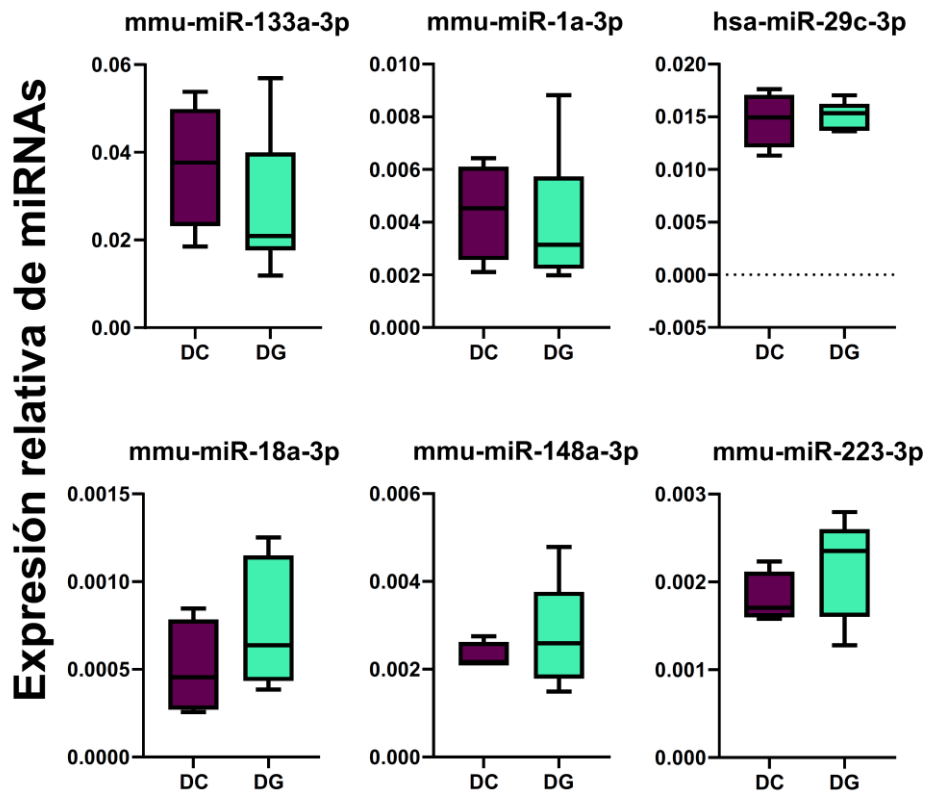


Figura 46. Expresión de los miRNAs seleccionados en el tejido adiposo gonadal de ratones DC y DG inyectados con células TRAMP-C1. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados mediante stem-loop RT-qPCR en el tejido adiposo gonadal de ratones DC y DG inyectados con células TRAMP-C1, utilizando oligos específicos para los miRNAs indicados (n=8 por grupo; las corridas fueron realizadas por duplicado). Los datos fueron normalizados a la media geométrica de la expresión de los miRNAs mmu-miR-103a-3p y mmu-miR-191-5p. Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Mann-Whitney o test de la mediana según correspondiera.

Los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p se encuentran disminuidos en tumores de próstata y en tumores metastásicos de próstata

Para investigar la relevancia en pacientes con CaP de los miRNAs estudiados en modelos murinos, se realizó un análisis bioinformático utilizando los conjuntos de datos TCGA-PRAD, GSE117674 y PRJDB5095. Primero, se evaluó la expresión de los miRNAs diferencialmente expresados en tumores primarios de próstata en comparación con el TNA. Como se muestra en la Figura 47, se vio que los hsa-miR-133a-3p y 1-3p estaban significativamente disminuidos en CaP en comparación con TNA (cohorte TCGA-PRAD). No se encontraron diferencias significativas en cuanto a la expresión de los hsa-miR-29c-3p, miR-18a-3p, miR-148a-3p y miR-223-3p.

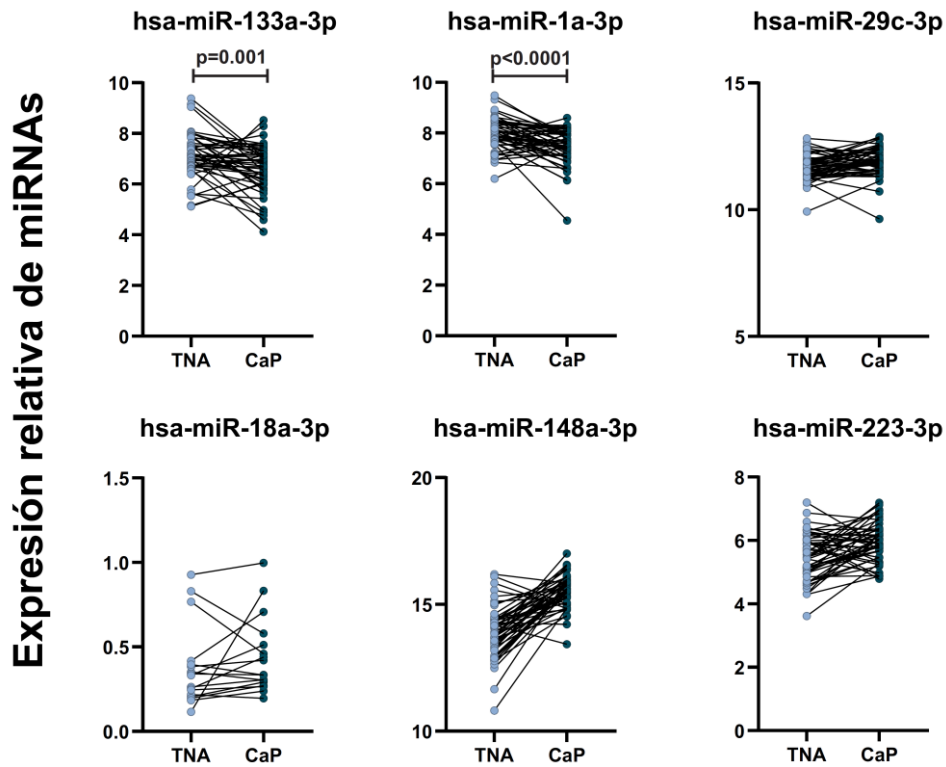


Figura 47. El hsa-miR-133a-3p y hsa-miR-1a-3p se encuentran disminuidos en tumores de pacientes con CaP en comparación con TNA. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados a partir de los datos obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaP) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD informados como $\log_2$ (LPM+1) (n=52 por grupo). Para el análisis estadístico, se utilizaron la prueba-T pareada o el test de Wilcoxon según correspondiera.

Debido a que la expresión de los miRNAs varía a lo largo de una enfermedad (Massillo et al., 2017), se decidió estudiar su perfil de expresión en tumores de pacientes con cáncer de próstata metastásico (CaPM) y tumores de pacientes sin metástasis. Para esto, se exploraron los resultados de una secuenciación de nueva generación del miRNoma pertenecientes al trabajo de Nam disponible en GEO (GSE117674) (Nam et al., 2018). El hsa-miR-133a-3p se encontraba disminuído significativamente en tumores de pacientes metastásicos (después de la cirugía) en comparación con tumores de pacientes no metastásicos (Figura 48). Por el contrario, se encontró que hsa-miR-29c-3p estaba regulado positivamente en CaPM (Figura 48). No hubo diferencias en la expresión de los

hsa-miR-18a-3p, miR-148a-3p y miR-223-3p, mientras que en esta cohorte de pacientes no se detectó al hsa-miR-1a-3p (Figura 48).

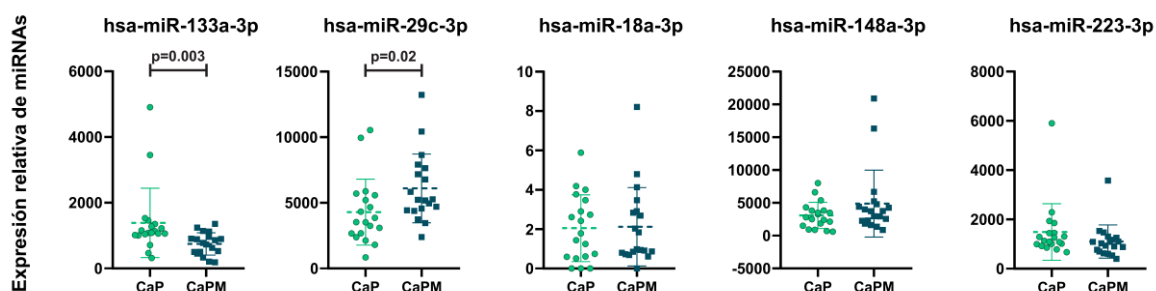


Figura 48. La expresión de miRNAs se encuentra modulada en tumores de próstata de pacientes con metastasis respecto a tumores de pacientes no metastásicos. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados a partir de los datos obtenidos de la base de datos GEO (GSE117674) en tumores de próstata no metastasicos de pacientes (CaP) y tumores de pacientes con CaP metastásico (CaPM) graficados como lecturas normalizadas (n=19 por grupo). Para el análisis estadístico, se utilizaron el test de Mann-Whitney o test de la mediana según correspondiera.

Además, se utilizó la herramienta miTED para evaluar la expresión de los miRNAs en tumores de pacientes con CaP resistente a la castración (CaPRC). Los hsa-miR-133a-3p y hsa-miR-1a-3p mostraron una tendencia a disminuir en tumores de pacientes con CaPRC en comparación con CaP (Figura 49). Es importante mencionar que el número de casos evaluados fue bajo (n=6), por lo tanto, a futuro, un aumento en el número de pacientes quizás permitiría ver cambios significativos en la expresión de dichos miRNAs.

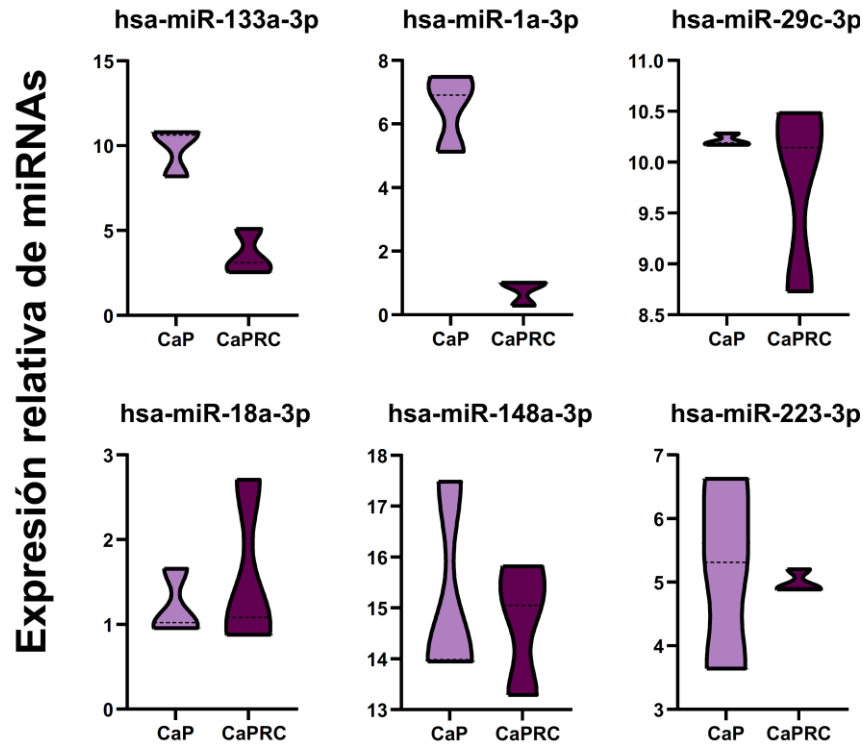


Figura 49. Expresión de los miRNAs seleccionados en tumores de pacientes con CaP y CaPRC.

Se analizó la expresión de los miRNAs indicados a partir de los datos obtenidos de la base de datos miTED (PRJDB5095) en tumores de pacientes con CaP y con CaPRC informados como log2 (LPM+1) (n=3 por grupo). Para el análisis estadístico, se utilizaron el test de Mann-Whitney o test de la mediana según correspondiera.

Como se mencionó anteriormente, se encontró que el mmu-miR-1a-3p estaba disminuido en el plasma de ratones DG (Figura 45). Además, estos ratones mostraron niveles elevados de glucosa y colesterol en sangre en ayunas (Figura 50A), pero no se encontraron cambios en su peso corporal (Figura 50B).

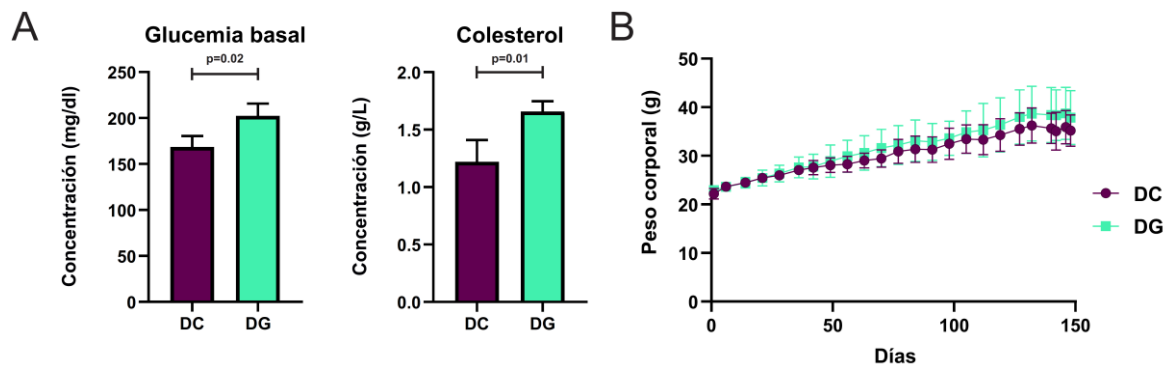


Figura 50. La DG aumenta los niveles de colesterol y glucemia basal en sangre de ratones C57BL/6J inyectados con células TRAMP-C1. (A) El colesterol y la glucemia en ayunas fueron medidos a la semana 12 post-inicio de la dieta. (B) El peso corporal fue medido una vez a la semana. En la semana 12 post-inicio de la dieta los ratones fueron inyectados en el flanco izquierdo con células TRAMP-C1. Para el análisis estadístico, se utilizaron el test de Mann-Whitney o test de la mediana según correspondiera.

Por ello, se decidió investigar la relación entre la hiperglucemia y la disminución de estos miRNAs en plasma. Para ello, se analizó la presencia de los hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, miR-29c-3p, miR-18a-3p, miR-148a-3p y miR-223-3p en muestras de sangre de pacientes con diabetes tipo 2 (DMT2) (n=6) y donantes sanos (DS) (n=4) utilizando los datos de microarreglos de expresión disponibles en el conjunto de datos GSE27645. Sin embargo, no se encontraron diferencias en los niveles circulantes de los 6 miRNAs (Figura 51).

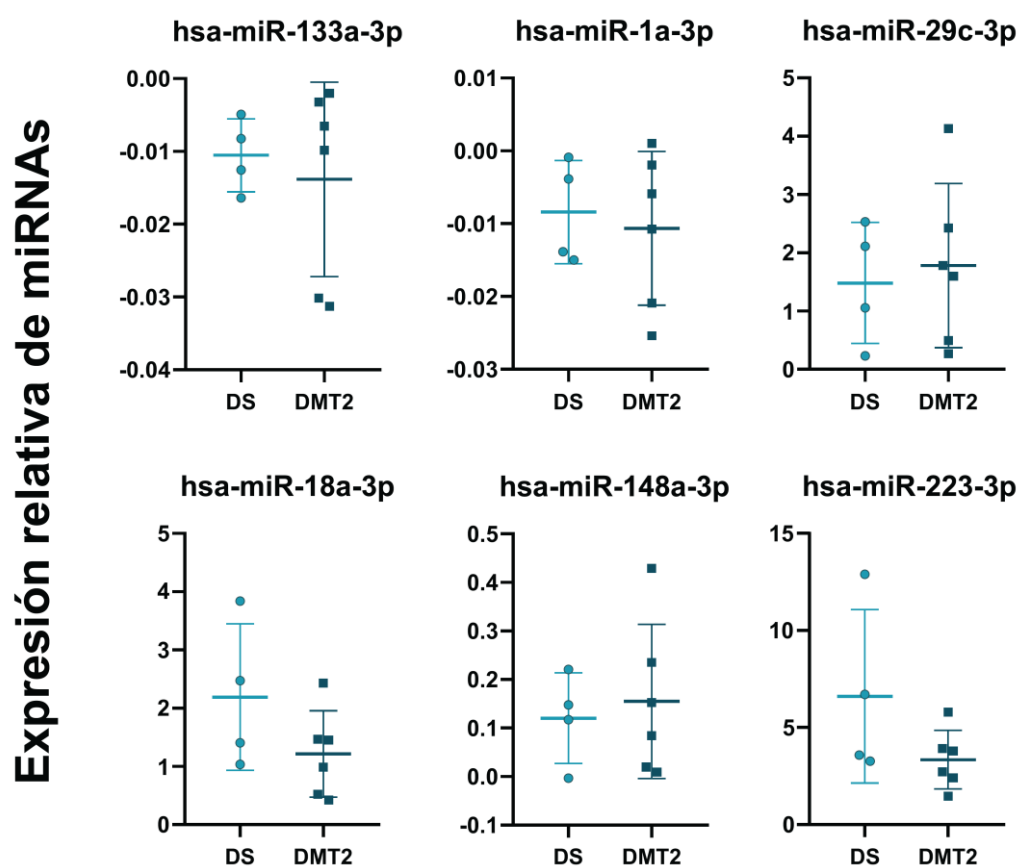


Figura 51. Expresión de los miRNAs seleccionados en la sangre de pacientes con diabetes tipo 2 y donantes sanos. Se analizó la expresión de los miRNAs indicados a partir de los datos

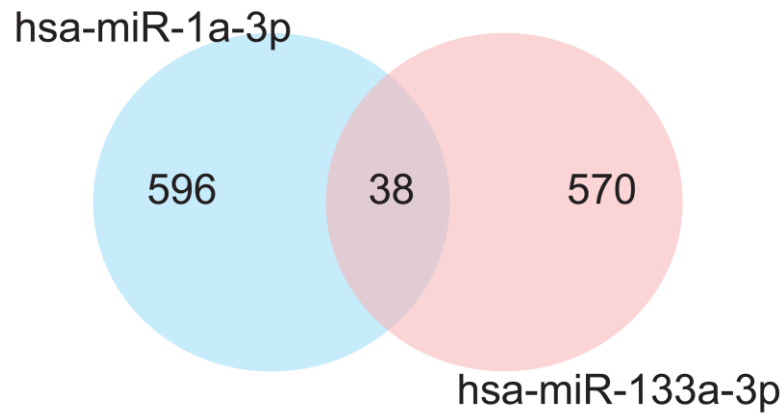
obtenidos de la base de datos GEO (GSE27645) en muestras de sangre de pacientes con diabetes tipo 2 (DMT2) y donantes sanos (DS) graficados como intensidad de señal normalizados (n DMT2=6 y n DS=4). Para el análisis estadístico, se utilizó el test de Mann-Whitney.

En resumen, la DG disminuye la expresión de miRNAs en alotransplantes de próstata, favoreciendo el crecimiento tumoral. En particular, 2 de los miRNAs regulados negativamente por la DG en tumores de próstata murinos (miR-133a-3p y miR-1a-3p) se encuentran disminuidos en tumores de pacientes con CaP y CaPM. Por lo tanto, estos resultados proponen que los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p podrían actuar como supresores tumorales en el CaP.

Los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p comparten varios genes blanco

Debido a que no había datos disponibles de genes blanco validados para los miRNAs incluidos en este estudio, se obtuvo una lista de genes blanco predichos para los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p, utilizando la herramienta bioinformática microT-CDS. Para identificar genes blanco comunes, se usó el diagrama de Venn (Figura 52A). Se encontraron 608 genes blanco para el hsa-miR-133a-3p, mientras que 634 genes blanco para el hsa-miR-1a-3p. Había 38 genes blanco en común entre el hsa-miR-133a-3p y el miR-1a-3p (Figura 52A-B).

A



B

PAX7	PFN2	GCH1	PHIP	RBMX
KMT2E	SNAP25	TRHDE	TPM4	ZNF789
SLC8A1	KCND3	COL25A1	OTX2	BCL11A
TAGLN2	TLK1	PDIK1L	TNRC6A	XKR4
NEDD4	CD2AP	PTBP1	SMIM14	CASK
ZNF280C	ZNF217	CREB5	NFATC2	KMT2C
RICTOR	SMCHD1	NCKAP1	MTPN	
PIK3C2A	NFAT5	KIAA1045	PCDH17	

Figura 52. Genes blanco predichos compartidos entre el hsa-miR-133a3p y miR-1a-3p. (A)

Diagrama de Venn realizado utilizando los genes blanco predichos obtenidos de la herramienta bioinformática microT-CDS de los miRNAs hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p. (B) Se enumeran los genes blanco compartidos entre el hsa-miR-133a-3p y el miR-1a-3p.

Además, para determinar la relevancia de los genes blanco de los miRNAs regulados negativamente en muestras humanas, se realizó un análisis de componentes principales de los 38 genes blanco comunes utilizando los datos de expresión normalizados de muestras de próstata normal (PN) (obtenidas de GTEX), TNA y tumores de próstata (obtenidas de TCGA-PRAD). El diagrama de dispersión bidimensional de los dos primeros componentes principales reveló marcadas diferencias en la expresión génica general entre las muestras de PN y CaP (Figura 53).

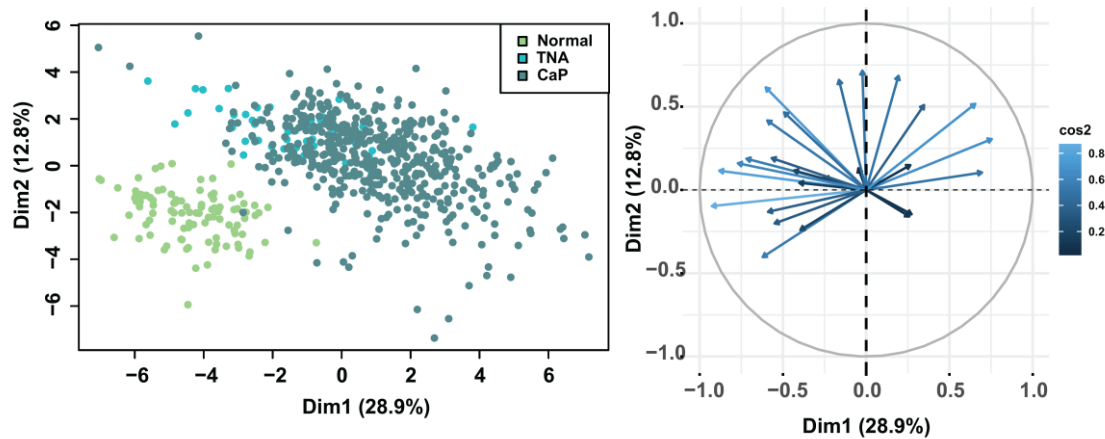


Figura 53. Gráficos del análisis de componentes principales realizado con la expresión de la firma de 38 genes blanco. (A) Utilizando los datos de expresión de los 38 genes blanco se realizó un análisis de componentes principales (PCA). Se graficó mediante un *scatterplot* las dos primeras componentes (Dim 1 y Dim 2) del PCA. Los círculos verdes, celeste y azul representan muestras de próstatas normales, TNA y tejido tumoral de próstata respectivamente. (B) Gráfico correspondiente al biplot del PCA representando los 38 genes en común y su relevancia en cada una de las dos componentes principales (Dim 1 y Dim 2). Cada flecha corresponde a un gen.

Los miRNAs regulados negativamente por la DG modulan vías relacionadas con el cáncer

Para explorar el papel funcional de los miRNAs seleccionados y las vías que modulan, se usó la herramienta bioinformática DIANA-miRPath v3 (<http://snf-515788.vm.okeanos.grnet.gr/>). Con todos los genes blanco predichos, se realizó un análisis de enriquecimiento de vías de señalización KEGG, utilizando un valor de $p < 0,05$. Este análisis reveló que los genes blanco de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p estaban asociados con procesos como la desregulación transcripcional en cáncer y la interacción del receptor ECM (Figura 54, Tabla 7).

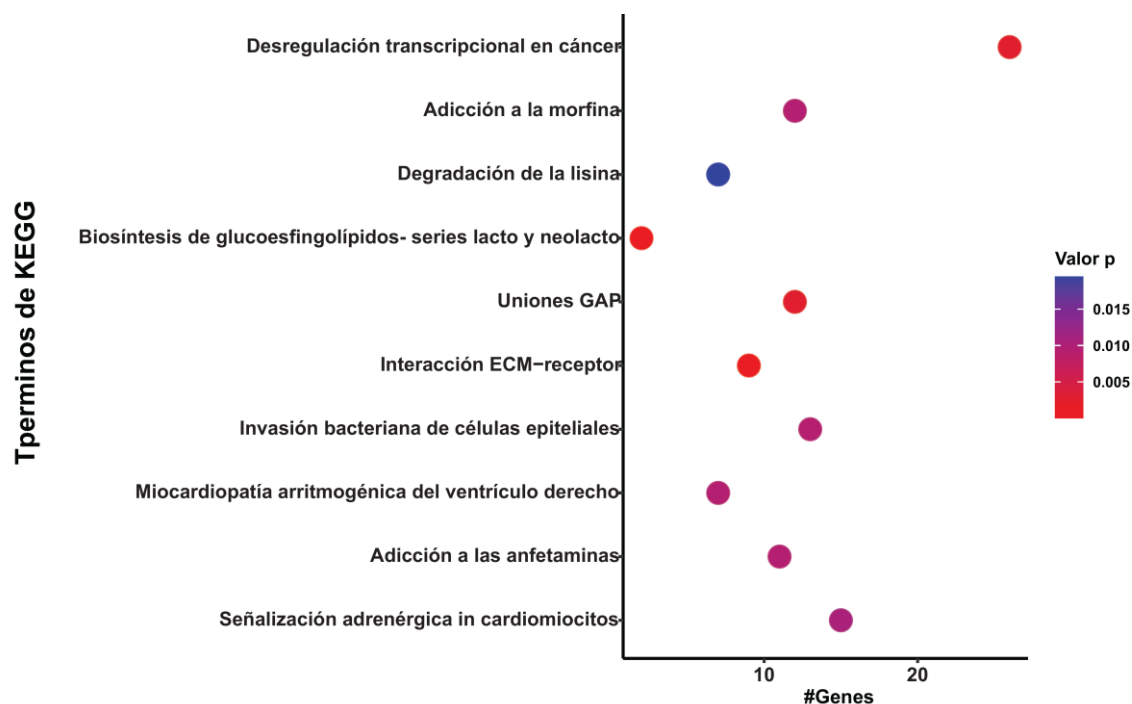


Figura 54. El hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p modulan vías relacionadas con el cáncer. Dotplot que representa las 10 principales vías significativas (valor $p < 0,05$) de KEGG asociadas a los genes blanco del hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p.

Tabla 7. Top 10 de vías de señalización de KEGG con un valor $p < 0.05$ para los genes blanco de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p.

Vías de señalización de KEGG	Valor p	#Genes	#miRNAs
Biosíntesis de glucoesfingolípidos- series lacto y neolacto	3.07E-06	2	1
Interacción ECM-receptor	7.12E-06	9	2
Uniones Gap	2.82E-03	12	2
Desregulación transcripcional en cáncer	2.82E-03	26	2
Invasión bacteriana en células epiteliales	0.00924611	13	2
Adicción a las anfetaminas	0.00953225	11	2
Adicción a la morfina	0.00953225	12	2
Miocardopatía arritmogénica del ventrículo derecho	0.00953225	7	2
Señalización adrenérgica en cardiomiocitos	0.01052284	15	2
Degradación de la lisina	0.01947552	7	2

Utilizando DIANA-miRPath v3, se realizó un análisis de GO a tres niveles: procesos biológicos, componentes celulares y función molecular. Los primeros 10 términos estadísticamente significativos (valor $p < 0,05$) se muestran en la Figura 55.

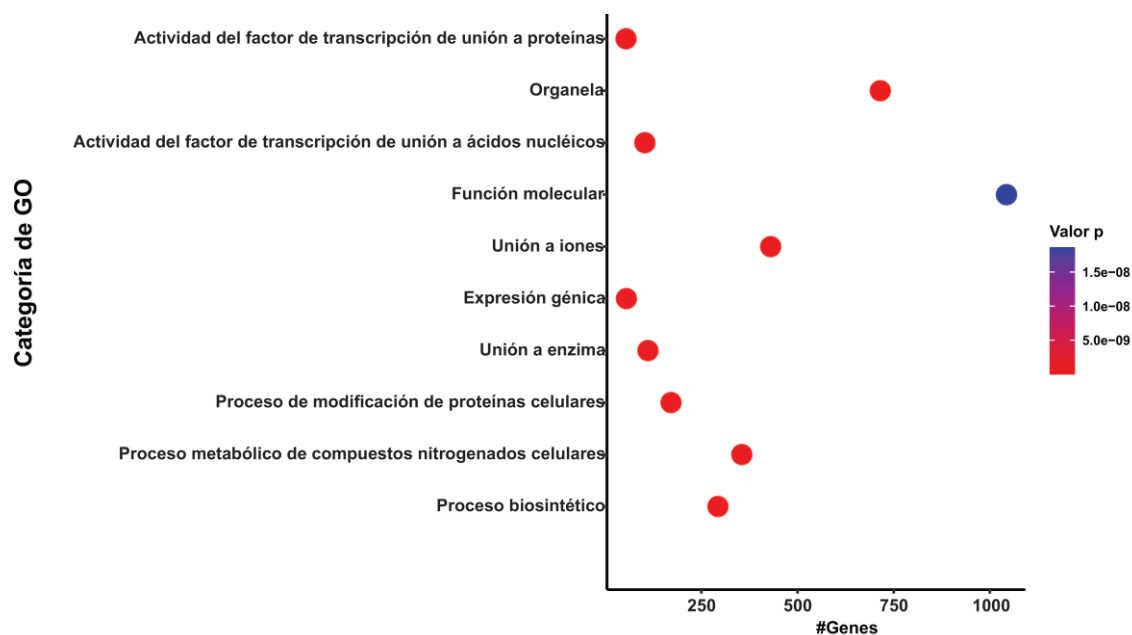


Figura 55. Análisis de enriquecimiento funcional del hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p. Dotplot que representa las 10 principales categorías significativas (valor $p < 0,05$) de GO asociadas a los genes blanco del hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p.

Los genes blanco de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p se enriquecieron en procesos asociados con la actividad del factor de transcripción de unión a ácidos nucleicos, la expresión génica y la actividad del factor de transcripción de unión a proteínas (Figura 55, Tabla 8).

Tabla 8. Top 10 de vías de categorías de Gene Ontology con un valor $p < 0.05$ para los genes blanco de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p.

Categoría de GO	Valor p	#Genes	#miRNAs
Organela	4.50E-55	715	2
Proceso metabólico de compuestos nitrogenados celulares	9.51E-27	355	2
Unión a iones	9.19E-25	430	2
Procesos biosintéticos	1.92E-17	293	2
Actividad del factor de transcripción de unión a ácidos nucleicos	4.80E-15	103	2
Cellular protein modification process	2.68E-10	171	2
Expresión génica	3.19E-10	55	2
Actividad del factor de transcripción de unión a proteínas	5.05E-10	54	2
Unión a enzima	5.05E-10	111	2
Función molecular	1.86E-08	1043	2

Los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p modulan vías específicas relacionadas con el cáncer y además, sus genes blanco en común muestran una marcada diferencia en su expresión entre tejido normal y tumoral de próstata.

GOLPH3 y JUP están aumentados en tumores primarios de próstata de pacientes

Con el fin de encontrar genes blanco relevantes para los 2 miRNAs seleccionados, se realizó una matriz de correlación, utilizando los datos de expresión de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p y la expresión de los 26 genes blanco implicados en el proceso de desregulación transcripcional en cáncer (Tabla 2) en tumores de próstata de pacientes disponibles en TCGA-PRAD (UCSC Xena). A partir de este análisis, se seleccionaron los genes blanco que mostraron un coeficiente de correlación de Spearman (ρ) negativo con los 2 miRNAs y un valor de $p < 0,05$ (Figura 56A). Se encontraron 3 genes blanco (GOLPH3, H3F3A y JUP) con una correlación negativa significativa con los miRNAs seleccionados (Figura 56B). Además, los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p mostraron una fuerte correlación positiva entre ellos con un valor p significativo (Figura 56B).

A

	hsa-miR-133a-3p	hsa-miR-1a-3p	p del miR-133a-3p	p del miR-1a-3p
GOLPH3	-0.264406625	-0.258287372	2.78E-09	6.57E-09
FUT8	-0.202432285	-0.051961187	6.29E-06	0.250948782
H3F3A	-0.182299272	-0.090144574	4.93E-05	0.046108271
CDK14	-0.155207583	-0.017668849	0.000565158	0.69642697
MLLT3	-0.104755013	-0.040745302	0.020378068	0.368117089
JUP	-0.093988907	-0.182292371	0.037541554	4.93E-05
DDX5	-0.038267497	-0.107570527	0.397980591	0.01721848
H3F3B	-0.020292425	-0.014758874	0.65408761	0.744511404
HOXA9	-0.002034218	0.007238672	0.964175551	0.873016811
WT1	0.036385945	0.136774368	0.421601291	0.002412001
PPARG	0.043253207	0.072541584	0.339348968	0.108760628
PDGFA	0.067449538	0.011665963	0.135976157	0.796726188
FLI1	0.112180967	0.175722514	0.012964721	9.22E-05
RUNX1T1	0.134641915	0.219444381	0.002822618	9.34E-07
IGF1	0.188975165	0.181196727	2.55E-05	5.48E-05
PAX7	0.20619053	0.177246832	4.18E-06	7.99E-05
MET	0.208459465	0.316104383	3.26E-06	7.84E-13
PBX1	0.223437492	0.341598989	5.83E-07	7.55E-15
PER2	0.246025302	0.275575726	3.45E-08	5.47E-10
MAX	0.257471178	0.230800135	7.36E-09	2.39E-07
PAX3	0.299415588	0.26162377	1.32E-11	4.12E-09
PML	0.336245981	0.242664066	2.04E-14	5.35E-08
MEIS1	0.490396912	0.502763624	0	0
EYA1	0.549185113	0.574308418	0	0

B

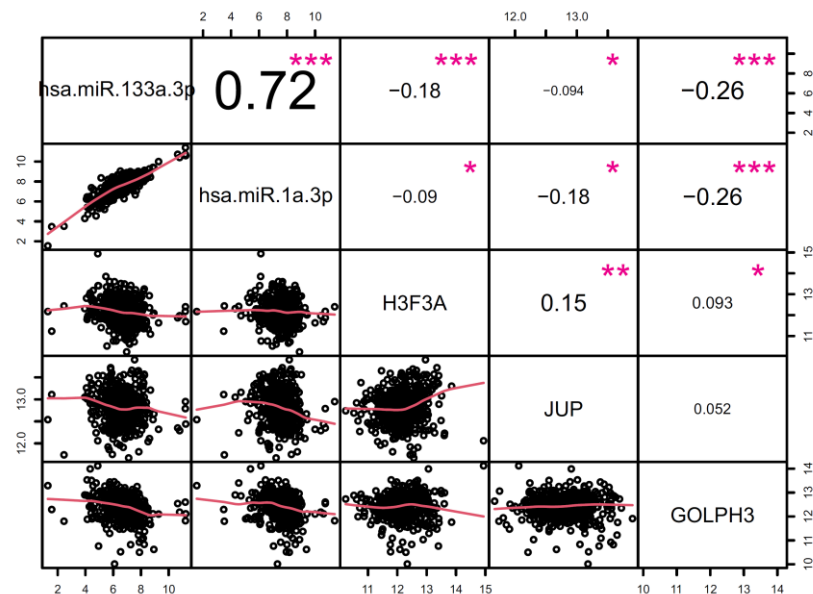


Figura 56. La expresión de los miRNAs hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p se correlaciona negativamente con la expresión de sus genes blanco seleccionados. (A) Utilizando la expresión de la firma de 26 genes blanco implicados en el proceso de desregulación transcripcional en cáncer y la expresión del hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p, en tumores de próstata de pacientes obtenidos de la cohorte de TCGA-PRAD, se realizó un análisis de correlación de Spearman. Se calculó el coeficiente de Spearman y su valor p asociado. Los genes marcados en color representan aquellos con mayor correlación negativa estadísticamente significativa con los miRNAs. (B) Representación gráfica de la correlación entre el hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p y los genes blanco mayor correlación negativa. El valor de correlación de Spearman y valor p están indicados en números y asteriscos rosas respectivamente.

Luego, se analizó el patrón de expresión de los tres genes blanco en tumores de próstata y muestras normales disponibles en TCGA-PRAD. Como se muestra en la Figura 57, se encontró que la expresión de GOLPH3 y JUP aumentó significativamente en los tumores primarios de próstata en comparación con TNA. No hubo diferencias en la expresión de H3F3A.

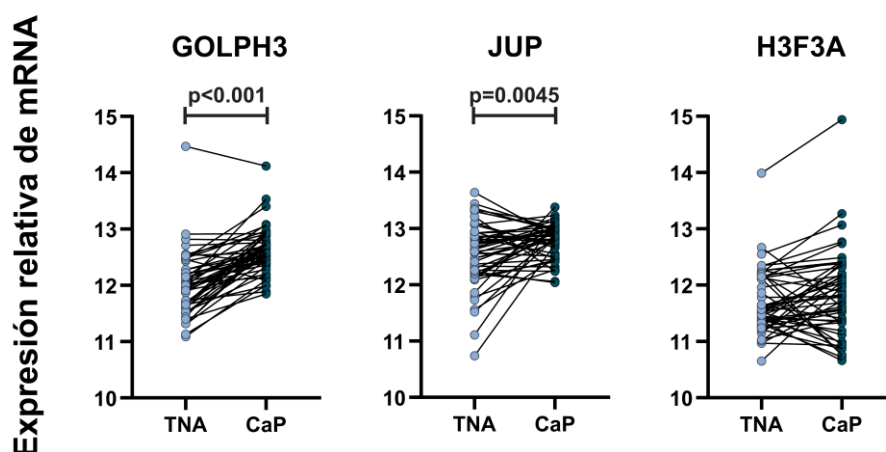


Figura 57. La expresión de 2 de los genes blanco predichos seleccionados de los miRNAs hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p se encuentra aumentada en CaP respecto a TNA en pacientes. Se analizó la expresión de los genes mencionados a partir de los datos obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaP) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD graficada como log2 (LPM+1) (n=52 por grupo). Para el análisis estadístico, se utilizaron prueba-T pareada o Test de Wilcoxon según correspondiera.

La combinación de hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP da como resultado un buen panel de biomarcadores para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP

Hasta la fecha, el examen rectal digital (Digital Rectal Exam, DRE) y la monitorización del antígeno prostático específico (Prostate-specific antigen, PSA) en suero son los métodos estándar de detección del CaP (Schmid et al., 2004). Sin embargo, el PSA es un biomarcador órgano- pero no tumor-específico, con una baja especificidad y alta tasa de falsos positivos en pacientes con hiperplasia prostática benigna (HPB). Por lo tanto, se estudió si los hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3, JUP o una combinación de ellos resultaba ser un buen biomarcador para distinguir entre pacientes con CaP y sin CaP. Para ello, se realizó un análisis de curvas ROC. Como se muestra en la Figura 58, se obtuvo un poder predictivo deficiente para discriminar entre tejido tumoral y TNA cuando se calculó el área bajo la curva (AUC) para el hsa-miR-133a-3p, el miR-1a-3p y JUP (0,659, 0,706 y 0,655, respectivamente). El AUC para GOLPH3 fue de 0,845 (Figura 58), lo que demuestra que este gen es útil para distinguir entre tejido tumoral y TNA.

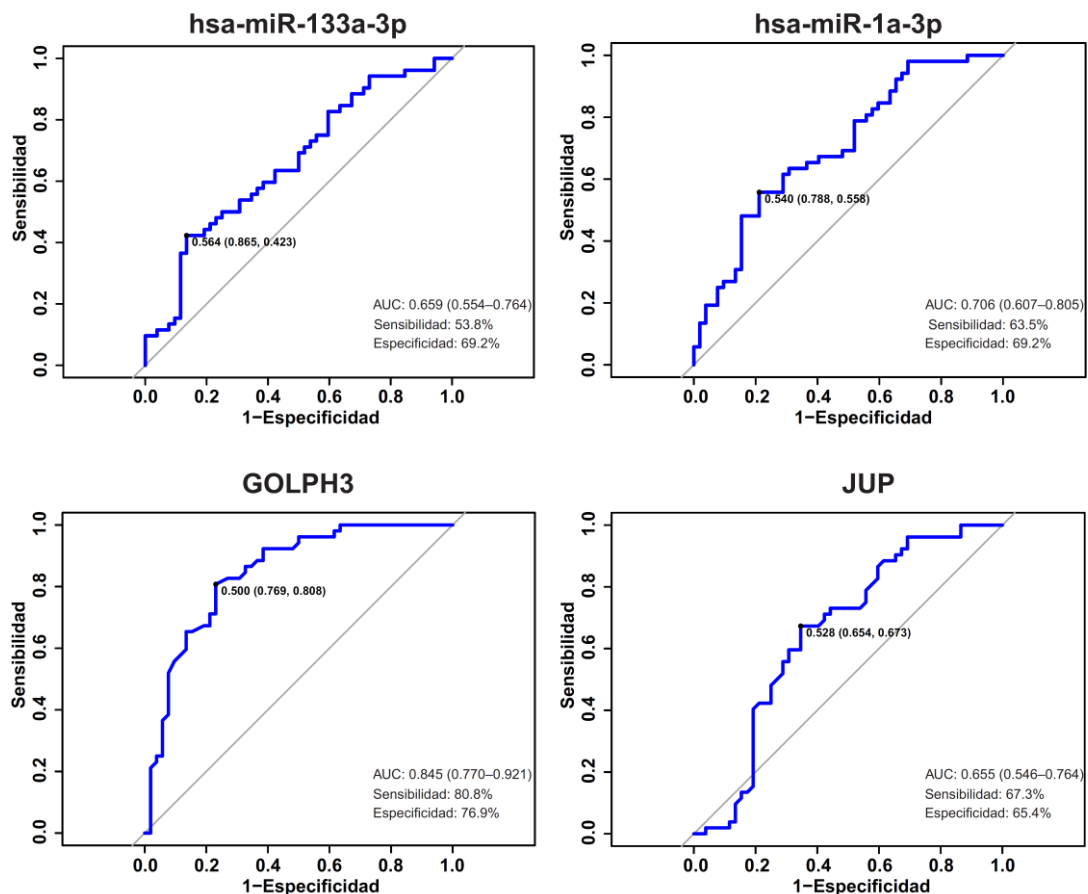


Figura 58. Curvas ROC correspondientes al hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP.

Utilizando los datos de expresión de los 2 miRNAs candidatos y sus 2 genes blanco seleccionados obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaP) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD (n=52 por grupo), se realizaron las curvas ROC correspondientes utilizando modelos logísticos. Se calcularon los valores de área bajo la curva (AUC), sus correspondientes intervalos de confianza (IC), sensibilidad y especificidad, los cuales se observan en la esquina inferior derecha de cada curva. En cada curva, en **negrita**, se representa el punto de corte. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

Sin embargo, se podría usar un panel de genes/miRNAs en la clínica en lugar de un único biomarcador diagnóstico. Por esta razón, se analizó una combinación de genes y miRNAs (hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 más JUP) como un posible panel de biomarcadores para distinguir entre tejido tumoral y TNA. Se demostró que esta combinación mejoró el desempeño de GOLPH3, obteniendo un AUC de 0,867, 86,5% de sensibilidad y 78,8% de especificidad (Figura 59).

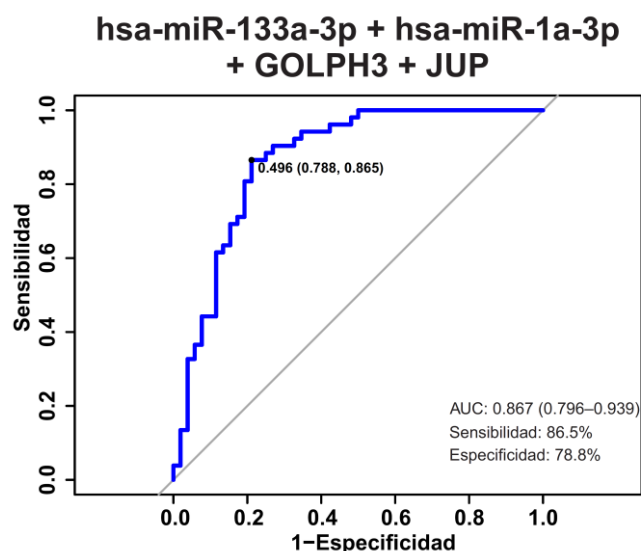


Figura 59. Curvas ROC correspondientes a la combinación del hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP. Utilizando los datos de expresión de los 2 miRNAs candidatos y sus 2 genes blanco seleccionados obtenidos de la herramienta XENA pareando tumores (CaP) y tejido normal adyacente (TNA) de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD (n=52 por grupo), se realizó la curva ROC correspondiente a la combinación de ellos utilizando un modelo logístico. Se calculó el valor del área bajo la curva (AUC), su correspondiente intervalo de confianza (IC), sensibilidad y especificidad, los cuales se observan en la esquina inferior derecha de la curva. En la curva, en negrita, se representa el punto de corte. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

En resumen, dos genes blanco predichos de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP, se encuentran disminuidos en el tejido tumoral de pacientes con CaP en comparación con TNA. A su vez, con un AUC de 0,845, GOLPH3 resulta ser un buen biomarcador diagnóstico a nivel de tejido tumoral, para distinguir entre pacientes con CaP y pacientes sanos. Sin embargo, una combinación del hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP mejora el desempeño de GOLPH3. Por lo tanto, esta combinación resulta en un buen panel de biomarcadores diagnóstico capaz de discriminar entre tejido tumoral y tejido no tumoral.

La hipermetilación del promotor hsa-miR-1-2/miR-133a-1 aumenta en CaP y se correlaciona negativamente con la expresión de los miRNAs

La familia hsa-miR-1/133 está ubicada en tres loci diferentes (como clusters de miRNAs) en los cromosomas 18q11.2 (miR-1-2/miR-133a-1), 20q13.33 (miR-1-1/miR -133a-2), y

6p12.2 (miR-206/miR-133b) (Xie et al., 2016). En este trabajo de tesis, se analizó el estado de metilación en los promotores miR-1-2/miR-133a-1 y miR-1-1/miR-133a-2. Según los recursos de Ensembl y UCSC Xena, se identificaron dos y trece sondas de metilación dirigidas a los promotores hsa-miR-1-2/miR-133a-1 y miR-1-1/miR-133a-2, respectivamente (Figura 60). Se comparó el estado de metilación de los promotores de 2 clusters (miR-1-2/miR-133a-1 y miR-1-1/miR-133a-2) en 52 muestras emparejadas de CaP y TNA. Como se muestra en la Figura 60A, una sonda (cg17106157) dirigida a miR-1-2/133a-1 mostró valores beta significativamente más altos en CaP en comparación con TNA. Además, diez y una sondas dirigidas al promotor miR-1-1/133a-2 mostraron valores beta más bajos y más altos en CaP frente a TNA, respectivamente (Figura 60B). Luego, se realizó un análisis de correlación entre la metilación del promotor y los niveles de expresión de los miRNAs maduros en 497 muestras de CaP.

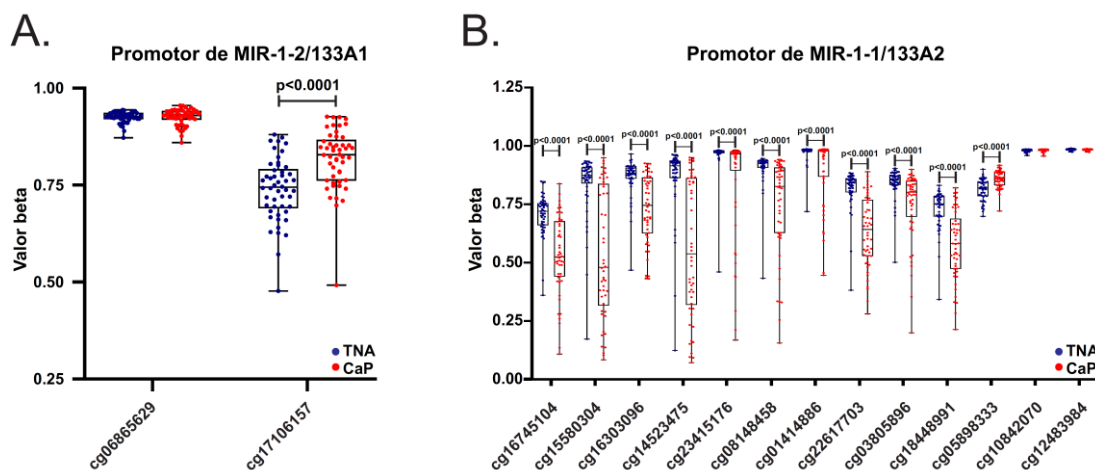


Figura 60. La hipermetilación del promotor hsa-miR-1-2/miR-133a-1 aumenta en tumores de próstata de pacientes en comparación con TNA. Los niveles de metilación de las regiones promotoras hsa-miR-1-2/133a-1 (A) y hsa-miR-1-1/133a2 (B) se estimaron a partir de los datos obtenidos de la herramienta XENA pareando CaP y TNA de pacientes pertenecientes a la cohorte TCGA-PRAD (n=52 por grupo). Los valores beta se representan gráficamente. Para el análisis estadístico, se utilizó prueba-T pareada.

Como se presenta en la Tabla 9, el análisis de correlación de Spearman mostró que la expresión de los hsa-miR-133a-3p y hsa-miR-1-3p se correlacionó negativamente con las

sondas cg17106157 (cromosoma 18) y cg05898333 (cromosoma 20). Además, la expresión de los hsa-miR-133a-3p y hsa-miR-1-3p se correlacionó positivamente con las sondas cg15580304, cg14523475, cg08148458 y cg22617703 dirigidas al promotor miR-1-1/miR-133a-2.

Tabla 9. Análisis de correlación de Spearman entre los valores de las sondas de metilación y la expresión de los miRNAs maduros.

Sonda	Localización genómica de la sonda	Localización genómica del miRNA	Coefficiente de Spearman	Valor p	miRNA maduro
cg06865629	18: 19,409,163-19,409,165	MIR133A1 18:19,405,659-19,405,746	0.01791	0.6921	hsa-miR-133a-3p
cg17106157	18: 19,410,149-19,410,151		-0.2188	<0.0001	
cg06865629	18: 19,409,163-19,409,165	MIR1-2 18:19,408,965-19,409,049	0.04883	0.2802	hsa-miR-1-3p
cg17106157	18: 19,410,149-19,410,151		-0.2621	<0.0001	
cg16745104	20: 62,550,414-62,550,416	MIR133A2 20: 62,564,912-62,565,013	0.01571	0.7283	hsa-miR-133a-3p
cg15580304	20: 62,549,384-62,549,386		0.1713	0.0002	
cg16303096	20: 62,551,783-62,551,785		0.1226	0.0065	
cg14523475	20: 62,551,912-62,551,914		0.194	<0.0001	
cg23415176	20: 62,550,739-62,550,741		0.03639	0.4211	
cg08148458	20: 62,551,653-62,551,655		0.2196	<0.0001	
cg01414886	20: 62,549,358-62,549,360		0.05243	0.2462	
cg22617703	20: 62,550,733-62,550,735		0.1317	0.0035	
cg03805896	20: 62,545,439-62,545,441		0.008004	0.8596	
cg18448991	20: 62,550,713-62,550,715		0.1049	0.0201	
cg05898333	20: 62,551,361-62,551,363		-0.2227	<0.0001	
cg10842070	20: 62,550,466-62,550,468		0.04968	0.2719	
cg12483984	20: 62,551,208-62,551,210		0.09832	0.0294	
cg16745104	20: 62,550,414-62,550,416	MIR1-1 20: 62,554,306-62,554,376	0.01178	0.7946	hsa-miR-1-3p
cg15580304	20: 62,549,384-62,549,386		0.1704	0.0002	
cg16303096	20: 62,551,783-62,551,785		0.07435	0.0999	
cg14523475	20: 62,551,912-62,551,914		0.1922	<0.0001	
cg23415176	20: 62,550,739-62,550,741		-0.01443	0.7497	
cg08148458	20: 62,551,653-62,551,655		0.2026	<0.0001	
cg01414886	20: 62,549,358-62,549,360		-0.04484	0.3214	
cg22617703	20: 62,550,733-62,550,735		0.1322	0.0033	
cg03805896	20: 62,545,439-62,545,441		0.01108	0.8065	
cg18448991	20: 62,550,713-62,550,715		0.07972	0.0776	
cg05898333	20: 62,551,361-62,551,363		-0.2671	<0.0001	
cg10842070	20: 62,550,466-62,550,468		-0.01417	0.7542	
cg12483984	20: 62,551,208-62,551,210		0.05089	0.2604	

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la disminución de la expresión observada en los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p en tumores de próstata podría deberse a una hipermetilación del promotor del cluster hsa-miR-1-2/miR-133a-1.

Los resultados del capítulo 2 de esta tesis muestran que la DG disminuyó la expresión de 3 miRNAs en alotransplantes murinos de próstata sensibles a andrógenos. A su vez, 2 de estos miRNAs (hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p) estaban disminuidos en tumores de pacientes con CaP en comparación con TNA y en tumores de pacientes con CaPM comparado con tumores de pacientes sin metástasis. Lo cual lleva a proponer a ambos miRNAs como posibles miRNAs supresores tumorales (tsmiRs).

Además, se vió que los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p modulaban vías relacionadas con el cáncer, lo que respalda la idea de que la modulación de la expresión de miRNAs por parte de una DG afecta el desarrollo del CaP.

Más aún, 2 genes blanco predichos de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP estaban aumentados en tumores de CaP en comparación con TNA. Sumado a esto, se encontró que la hipermetilación del promotor del cluster hsa-miR-1-2/miR-133a-1 aumentaba en CaP y se correlacionó negativamente con la expresión de los miRNAs, lo cual indicaría que la represión epigenética del cluster hsa-miR-1-2/miR-133a-1 podría desempeñar un papel fundamental en la agresividad del CaP al activar a GOLPH3 y JUP.

De esta manera se pudo establecer que una combinación del hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP resultó en un buen panel biomarcador diagnóstico para distinguir entre tejido tumoral y no tumoral.

Finalmente, se vió que los ratones alimentados con DG presentaron un aumento en la glucemia y colesterol basal y una disminución en los niveles de circulación en plasma del miR-1a-3p. Sumado a esto, los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p mostraron tener una tendencia a estar disminuidos en el plasma de pacientes con diabetes tipo II en comparación con voluntarios sanos. Por lo tanto, pacientes con desórdenes metabólicos podrían tener un CaP más agresivo debido a una disminución en la expresión de los tsmiRs hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p.

En conjunto, estos resultados demuestran que un estadio similar al SM aumenta el crecimiento tumoral de próstata sensible a andrógenos a través de la disminución de tsmiRs, más específicamente de los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p.

CAPÍTULO 3

LOS miRNAs CIRCULANTES SON BUENOS BIOMARCADORES PARA LA DETECCIÓN DEL CÁNCER DE PRÓSTATA

Si bien el diagnóstico del CaP ha ido mejorando con el avance de las tecnologías y del conocimiento científico, los métodos de diagnóstico actuales son insuficientes para detectar esta enfermedad de manera específica, siendo necesario desarrollar biomarcadores más sensibles. Actualmente, se utiliza al PSA como marcador de detección y diagnóstico del CaP. Sin embargo, los niveles de PSA pueden verse elevados por diversas razones, entre ellas: la edad, una infección, la eyaculación, la retención urinaria, ciertos medicamentos e incluso andar en bicicleta. Todo esto puede dar lugar a falsos positivos. Por lo tanto, el uso del PSA como marcador diagnóstico tiene ciertas ventajas clínicas, pero no es muy útil para diagnosticar con precisión la enfermedad oncológica o distinguir la enfermedad indolente de la agresiva. En este capítulo, proponemos el uso de miRNAs circulantes en plasma como potenciales biomarcadores, a través del uso de biopsias líquidas como una herramienta para complementar a los métodos de tamizaje. Para ello, mediante el uso de microarreglos de expresión en suero y secuenciación de miRNAs en plasma de pacientes con CaP y VS, se identificó un grupo de miRNAs que se encuentra aumentado en circulación de pacientes CaP respecto a VS. Luego, se validaron estos miRNAs circulantes mediante una técnica independiente (stem-loop RT-qPCR), en un número mayor de pacientes con diagnóstico de CaP comparando con VS. Finalmente, estos resultados fueron validados utilizando una cohorte de pacientes obtenida de repositorios públicos. Asimismo, se analizó la expresión de los miRNAs en tumores en comparación con TNA.

Métodos utilizados para la identificación de miRNAs candidatos

Luego de haber establecido las condiciones óptimas para la extracción de miRNAs circulantes utilizando modelos preclínicos, se procedió a analizar muestras de pacientes con CaP y VS con el objetivo de identificar y validar miRNAs para ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico del CaP. Para ello, se establecieron protocolos de investigación que fueron evaluados por varias instituciones de salud como se describe en Materiales y Métodos. Se utilizaron 11 y 24 muestras de suero de pacientes con CaP y VS respectivamente; y 65 y 68 muestras de plasma de pacientes con CaP y VS respectivamente, como se detalla en la Figura 61. Se dividieron las muestras en dos cohortes: una exploratoria y una validatoria. En la primera, se incluyeron 11 muestras de suero de pacientes con CaP y se compararon con 24 muestras de suero de VS.

Además, en esta cohorte exploratoria también se incluyeron 6 muestras de plasma de pacientes con CaP y se compararon con 4 muestras de plasma de VS. Las muestras de la cohorte exploratoria fueron usadas para la identificación de los miRNAs utilizando microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs. En la cohorte validatoria, se incluyeron 65 y 68 muestras de plasma de pacientes con CaP y VS respectivamente (donde se incluyen las 6 muestras de plasma de pacientes con CaP utilizadas en la cohorte exploratoria), que fueron utilizadas para la validación analítica (es decir por otra técnica: RT-qPCR) de los datos obtenidos de los microarreglos y la secuenciación de miRNAs. Finalmente, se utilizó una cohorte validatoria externa, la cual incluyó datos de microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs a partir de plasma y suero respectivamente, de pacientes con CaP y VS obtenidos de repositorios públicos.

Muestras usadas para la búsqueda y validación de miRNAs candidatos

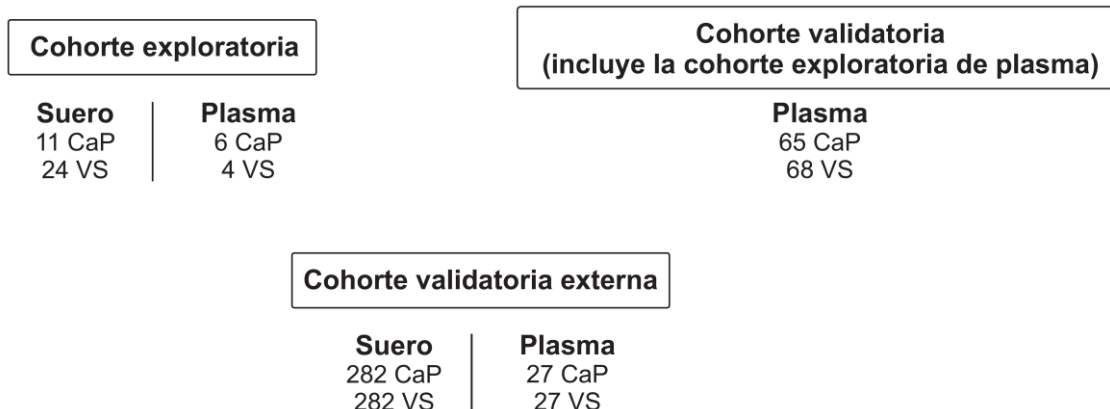


Figura 61: Esquema de las muestras y cohortes de voluntarios enrolados en el protocolo de investigación. Se colectaron muestras de plasma y suero de pacientes con CaP y VS de los distintos hospitales que se detallaron en la sección Materiales y Métodos para la identificación y validación de miRNAs que puedan ser utilizados en la detección del CaP. También se obtuvieron datos de expresión de microarreglos de expresión y secuenciación a partir de suero y plasma respectivamente, de pacientes con CaP y VS de repositorios públicos con los que se estableció la cohorte validatoria externa. El número de muestras en cada caso está indicado.

Para la identificación de los miRNAs candidatos para la detección del CaP, se utilizaron dos tecnologías, microarreglos de expresión (Affymetrix) y secuenciación de miRNAs

(GenoHub) como se observa en la Figura 62. Para la primera tecnología, se utilizó el suero de 11 pacientes con CaP y de 24 VS. Las muestras de CaP fueron sub-clasificadas de acuerdo al grado de Gleason obtenido del resultado de anatomía patológica del hospital, quedando conformados 3 subgrupos Gleason 6 (n=3), Gleason 7 (n=5) y Gleason 8-9 (n=3), como se detalló anteriormente en Materiales y Métodos. Las características clínico-patológicas para cada individuo se pueden encontrar en la Tabla suplementaria 1 del Anexo.

Se realizaron extracciones de RNA de modo tal de obtener una masa de 140 ng de RNA circulante para llevar a cabo los microarreglos de miRNAs. Se hibridizaron 7 microarreglos de miRNAs: 3 correspondientes al grupo de pacientes con CaP y 4 al grupo de VS. Como resultado se obtuvieron listas de miRNAs medidos con distintas intensidades de señal, que se analizaron utilizando el software TAC según se detalla en Materiales y Métodos.

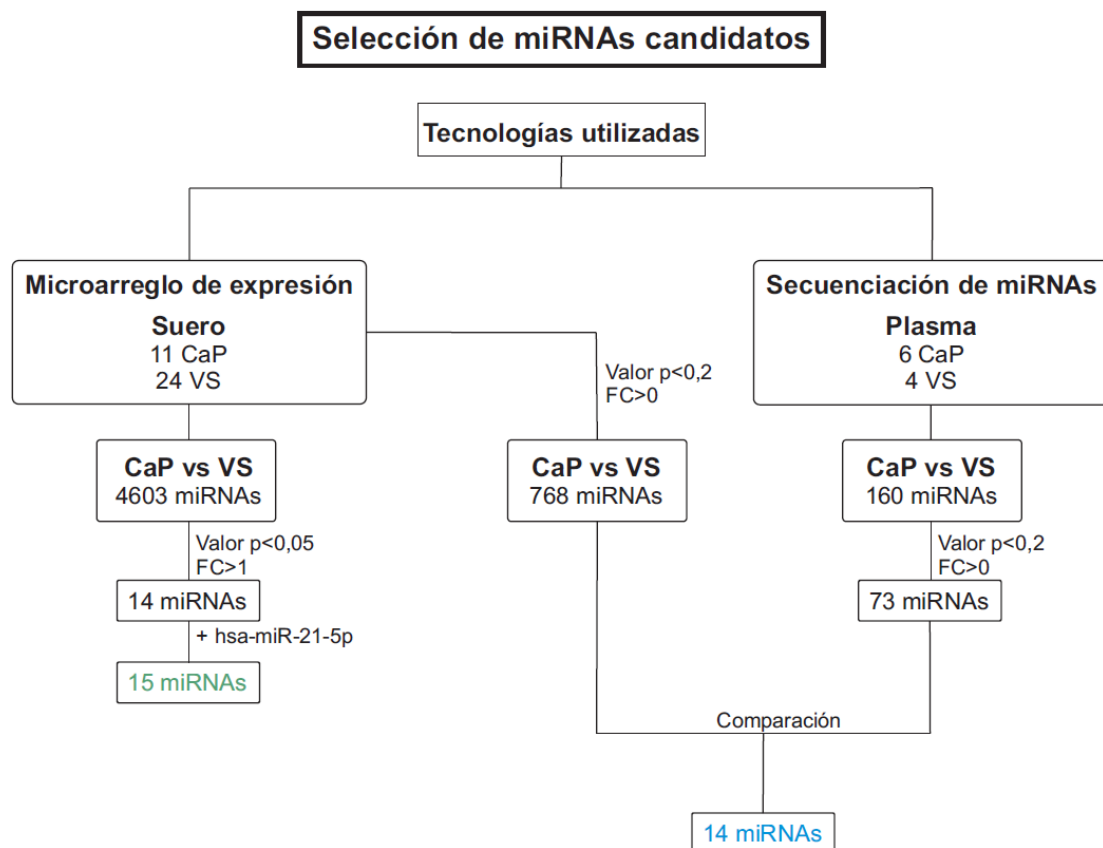


Figura 62: Esquema de la selección de miRNAs biomarcadores candidatos obtenida a partir de las diferentes cohortes de pacientes y tecnologías utilizadas. Se utilizaron dos tecnologías para la identificación de miRNAs candidatos: microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs. Se utilizó suero de pacientes con CaP o VS de la cohorte exploratoria para los microarreglos de expresión o plasma de 6 pacientes CaP y 4 VS de la cohorte validatoria para la secuenciación de miRNAs. Luego, con los datos obtenidos a partir del microarreglo de expresión, se obtuvo (con criterio de selección valor $p < 0,05$ y $FC > 1,5$) una lista de 14 miRNAs. A esta lista se le agregó, por evidencia bibliográfica, el hsa-miR-21-5p, dando una lista de 15 miRNAs. Por otro lado, con los datos obtenidos de la secuenciación se obtuvo una lista de 73 miRNAs (con criterio de selección valor $p < 0,2$ y $FC > 0$) y esta lista fue comparada con la lista de miRNAs obtenida a partir del microarreglo de expresión utilizando los mismos criterios de selección (valor $p < 0,2$ y $FC > 0$). Finalmente se obtuvieron dos listas finales de miRNAs identificadas con verde y celeste. Se indica en todos los casos el número de voluntarios y pacientes enrolados y de miRNAs obtenidos.

Como se describe en la Figura 62, para los análisis, se utilizaron como criterios de selección un valor $p < 0,05$ y veces de cambio o Fold-change (FC) $> 1,5$. Así, se generó una lista de miRNAs diferencialmente expresados con 14 miRNAs aumentados en el suero de pacientes con CaP respecto a VS, informados en la Tabla suplementaria 2 del Anexo. Basado en la bibliografía que sostiene que el hsa-miR-21-5p es un miRNA clave en el desarrollo y progresión del CaP, este miRNA fue sumado a la lista de 14 miRNAs mencionada anteriormente. Por lo tanto, se obtuvo una lista final de 15 miRNAs identificada en verde en la Figura 62 y detallada en la Figura 63 con la que más adelante se continuaron los análisis.

hsa-miR-4668-5p	hsa-miR-3174
hsa-miR-3613-3p	hsa-miR-1197
hsa-miR-548a-3p	hsa-let-7c-5p
hsa-miR-2277-5p	hsa-miR-214-3p
hsa-mir-320e	hsa-miR-497-5p
hsa-miR-548x-3p	hsa-miR-23c
hsa-miR-4532	hsa-miR-92a-1-5p
hsa-miR-101-3p	hsa-miR-181d-5p
hsa-miR-101-5p	hsa-miR-552-3p
hsa-mir-320a	hsa-miR-324-3p
hsa-miR-6893-5p	hsa-let-7a-5p
hsa-mir-3659	hsa-mir-6131
hsa-miR-4737	hsa-miR-190a-3p
hsa-miR-1285-3p	hsa-miR-3613-3p
hsa-miR-21-5p	

Figura 63: Listas finales de miRNAs candidatos para ser utilizados como biomarcadores en el diagnóstico del CaP. A partir del análisis de los resultados producto de los microarreglos de expresión y miRNA-seq, se obtuvieron dos listas de miRNAs para ser luego validadas. El recuadro señalado en color verde proviene de los análisis de los resultados obtenidos por microarreglos de expresión y el azul por secuenciación. En negrita se observan aquellos miRNAs que se lograron poner a punto y con los que se continuó la validación.

Para la segunda tecnología, se utilizó el plasma de 6 pacientes con CaP con grados de Gleason bajos (6: n=2 y 7: n=4) y de 4 VS, donde las 6 muestras de pacientes con CaP pertenecían también a la cohorte validatoria. Las muestras se enviaron en hielo seco a la empresa GenoHub en Estados Unidos, y allí se realizó la extracción de miRNAs circulantes, la secuenciación de los miRNAs y el análisis estadístico correspondiente. A partir de este análisis, se obtuvo una lista de 160 miRNAs diferencialmente expresados entre CaP y VS, listados en la Tabla suplementaria 3 del Anexo. Luego, a esta lista de miRNAs se le realizó un nuevo análisis usando como criterio de selección un valor $p < 0,2$ y $FC > 0$. De este nuevo análisis se obtuvo una lista de 73 miRNAs aumentados en el plasma de pacientes con CaP en comparación con VS, informados en la Tabla suplementaria 4 del Anexo. Los miRNAs diferencialmente expresados, y aumentados en

el plasma de pacientes con CaP (Tabla suplementaria 4 del Anexo) identificados mediante secuenciación, se compararon con una lista de miRNAs identificados en los microarreglos de expresión al comparar CaP vs VS utilizando como criterio de selección un valor $p < 0,2$ y un $FC > 0$ detallados en la Tabla suplementaria 5 del Anexo. De este nuevo análisis, se obtuvo una lista de 14 miRNAs en común, identificada en celeste en la Figura 62 y detallada en la Figura 63, con la que se continuaron también los análisis.

Una vez obtenidas las listas de miRNAs candidatos indicadas en la Figura 63, se procedió a la puesta a punto de alrededor de 21 oligos seleccionados al azar para poder llevar a cabo las RT-qPCRs correspondientes. Para ello, se diseñaron oligos siguiendo el método del Stem-loop. A continuación, se aisló miRNAs a partir del plasma de pacientes con CaP o VS pertenecientes a la cohorte validatoria. Se armó una muestra que contenía 1 ul de cada paciente con CaP ($n=37$) de esta cohorte y otra que contenía 1 ul de cada VS ($n=38$). Estas muestras combinadas, fueron utilizadas para la puesta a punto de la RT-qPCR de los 21 miRNAs candidatos. Dado que el método del Stem-loop utilizado para la identificación de miRNAs suele ser complejo, se logró poner a punto solo 7 de los 21 oligos, identificados en negro en la Figura 63, y fue con esos 7 con los que se continuó el análisis.

Validación de los miRNAs candidatos

Cohorte validatoria

Se utilizó una segunda cohorte de pacientes independientes con CaP y VS con mayor número de muestras para realizar la validación analítica (por otra técnica) por RT-qPCR. Por lo tanto, a partir de plasma de 65 pacientes con CaP y 68 VS, se aislaron miRNAs circulantes, se sintetizó cDNA y se realizaron las qPCR respectivas para los 7 miRNAs identificados. En este caso, se observó que 5 (hsa-miR-101-3p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-324-3p, miR-181d-5p) de los 7 miRNAs se encontraban significativamente aumentados en circulación de pacientes con CaP respecto a VS (Figura 64), coincidiendo con lo encontrado a partir de microarreglos de expresión y de secuenciación de miRNAs. A su vez, se realizaron todas las curvas ROC asociadas a cada uno de los miRNAs y se encontró que los 5 miRNAs son buenos biomarcadores para diferenciar a un paciente

enfermo de un individuo sano, ya que los valores de AUC en este caso rondaron aproximadamente entre 0,7 y 0,8 (Figura 65).

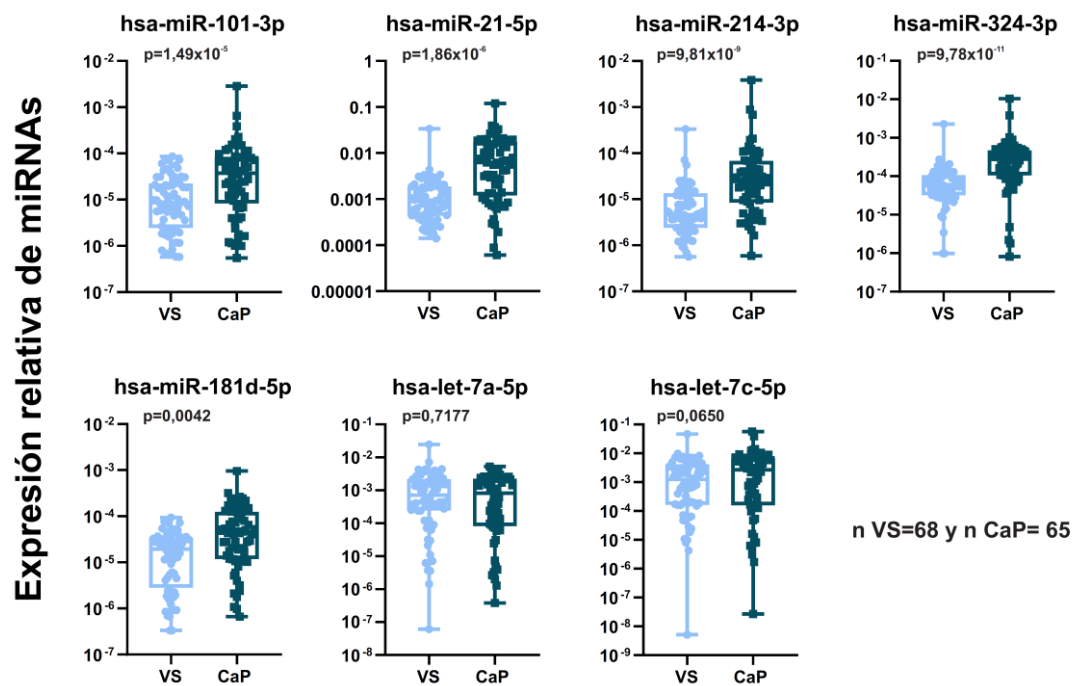


Figura 64: Validación de miRNAs candidatos en la cohorte validatoria. Expresión de los miRNAs circulantes indicados medidos por stem-loop RT-qPCR a partir de plasma de pacientes con CaP (n=65) o voluntarios sanos (VS) (n=68). Los datos se encuentran normalizados al spike-in cel-miR-39-3p. Se muestran gráficos de cajas indicando con puntos cada muestra individualmente para mostrar la variabilidad correspondiente a cada grupo experimental. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Mann-Whitney o de la mediana, según correspondiera.

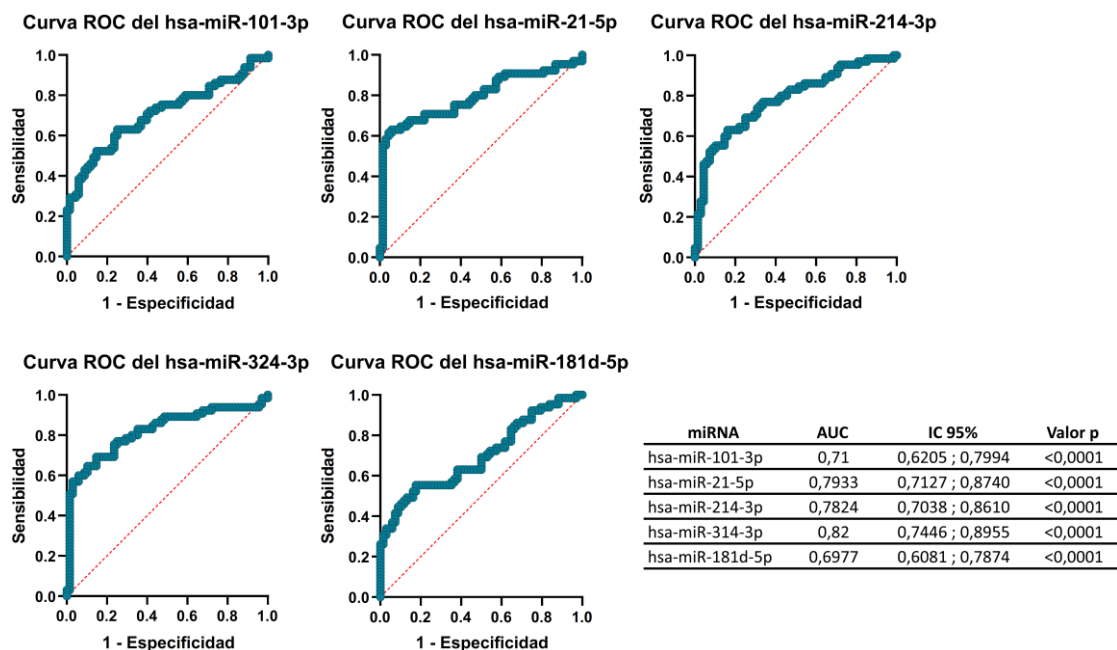


Figura 65: Curvas ROC correspondientes a los miRNAs medidos en la cohorte validatoria. Utilizando los datos de expresión de los 5 miRNAs candidatos medidos mediante stem-loop RT-qPCR a partir de plasma de pacientes con CaP (n=65) y VS (n=68), se realizaron las curvas ROC correspondientes. Se calcularon los valores de área bajo la curva (AUC), sus correspondientes intervalos de confianza (IC) y los valores p asociados, los cuales se observan en la tabla de la esquina inferior derecha. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

Cohorte validatoria externa in sílico

Finalmente, dado que los análisis realizados anteriormente en la cohorte validatoria fueron en pacientes de distintos hospitales dentro de Argentina, y en particular en CABA y GBA sin contemplar demasiada heterogeneidad, se propuso comprobar que los miRNAs encontrados también se encontrarían aumentados en cohortes de pacientes con CaP y VS en otros países, con ambientes diferentes, alimentación, etc. Para ello, al igual que en la cohorte exploratoria, se decidió analizar la expresión de los miRNAs seleccionados en plasma y suero de pacientes con CaP y VS obtenidos de repositorios públicos. A estas nuevas cohortes se las denominó validatoria externa in-sílico plasma y suero, según corresponda. En primer lugar, se obtuvieron datos de microarreglos de expresión realizados a partir de plasma de 27 pacientes con CaP y 27 VS procedentes de Virginia Commonwealth University de Estados Unidos (Mello-Grand et al., 2019). Una

vez obtenidos los datos de expresión, se procedió a analizar la expresión de los 21 miRNAs candidatos originales (identificados anteriormente en la Figura 63) en esta nueva cohorte. Estos resultados se encuentran representados en la **Tabla** suplementaria 6 del Anexo. Sin embargo, tal como se comentó anteriormente, de estos 21 miRNAs sólo se pudo poner a punto 7 miRNAs y de estos 7 miRNAs sólo 5 fueron validados mediante la técnica de stem-loop RT-qPCR. De estos 5 miRNAs finales seleccionados, sólo se vio que el hsa-miR-214-3p estaba disminuído en pacientes con CaP en comparación con VS. Los 4 miRNAs restantes no presentaron cambios en sus niveles de circulación en plasma o no se encontraron en el conjunto de datos (Tabla suplementaria 6 del Anexo).

Luego, se analizaron los niveles de circulación de los miRNAs seleccionados en el suero de pacientes con CaP y VS. Para ello, se descargaron los datos de secuenciación realizados en muestras de suero de 282 pacientes con CaP y 282 VS procedentes del National Cancer Center de Japón (Urabe et al., 2019). Sobre estos datos se analizó la expresión de los 21 miRNAs candidatos originales, tal como se muestra en la Tabla suplementaria 7 del Anexo. En particular, de los 5 miRNAs candidatos finales seleccionados se vió que los hsa-miR-101-3p, miR-214-3p y miR-324-3p estaban aumentados en el suero de pacientes con CaP con respecto a los VS (Figura 66), tal como se observó en la cohorte validatoria. Mientras que el hsa-miR-21-5p se encontraba disminuido en el plasma de pacientes con CaP y el hsa-miR-181d-5p no presentaba cambios significativos (Figura 66).

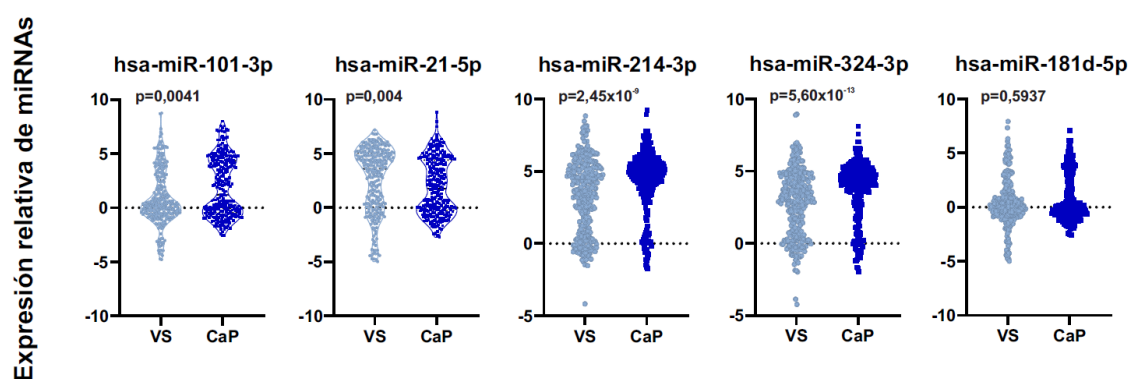


Figura 66: Validación de miRNAs candidatos en la cohorte validatoria externa *in-silico*. Expresión de los miRNA circulantes indicados obtenidos a partir de repositorios públicos. Los mismos fueron medidos mediante secuenciación de miRNAs a partir de suero de pacientes con CaP (n=282) o VS (n=282). Se realizaron gráficos de violín para mostrar la variabilidad

correspondiente a cada grupo experimental junto con los valores de su mediana y densidad. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Mann-Whitney o de la mediana, según correspondiera.

Así como se calcularon las curvas ROC en la cohorte validatoria, en estas cohortes externas validatorias *in-sílico* también se calcularon. En particular, se calcularon las curvas ROC en la cohorte externa validatoria *in-sílico* suero ya que fue la única donde se pudieron validar parte de los 5 miRNAs seleccionados. Para ello, se utilizaron los datos de expresión de la secuenciación para cada uno de los miRNAs candidatos validados (hsa-miR-101-3p, miR-214-3p y miR-324-3p). Sin embargo, a diferencia de los resultados obtenidos en plasma, se vio que los 3 miRNAs no resultaron ser buenos biomarcadores a nivel sérico dado que todos presentaron valores de AUC por debajo de 0,7 (Figura 67).

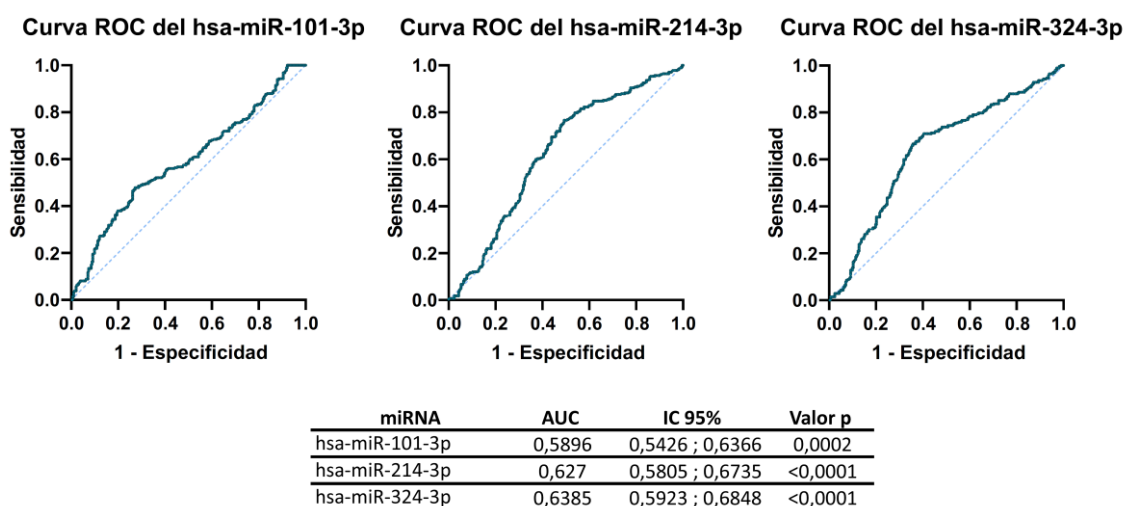


Figura 67: Curvas ROC correspondientes a los miRNAs medidos en la cohorte validatoria externa *in-sílico*. Utilizando los datos de expresión de los 3 miRNAs candidatos validados en la cohorte validatoria externa, obtenidos de repositorios públicos, medidos mediante secuenciación de miRNAs a partir de suero de pacientes con CaP (n=282) y VS (n=282), se realizaron las curvas ROC correspondientes. Se calcularon los valores de área bajo la curva (AUC), sus correspondientes intervalos de confianza (IC) y los valores p asociados, los cuales se observan en la tabla inferior. La significancia estadística utilizada fue del 5%.

De esta manera, se puede concluir que, a partir de la utilización de microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs, y mediante la validación

por stem-loop RT-qPCR a partir de muestras de plasma y suero de pacientes con CaP y VS, se identificó una firma de 5 miRNAs que podrían ser utilizados en la clínica como biomarcadores para detección de la enfermedad.

Análisis de los miRNAs candidatos en muestras de pacientes

Existe evidencia que indica que la expresión de un miRNAs a nivel de tejido tumoral no necesariamente condice con el comportamiento de dicho miRNA en circulación en el contexto de una enfermedad como podría ser el cáncer. Es por ello que en el presente trabajo se analizó la expresión de los 5 miRNAs candidatos a ser utilizados como biomarcadores en circulación en tejido tumoral y TNA utilizando datos disponibles en TCGA-PRAD (UCSC Xena). Este análisis se realizó de manera puramente descriptiva en una cohorte de pacientes de la que se disponía de información, ya que, para hacer una comparación más rigurosa y sobre la cual sacar conclusiones comparando miRNAs circulantes y tumorales, se debería haber analizado, de los mismos pacientes utilizados anteriormente, la expresión de los miRNAs tanto en los tumores como en TNA. Sin embargo, estos tejidos no se encontraban a disposición, dado que no se logró conseguir una cantidad suficiente de tejido tumoral y TNA para comparar en los pacientes enrolados.

Expresión de los miRNAs comparando CaP y TNA

A partir de los datos de expresión de miRNAs obtenidos de TCGA-PRAD (UCSC Xena), se analizó la expresión de los 5 miRNAs candidatos mencionados anteriormente en tejido tumoral y en TNA de manera pareada para 56 individuos. Se encontró que los miRNAs hsa-miR-101-3p, miR-21-5p y miR-324-3p estaban aumentados en tejido tumoral comparado con TNA (Figura 68). No se encontraron diferencias entre la expresión en CaP y TNA en el caso de los miRNAs miR-214-3p y miR-181d-5p (Figura 68).

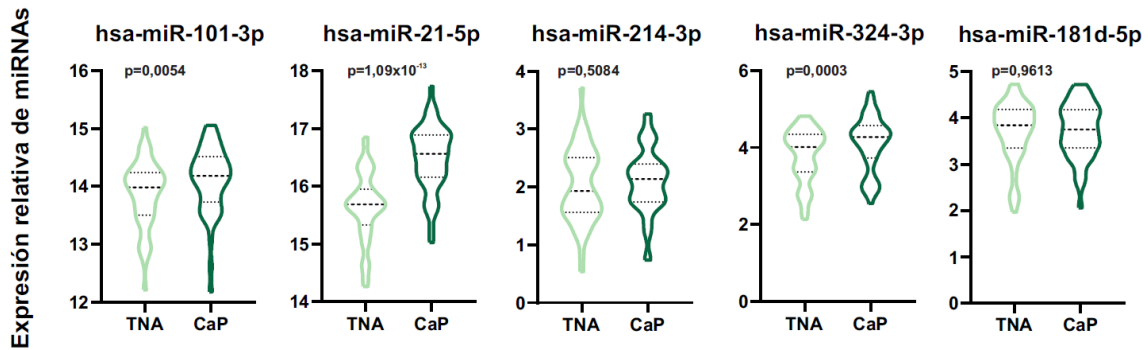


Figura 68: Expresión de miRNAs candidatos en tejido tumoral y normal adyacente. Los datos de expresión de los 5 miRNAs candidatos de tejido tumoral de CaP (Tumor) (n=52) y tejido normal adyacente (TNA) (n=52) informados como $\log_2$ (LPM+1) se obtuvieron utilizando la herramienta bioinformática XENA. Se muestran gráficos de violín para indicar la variabilidad correspondiente a la expresión de los miRNAs en cada tejido junto con los valores de su mediana y densidad. Los datos graficados corresponden a muestras pareadas de las que se obtuvieron tanto tejido tumoral como TNA. La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T pareada.

Modelos predictivos propuestos

Luego de establecidos los subgrupos de miRNAs candidatos, se procedió a la construcción de los modelos predictivos utilizando los valores de Ln de la expresión de dichos miRNAs circulantes medidos mediante stem-loop RT-qPCR en plasma de pacientes con CaP o VS mediante el uso de técnicas de *machine learning*. En particular, se utilizó la regresión logística, ya que permite generar un modelo que dé como resultado la probabilidad que tiene un individuo de tener o no determinada condición o enfermedad. Esto permite clasificar a distintos individuos como sanos o enfermos teniendo en cuenta la probabilidad calculada para cada uno por el modelo predictivo. Otro punto importante a tener en cuenta es que la regresión logística también evaluará si cada una de las variables (los miRNAs en este caso) utilizadas en el modelo son relevantes o no, con un valor p asociado. Aquellas que tuvieran un valor p mayor a 0,4, serán eliminadas del modelo predictivo.

Para el presente trabajo, se construyeron en total 4 modelos predictivos, tal como se observa en la Figura 69. El Modelo 1 estuvo conformado por los 5 miRNAs candidatos;

el Modelo 3 estuvo conformado por 4 miRNAs (miR-21-5p, miR-101-3p, miR-324-3p y miR-214-3p), aquellos que el valor p fuese menor a 0,4 en el Modelo 1. Luego, se construyó el Modelo 2 a partir de los miRNAs que tuviesen un AUC tal que indique que fuesen buenos biomarcadores, donde el AUC sea mayor a 0,7. También se construyó el Modelo 4 utilizando los miRNAs con un valor p menor a 0,4 en el modelo 3 (miR-21-5p y miR-214-3p). El criterio de selección final se realizó al comparar las métricas particulares de cada modelo.

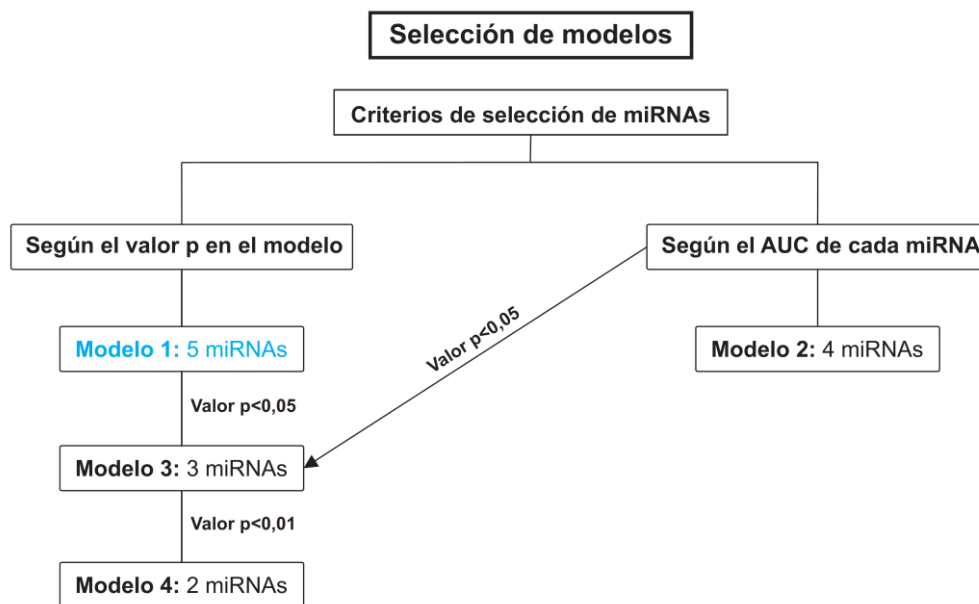


Figura 69: Esquema para la seleccin de modelos predictivos y tcnicas utilizadas. Se utilizaron dos tcnicas para la seleccin de modelos predictivos: seleccionar los miRNAs de acuerdo al valor p en el modelo con los 5 miRNAs y seleccin de miRNAs de acuerdo a su AUC. Se construyeron todos los modelos utilizando tcnicas de *machine learning* y se seleccion el mejor modelo, indicado en color celeste.

A la hora de elegir el mejor modelo posible, es muy importante definir el criterio que se utilizar para tal fin, el cual se basar en la métrica que busque destacar o maximizar/minimizar. Dentro de las métricas que se pueden calcular de un modelo, las 6 que se definen en la Figura 70 suelen ser las más utilizadas. Si, por ejemplo, se busca “no perderse” ningún individuo potencialmente enfermo, como es nuestro caso, se buscará aquel modelo que tenga mayor sensibilidad, dado que es preferible realizar otro

análisis para descartar la enfermedad que sub-diagnosticarlo o, en otras palabras, tener una tasa un poco más alta de falsos positivos que de falsos negativos. Por otro lado, si se buscara descartar una enfermedad, se intentaría que la prueba o modelo a utilizar tenga una alta especificidad. Otra métrica interesante es la Precisión o valor predictivo positivo, dado que da cuenta de la performance del modelo. Evalúa qué tan bien fueron clasificados tanto enfermos como sanos al usar el modelo y, por otro lado, qué tan bien fueron clasificados como positivos los individuos realmente enfermos respectivamente. A su vez, a la hora de evaluar el valor predictivo negativo, este parámetro habla también de qué tan bien funciona el modelo, al saber la proporción de individuos clasificados como negativos dentro de aquellos sanos. Finalmente, el AUC ROC combina tanto la especificidad como la sensibilidad como fue mencionada anteriormente, y, a su vez, son muy útiles para determinar el punto de corte o *threshold* que se utilizará para clasificar a los individuos como sanos o enfermos. Este punto de corte es un valor de probabilidad, como el que se calcula para cada individuo del modelo, y se establece que, si el valor del individuo está por encima del punto de corte se clasificará como enfermo, y si se encuentra por debajo, como sano.

Sensibilidad Porcentaje de individuos enfermos que son clasificados como positivos según el modelo
Especificidad Porcentaje de individuos sanos que son clasificados como negativos según el modelo
AUC ROC Área bajo la curva ROC que combina datos de sensibilidad y especificidad para determinar el punto de corte
Precisión (VPP) Porcentaje de verdaderos enfermos dentro de los que fueron clasificados como positivos según el modelo
Valor predictivo negativo Porcentaje de verdaderos individuos sanos dentro de los que fueron clasificados como negativos según el modelo
Tasa de falsos positivos Porcentaje de individuos que fueron clasificados según el modelo como enfermos siendo sanos

Figura 70: Conjunto de definiciones sobre las métricas para medir la *performance* de un modelo predictivo. Se listan las seis métricas más utilizadas en el *machine learning* a la hora de comparar modelos y las definiciones de cada una.

Luego de realizar todos los modelos predictivos utilizando las técnicas de *machine learning* previamente descriptas, se calcularon las métricas asociadas a cada uno y se enlistaron en la Tabla 10. En la misma se pueden observar todas las métricas de los modelos nombrados del 1 al 4 y los nombres de los miRNAs involucrados en cada modelo. El modelo elegido, en principio, fue el Modelo 1 (comprendido por los 5 miRNAs: miR-21-5p, miR-101-3p, miR-214-3p, miR-324-3p y miR-181d-5p) ya que fue el que mostró la sensibilidad más alta de los 4, con un valor del 91,17%, seguida del Modelo 4 con una sensibilidad del 77,94%, luego el Modelo 2 y 3 con una sensibilidad del 76,47%. Respecto al resto de las métricas, solo se hará foco en las del modelo elegido.

En particular el Modelo 1 contó con una especificidad del 70,76%, una precisión del 76,54%, un valor predictivo negativo del 88,46% y una tasa de falsos positivos del 29,23%. El valor del AUC ROC fue similar en todos los modelos, lo que habla que, si bien el mejor modelo en cuanto a la sensibilidad fue el 1, todos son buenos modelos predictores para el CaP.

Tabla 10: Resumen de los miRNAs incluidos y las métricas obtenidas a partir de los modelos predictivos.

Modelo	miRNAs incluidos	Punto de corte	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	AUCROC	Precisión (VPP) (%)	Valor predictivo negativo (%)	Tasa de falsos positivos (%)
1	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-214-3p, hsa-miR-181d-5p	0,4490686	91,17647	70,76923	0,8407	76,54321	88,46154	29,23077
2	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-214-3p	0,5702225	76,47059	78,46154	0,84	78,78788	76,1194	21,53846
3	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-101-3p, hsa-miR-214-3p	0,5681872	76,47059	78,46154	0,84	78,78788	76,1194	21,53846
4	hsa-miR-21-5p, hsa-miR-214-3p	0,5238976	77,94118	78,46154	0,8206	79,10448	77,27273	21,53846

En base a los resultados mencionados, se puede concluir que, mediante técnicas de machine learning, se obtuvo un modelo predictivo que incluye 5 miRNAs (miR-21-5p, miR-101-3p, miR-214-3p, miR-324-3p y miR-181d-5p), que es capaz de discriminar entre individuos sanos y enfermos con un 91,17% de sensibilidad y un valor predictivo positivo del 76,54% y una especificidad de 70,76%.

DISCUSIÓN

La dieta grasa aumenta la expresión de oncomiRs en tumores de próstata insensible a andrógenos

En el primer capítulo del presente trabajo de tesis, utilizando un modelo murino y muestras de pacientes con CaP, se identificaron dos miRNAs: hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p como posibles biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de CaP asociado a la DG. En particular, se encontró que la DG aumenta la expresión de 7 miRNAs (hsa-miR-19b-3p, miR-320a-5p, miR-101-3p, miR-3613-3p, miR-1207-5p, miR-5095 y miR-2277-5p) en xenotransplantes de CaP, que están involucrados en vías metabólicas y relacionadas con el cáncer. Solo 4 de estos miRNAs (hsa-miR-19b-3p, miR-101-3p, miR-1207-5p y miR-5095) se encontraron aumentados en el torrente sanguíneo de pacientes con CaP en comparación con voluntarios sanos. Además, se vio que los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p aumentaron significativamente en tumores de próstata de pacientes metastásicos en comparación con tumores de pacientes con CaP no metastásicos. Asimismo, el análisis de curvas ROC mostró que ambos miRNAs son candidatos prometedores a biomarcadores para distinguir entre CaP y TNA, y pacientes metastásicos y no metastásicos a nivel tumoral, mientras que a nivel sérico resultaron ser poco útiles como biomarcadores de CaP.

En la literatura, hay numerosa evidencia que propone al hsa-miR-19b-3p como un oncomiR. En particular, Osip'yants et al. realizó una clasificación de pacientes con CaP basado en miRNAs utilizando muestras de plasma de CaP no metastásico y metastásico (Osip'yants et al., 2017). Descubrieron que los pacientes con CaP metastásico mostraban niveles plasmáticos más altos del hsa-miR-19b-3p junto con el miR-297 en comparación con los pacientes no metastásicos (Osip'yants et al., 2017). Otro estudio mostró que el hsa-miR-19b-3p (también llamado hsa-miR-19b) se encontraba aumentado en las líneas celulares de CaP BPH-1, PC3 y 22Rv1, y disminuido en las células DU-145, en comparación con las células epiteliales prostáticas normales PNT1B (Tian et al., 2013). El mismo grupo demostró que el hsa-miR-19b junto con otros 3 miRNAs promovieron la proliferación celular *in vitro* de células de CaP mediante la regulación directa de PTEN y sus señales posteriores, PI3K/Akt y ciclina D1 (Tian et al., 2013). El hsa-miR-19b-3p pertenece al cluster miR-17-92, el cual posee propiedades oncogénicas debido a su participación en la regulación de la supervivencia celular, proliferación, diferenciación y

ciclo celular. La estimulación de la hiper-expresión de este grupo en las células DU-145 llevó a un aumento de las actividades proliferativas, migratorias e invasivas (Zhou et al., 2016). El miR-19 ha sido considerado el componente oncogénico clave del grupo mencionado anteriormente, ya que el miR-19 (incluidos hsa-miR-19a y hsa-miR-19b) suprimió parcialmente la expresión de PTEN, activando la vía de señalización AKT-mTOR y promoviendo la supervivencia celular (Olive et al., 2009).

En conjunto, estos hallazgos de otros grupos de investigación respaldan firmemente los resultados obtenidos en el primer capítulo de este trabajo de tesis, proponiendo al hsa-miR-19b-3p como un biomarcador potencial para el diagnóstico y pronóstico del CaP.

Por otro lado, en el primer capítulo del presente trabajo de tesis se propuso al hsa-miR-101-3p como un buen biomarcador para el diagnóstico, la progresión y la respuesta a la terapia en CaP. El hsa-miR-101-3p (también llamado hsa-miR-101) se encontró disminuido en las células DU-145 y PC3 en comparación con la línea celular epitelial de próstata no tumorigénica PWR-1E, mientras que se vio aumentado en la línea celular LNCaP (P. Cao et al., 2010). Otro trabajo mostró que el hsa-miR-101 inducía la apoptosis en células CaP a través de la disminución de la expresión de RLIP76 seguida de supresiones concomitantes de la vía PI3K/AKT/Bcl-2 (Yang et al., 2015). Sin embargo, estudios recientes, en oposición a los resultados presentes en este primer capítulo, han demostrado que el hsa-miR-101-3p se encuentra disminuido en tumores y es menos abundante en el torrente sanguíneo de pacientes con CaP metastásico en comparación con pacientes con CaP no metastásico (Antognelli et al., 2018; Y. Lin et al., 2018). Estos resultados contradictorios pueden deberse a la heterogeneidad del CaP, en particular a las diferentes cohortes de pacientes analizadas. Por otro lado, en este trabajo de tesis se demostró que el hsa-miR-101-3p está aumentado en los exosomas de pacientes con CaP en comparación con los exosomas de los voluntarios sanos.

Teniendo en cuenta estos resultados, el hsa-miR-101-3p podría desempeñar un papel en sitios metastásicos distantes, resultando en un miRNA esencial para investigar en el futuro en muestras de metástasis de CaP de pacientes.

En base a estos resultados, se decidió investigar los posibles efectos de estos 2 miRNAs candidatos a biomarcadores en los tumores de próstata y su agresividad. Se determinó que 12 genes blanco que se correlacionaban negativamente con el has-miR-19b-3p en muestras de tumores de pacientes con CaP estaban involucrados en las vías moleculares: proteoglicanos en cáncer y adhesión focal. Además, se demostró que los genes: RDX, ITGB1, ITPR1, ITGB8, TLN1 e ITGA6 estaban regulados negativamente en tumores de CaP en comparación con muestras de TNA. El grupo de *Bartholow et al.* (Bartholow et al., 2011) encontró que la tinción inmunohistoquímica de RDX (Radixin) presentaba una mayor intensidad en la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) y próstatas normales, mostrando los niveles más bajos de tinción en el adenocarcinoma prostático. Esta evidencia respalda los resultados obtenidos en este trabajo. Sin embargo, estudios *in vitro* demostraron que se requiere de RDX para la migración de células PC3, y que su depleción por interferencia de un RNA aumentó el área de propagación celular y la adhesión célula-célula mediada por uniones adherentes (Valderrama et al., 2012).

En cuanto a ITGB1, se encontró que su eliminación inhibió significativamente la migración y la invasión de células de CaP al regular la señalización río abajo (Kurozumi et al., 2016). Además, ITGB1 se vio expresado en gran medida en tumores de próstata (Kurozumi et al., 2016) y exosomas derivados de la orina de pacientes con CaP metastásico (Bijnsdorp et al., 2013).

Por otro lado, se sabe poco sobre la participación de ITPR1 (también llamado IP3R1) en el CaP. Se encontró que las células DU-145 contienen aproximadamente un 10 % de ITPR1 y un 90 % de ITPR3 (Vanoverberghe et al., 2003). La depleción de ITPR1 impidió la inducción de apoptosis en células DLD1 de cáncer colorrectal, células A2780 de cáncer de ovario y células RCC4 de carcinoma renal de células claras, en comparación con la apoptosis en células tratadas con un siRNA control (Rezuchova et al., 2019). Además, ITPR1 está involucrado en la apoptosis inducida por SFN (sulforafano) a través del agotamiento del calcio reticular y la modulación de los factores de transcripción a través

de la regulación positiva del calcio nuclear (Hudecova et al., 2016). En conjunto, estos resultados indican que ITPR1 tiene un efecto pro-apoptótico.

En un análisis *in silico* de un microarreglo de progresión del CaP disponible en Oncomine, ITGB8 se vio expresado en gran medida en la neoplasia intraepitelial prostática (Mertens-Walker et al., 2015). Además, la eliminación de ITGB8 disminuyó la migración e invasión de las células PC3 y 22Rv1 (Mertens-Walker et al., 2015). Sin embargo, de manera similar a nuestros hallazgos, el grupo de *He et al.* (Z. He et al., 2018) demostró que ITGB8 estaba regulado negativamente en el CaP en comparación con el tejido paracanceroso correspondiente.

Se informó que la sobreexpresión de TLN1 mejoró la adhesión, la migración y la invasión de células CaP al activar señales de supervivencia y conferir resistencia a anoikis, mientras que la pérdida de TLN1 mediada por shRNA condujo a una inhibición significativa de la metástasis de CaP en experimentos *in vivo* (Sakamoto et al., 2010). Además, la proteína TLN1 se encontró regulada positivamente en tejidos de CaP en comparación con el tejido de pacientes con HPB, y resultó ser un predictor independiente de metástasis en los ganglios linfáticos y recurrencia bioquímica del CaP (Xu et al., 2016). A su vez, la expresión citoplasmática de TLN1 fue mayor en el tejido metastásico en comparación con los tumores de próstata primarios (Sakamoto et al., 2010). Sin embargo, el grupo de *Betts et al.* (Betts et al., 1998) reveló que la expresión del mRNA de TLN1 disminuyó en las células estromales prostáticas primarias en respuesta a la exposición de medio condicionado de células epiteliales tratadas con andrógenos. En este sentido, los autores sugieren que esta reducción en la expresión de TLN1 podría ser parte de un mecanismo que conduce a la pérdida de adhesión celular en las células epiteliales mediada por la acción de los andrógenos. Sus estudios demostraron que TLN1 se expresa en el estroma del tejido prostático y en niveles más altos en las células epiteliales. Por lo tanto, sugieren que la expresión de TLN1 en células epiteliales también puede desempeñar un papel importante en la regulación de la adhesión celular en próstatas tanto benignas como malignas (Betts et al., 1998). Por lo tanto, la expresión de TLN1 en tumores de pacientes puede verse afectada por los niveles de andrógenos, siendo más altos en CaP insensibles a andrógenos.

Finalmente, ITGA6 mostró una marcada disminución en su expresión en las células malignas WPE-NB26 cultivadas en Matrigel en comparación con las células no malignas inmortalizadas RWPE-1 (Bello-DeOcampo et al., 2001). Además, las células PC3 exhibieron una regulación negativa de ITGA6 en comparación con la línea celular RWPE (Windus et al., 2012). Además, un grado de Gleason bajo se correlacionó con una mayor expresión de ITGA6, mientras que una puntuación de Gleason alta se correlacionó con una expresión de ITGA6 baja y negativa (Schmelz et al., 2002).

Si bien en este trabajo de tesis se encontró que 6 (RDX, ITGB1, ITPR1, ITGB8, TLN1 e ITGA6) de los 12 genes blanco del miR-19b-3p estaban regulados negativamente en tumores de pacientes con CaP en comparación con TNA, en la literatura hay evidencia que demuestra que la expresión de algunos de ellos (ITGB1, TLN1) se correlacionó positivamente con la metástasis tumoral. Esto contradice los resultados, entre ellos los obtenidos en este trabajo, que afirman que la expresión del hsa-miR-19b-3p se encontraba aumentada en el CaP metastásico. Este conflicto puede deberse a varias razones; incluyendo que el análisis de genes blanco llevado a cabo en el primer capítulo de este trabajo de tesis, se ha realizado *in silico*; que los genes blanco de los miRNAs pueden diferir según el tejido, y además no todos los genes blanco han sido estudiados y validados experimentalmente en la mayoría de los tejidos. Así, para realizar un análisis más exhaustivo, se han seleccionado aquellos genes blanco que han sido validados experimentalmente en al menos un tejido. Ninguno de los genes blanco del hsa-miR-19b-3p ha sido validado experimentalmente en tejido prostático o líneas celulares de CaP. Por lo tanto, aquellos genes que se correlacionaron negativamente con el hsa-miR-19b-3p y cuya expresión en tumores CaP es contradictoria con la literatura no son blancos directos del miRNA mencionado anteriormente en el tejido prostático y están siendo blanco de uno o más miRNAs. Se necesitan más experimentos *in vitro*, como un ensayo de luciferasa en células CaP, para confirmar si estos genes son realmente blancos del hsa-miR-19-3p en tejido prostático.

Por otro lado, no se encontraron cambios significativos en la expresión de los genes blanco del hsa-miR-101-3p en muestras tumorales en comparación con TNA. Por tanto, se ha propuesto que el hsa-miR-101-3p podría tener un papel relevante en los nichos metastásicos pero no en el tumor primario.

Los resultados obtenidos en el primer capítulo de este trabajo de tesis, proponen al hsa-miR-19b-3p y hsa-miR-101-3p como oncomiRs a nivel del tumor y del sitio metastásico, respectivamente. Además, estos miRNAs se vieron aumentados a causa de la DG en un modelo murino de CaP insensible a andrógenos.

El grupo de *Labbé et al.* (Labbé et al., 2019) demostró que la DG exacerba el programa transcripcional de MYC por sobreexpresión de MYC en próstatas murinas. Por lo tanto, se realizó una matriz de correlación, utilizando paquetes R, entre los datos de expresión de los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p y los genes pertenecientes al programa transcripcional de MYC en tumores de pacientes con CaP (disponibles en el set de datos TCGA PRAD presente en UCSC Xena). Se vio que no existe una correlación directa entre los miRNAs candidatos y el programa transcripcional de MYC (datos no mostrados), lo que sugiere que la DG exacerba el programa transcripcional de MYC por la sobreexpresión de MYC en próstatas normales e induce la expresión de los hsa-miR-19b-3p y miR-101-3p en CaP, por mecanismos independientes. Por lo tanto, los pacientes en condiciones de DG podrían tener un CaP más agresivo debido a una mayor expresión del hsa-miR-19b-3p, hsa-miR-101-3p y el programa transcripcional MYC.

En conjunto, en este trabajo se han identificado 2 miRNAs (miR-19b-3p y miR-101-3p) con un alto potencial de diagnóstico y pronóstico para distinguir entre el CaP y TNA, y entre pacientes metastásicos y no metastásicos. Sin embargo, estos miRNAs resultarían ser buenos biomarcadores a nivel tumoral y no así a nivel sérico. Un estudio funcional más detallado y la validación de los mecanismos moleculares asociados a estos miRNAs son indispensables, sin embargo, los hallazgos presentados en este trabajo de tesis proporcionan información significativa sobre el diagnóstico y pronóstico de pacientes con CaP.

La dieta grasa disminuye la expresión de tsmiRs en tumores de próstata sensible a andrógenos

En el segundo capítulo del presente trabajo, se desarrolló un modelo murino utilizando ratones C57BL/6J que fueron inoculados con las células murinas de CaP sensibles a

andrógenos TRAMP-C1. Aquí se demostró que la DG reduce notablemente la expresión de potenciales tsmiRs en tumores de CaP. Se encontró que los genes blanco modulados por estos tsmiR regulaban procesos principalmente asociados a vías relacionadas con el cáncer. Entre ellos, los mmu-miR-133a-3p y miR-1-3p estaban drásticamente disminuidos en tumores de próstata como consecuencia de la DG. Además, los miRNAs ortólogos humanos se encontraron regulados negativamente en tumores de próstata humanos en comparación con TNA y próstatas normales. Además, se vio que los hsa-miR-133a-3p y miR-1a-3p estaban reducidos significativamente en los tumores de próstata de pacientes metastásicos en comparación con los tumores de pacientes no metastásicos.

La familia hsa-miR-1, -133 y -206 está ubicada en tres loci diferentes en los cromosomas 20q13.33 (miR-1-1/miR-133a-2), 18q11.2 (miR-1-2/miR-133a-1) y 6p12.2 (miR-206/miR-133b) (Xie et al., 2016). Los isómeros maduros del miR-133 (A y B) son muy similares y difieren solo en la base terminal-3', con miR-133a-1/2 terminando G-3' y miR-133b con A-3', respectivamente (Mitchelson, 2015). Debido a sus ubicaciones cercanas en distintos loci, los miR-1/133a y miR-206/133b se constituyen como cluster de miRNAs (Mitchelson, 2015). Estudios recientes mostraron la desregulación de la familia miR-1, -133 y -206 en el cáncer, en el que normalmente funcionan como supresores de tumores (Nohata et al., 2012; Sempere et al., 2004).

El hsa-miR-133a-3p es probablemente el miRNA más estudiado de esta familia y se ha informado ampliamente que está regulado negativamente en varios tipos de cáncer y que predice un mal pronóstico (Kano et al., 2010; Kawakami et al., 2012; Ma et al., 2012; Szafranska et al., 2007; Hui Wang et al., 2013; Wong et al., 2008). En el CaP, una baja expresión del hsa-miR-133a-3p se ha visto asociada con la recurrencia y metástasis a distancia del CaP (Coarfa Cristian, Fiskus Warren, Eedunuri Vijay Kumar, Rajapakshe Kimal, Foley Christopher, Chew Sue Anne, Shah Shrijal S., Geng Chuandong, Shou John, Mohamed Junaith S., 2016; Kojima et al., 2012; Pashaei et al., 2017; Tao et al., 2012). Del mismo modo, un estudio reciente del grupo de *Tang et al.* (Tang et al., 2018) demostró que la expresión del hsa-miR-133a-3p se encuentra reducida en los tejidos de CaP en comparación con los tejidos TNA y con lesiones prostáticas benignas, y particularmente en el tejido metastásico óseo del CaP. Además, la baja expresión del

miR-133a-3p se correlaciona significativamente con características clínico-patológicas avanzadas y una supervivencia libre de metástasis óseas más corta en pacientes con CaP (Tang et al., 2018).

En lo que respecta al hsa-miR-1, diferentes estudios demostraron que es el miRNA con menor expresión en tumores de CaP en comparación con tejidos de próstata no cancerosos y que se encuentra disminuido significativamente en muestras de CaP recurrente en comparación con muestras de CaP no recurrente (Karatas et al., 2014; S. M. Li et al., 2018; Martens-Uzunova et al., 2012). La expresión del miR-1 disminuye a medida que progresa el cáncer y solo puede predecir la recurrencia de esta enfermedad (Karatas et al., 2014). Además, el miR-1 tiene el poder suficiente para distinguir las muestras de CaP recurrentes de las no recurrentes (Hudson et al., 2012; Karatas et al., 2014; S. M. Li et al., 2018). Además, se ha informado que tiene como blanco la función oncogénica de la purina nucleósido fosforilasa (PNP) en CaP (Hudson et al., 2012). Por lo tanto, el hsa-miR-1 ejercería funciones de supresor tumoral y regularía de manera coordinada la expresión de oncogenes que controlan el inicio y la progresión del CaP.

En base a los hallazgos presentados el segundo capítulo de este trabajo de tesis y los pertenecientes otros grupos, se propone a los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p como miRNAs prometedores para ser estudiados como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del CaP.

Por otro lado, en este trabajo, también se han estudiado los genes blanco relevantes para los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p. En primer lugar, se ha realizado un análisis de correlación utilizando los datos de pacientes con CaP disponibles en repositorios públicos. Este análisis permitió encontrar tres genes blanco, relevantes para los dos miRNAs, con una correlación negativa significativa. Dos de los tres genes blanco, GOLPH y JUP, se encontraron aumentados significativamente en los tumores primarios de próstata en comparación con el TNA. Además, el análisis de curvas ROC mostró que la combinación de hsa-miR-133a-3p, miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP resultó ser un prometedor panel biomarcador para distinguir entre CaP y TNA.

Los miRNAs pueden ser silenciados epigenéticamente debido a la metilación a nivel del DNA de sus genes codificantes (Peng & Croce, 2016). Se descubrió que la hipermetilación del DNA regula negativamente a varios tsmiRs, mientras que se informó que la hipometilación del DNA regula positivamente a los oncomiRs (S. Wang et al., 2017). En este trabajo de tesis, se analizó el estado de metilación de los promotores miR-1-2/miR-133a-1 y miR-1-1/miR-133a-2 en muestras normales y de CaP, y se estudió la correlación entre la metilación del promotor y la expresión del miRNA maduro. Los resultados de este análisis bioinformático sugirieron que la hipermetilación del promotor del grupo hsa-miR-1-2/miR-133a-1 podría disminuir la expresión del hsa-miR-1-3p/miR-133a-3p en tumores de próstata.

Por lo tanto, la represión epigenética del grupo hsa-miR-1-2/miR-133a-1 puede desempeñar un papel fundamental en la agresividad del CaP al activar GOLPH3 y JUP.

La fosfoproteína de Golgi 3 (GOLPH3) es un oncogen implicado en el desarrollo de carcinomas en varios órganos y es un gen candidato a nivel de la metástasis en el cáncer humano (W. Li, Qi, et al., 2015; Zhang et al., 2015). En diferentes estudios se ha investigado el papel de GOLPH3 en el CaP. Trabajos independientes demostraron que la sobreexpresión de GOLPH3 en los tejidos de CaP está relacionada con un alto grado de Gleason, un estadio tumoral patológico avanzado, la presencia de metástasis, una peor sobrevida general y el estado de los ganglios linfáticos (Abd El-Maqsoud et al., 2015; Hua et al., 2012; Zhang et al., 2015). La sobreexpresión de GOLPH3 está asociada con la transición de hormono sensible a hormono refractario del CaP (Hua et al., 2012). Li y Guo informaron que el silenciamiento de GOLPH3 inhibía la proliferación celular y detenía el ciclo celular en la fase G2/M (W. Li, Guo, et al., 2015). Además, el silenciamiento de GOLPH3 activó la expresión de p21 pero suprimió la expresión de CDK1/2 y la proteína ciclina B1 junto con la fosforilación de AKT y mTOR (W. Li, Guo, et al., 2015). Además, reveló que el silenciamiento de GOLPH3 redujo la migración celular y la capacidad de invasión (W. Li, Qi, et al., 2015). Finalmente, estudios *in vitro* demostraron que GOLPH3 regula el tamaño celular, mejora la señalización de mTOR

inducida por el factor de crecimiento en células cancerosas humanas y modula la respuesta a rapamicina (Scott et al., 2009).

El papel de la plakoglobina de unión (JUP) durante la progresión del cáncer sigue siendo controversial. *Spethmann et al.* demostró que las funciones biológicas opuestas de JUP se reflejaban en efectos pronósticos antagónicos en diferentes subtipos moleculares. La alta expresión de JUP se asoció con un estadio tumoral adverso, metástasis en los ganglios linfáticos de alto grado de Gleason, en un subconjunto de pacientes con CaP sin fusión TMPRSS2:ERG. Además, la sobreexpresión de JUP se relacionó con una fuerte expresión del receptor de andrógenos, una alta proliferación celular y la eliminación de PTEN y FOXP1 (Spethmann et al., 2021). Por otro lado, se encontró que SOX4 interactúa con JUP de manera dependiente de Wnt en células LNCaP y este complejo puede inhibir la señalización de Wnt (Lai et al., 2011).

Por lo tanto, de acuerdo a los resultados presentados en esta tesis y trabajos anteriores, GOLPH3 y JUP tienen un papel fundamental en la patogenia y progresión del CaP.

En resumen, en este segundo capítulo se ha demostrado que la DG reduce drásticamente la expresión de tsmiR en tumores de próstata sensibles a andrógenos. Además, que la expresión de los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p se correlaciona negativamente con la expresión de GOLPH3 y JUP, dos oncogenes fundamentales para la progresión del CaP. A su vez, los hsa-miR-133a-3p y miR-1-3p están silenciados epigenéticamente por una hipermetilación del promotor, funcionando como tsmiR en el CaP.

Sin embargo, aunque aún es necesario un estudio de la expresión de los dos miRNAs y sus genes blanco en poblaciones más grandes, los resultados presentados en esta tesis indican que tanto el hsa-miR-133a-3p como el miR-1a-3p, GOLPH3 y JUP son promotores del CaP y que su combinación puede ser un prometedor panel de biomarcadores para el diagnóstico del CaP.

Identificación de miRNAs circulantes para la detección del CaP

En el tercer capítulo de este trabajo de tesis, se obtuvo una firma de miRNAs diferencialmente expresados en plasma de pacientes con CaP y VS que son útiles para la detección de esta enfermedad. Utilizando 65 y 68 muestras de plasma de pacientes con CaP y VS respectivamente, enrolados en varias instituciones de salud de Argentina y mediante microarreglos de expresión y secuenciación de miRNAs, sumado a una validación por la técnica de stem-loop RT-qPCR y una validación *in-silico* con 282 pacientes con CaP y 282 VS, se generó un panel de 5 miRNAs que se encontraban aumentados en la sangre de pacientes con CaP con respecto a VS (hsa-miR-101-3p, miR-21-5p, miR-214-3p, miR-324-3p, miR-181d-5p). A su vez, los 5 miRNAs fueron analizados en el tejido tumoral y TNA de pacientes obtenidos de repositorios públicos, y se encontró que la expresión de algunos de estos miRNAs (hsa-miR-101-3p, 21-5p y 324-3p), cuya expresión estaba aumentada en el plasma de pacientes, también se encontraba elevada a nivel tumoral, aunque no correlacionó en todos los casos. Existe en la literatura extensa evidencia de posibles biomarcadores, principalmente genes, para el diagnóstico y/o pronóstico del CaP. Sin embargo, gracias al avance de la ciencia y tecnología, se demostró que resulta ser más útil a nivel de la clínica el uso de un panel de biomarcadores. En particular, la mayoría de los paneles biomarcadores disponibles y utilizados en pacientes para el diagnóstico o pronóstico de distintas enfermedades, están compuestos por genes/proteínas, siendo muy poco conocidos y/o utilizados aquellos compuestos por miRNAs. En particular, el uso de los miRNAs circulantes como biomarcadores de enfermedades según la literatura, resulta controversial ya que se muestran diversos aspectos favorables y otros no tanto en cuanto a su implementación en la clínica. Por esta razón, si bien en este tercer capítulo se estableció un conjunto de miRNAs circulantes candidatos a biomarcadores para la detección del CaP, hacen falta una serie de análisis posteriores para establecer cuál es la mejor combinación de estos miRNAs que permite detectar el CaP con una alta sensibilidad. Para ello, primero es necesario aumentar el número de pacientes analizados, teniendo un mínimo de 100 pacientes para luego aplicando técnicas de machine learning seleccionar la mejor combinación de miRNAs. Esta herramienta en el futuro podría ser utilizada para generar

un kit para la detección temprana del CaP que se pueda implementar como método de tamizaje de rutina sumado a los ya existentes.

Si bien el CaP es el tipo de cáncer más común y prevalente en hombres, en los últimos años ha surgido una controversia alrededor del porcentaje de pacientes que cursan la enfermedad de manera indolente y los efectos adversos del tratamiento, lo que llevó a replantearse la utilidad de la detección temprana para esta enfermedad (Jin et al., 2020; Litwin & Tan, 2017). De acuerdo a los datos poblacionales, uno de cada seis hombres estadounidenses desarrollará CaP en su vida, de los cuales solo uno de cada seis morirá a causa de él, mientras que la mayoría de los pacientes cursará una enfermedad que no será clínicamente evidente (Nevo et al., 2020). Estos datos se encuentran respaldados por autopsias, que identificaron CaP en un tercio de los pacientes de 50 a 60 años y en el 60% después de los 80 años (Nevo et al., 2020). Sin embargo, el CaP sigue siendo la tercera causa de muerte por cáncer en hombres. Esto se debe a que el CaP se caracteriza por un alto grado de heterogeneidad, ya que puede manifestarse como formas latentes o formas muy agresivas que provocan morbilidad y muerte por metástasis (Jin et al., 2020; Litwin & Tan, 2017). La sobrevida después del diagnóstico del CaP está relacionada en gran medida con el estadio y el grado del tumor. Aquellos pacientes con CaP localizado de bajo grado pueden vivir varias décadas sin tratamiento, mientras que los pacientes con enfermedad metastásica tienen una mediana de supervivencia de 30 meses (Nevo et al., 2020).

En el CaP, el tamizaje se compone por un examen rectal y el antígeno prostático específico (PSA). Un examen rectal anormal o un PSA elevado resultan en una biopsia de próstata. Sin embargo, el uso del PSA no es perfecto, sólo alrededor del 30% de las biopsias detectarán CaP clínicamente significativo (grado de Gleason igual o mayor a 7) (Chistiakov et al., 2018; Jin et al., 2020; Litwin & Tan, 2017; Nevo et al., 2020; Schatten, 2018; Thompson, 1995). Esto se debe a que el PSA no es un marcador específico del CaP sino órgano-específico. Esta proteasa es producida por el epitelio prostático en niveles bajos en condiciones normales y suele aumentar con el avance del CaP. Sin embargo, varios factores como un gran tamaño de la próstata, la hiperplasia benigna (HPB), prostatitis, entre otros, pueden desencadenar altos valores de PSA, dando como resultado un falso positivo y como consecuencia un diagnóstico y tratamiento erróneo

(Jin et al., 2020). En hombres mayores de 60 años, la producción de PSA está aumentada, lo que reduce la sensibilidad de la prueba de detección de PSA como tamizaje para el CaP. Por el contrario, los niveles de PSA pueden disminuir en hombres tratados con agentes terapéuticos específicos con efectos anti-androgénicos, como los inhibidores de la 5- α reductasa. Además, la correlación del nivel de PSA con la gravedad del CaP es bastante débil, lo que pone en duda su uso para clasificar la enfermedad (Chistiakov et al., 2018). De acuerdo al controversial desempeño del PSA, el Grupo de Trabajo de Servicios Preventivos de los Estados Unidos emitió una recomendación en 2018 de que la detección del CaP no debe realizarse en base a los niveles de PSA en hombres de 70 años de edad o más. Una detección en exceso basada en los niveles de PSA, lleva a un tratamiento innecesario y estos resultados positivos no son mayores que los resultados adversos a causa de los tratamientos (Jin et al., 2020). Estudios recientes han sugerido que, si bien eliminar el uso del PSA como prueba de tamizaje detendría el exceso en el diagnóstico, la falta de tamizaje conduciría a un fracaso total para evitar muertes prevenibles y aumentaría la tasa de mortalidad relacionada con el CaP (Jin et al., 2020). Es por ello que resulta de suma importancia la detección temprana del CaP para lograr un manejo adecuado y eficiente del paciente, logrando una cura eficaz y reduciendo el sufrimiento y la muerte por CaP, mejorando la calidad de vida de los pacientes. Sin embargo, aún no se dispone de pruebas perfectas para la detección temprana del CaP.

En la literatura se han propuestos nuevos biomarcadores para el CaP que ayudarían a disminuir el número de biopsias innecesarias o la sobredetección de cánceres no significativos a nivel clínico. Los biomarcadores pre-diagnósticos más conocidos y propuestos para el CaP son: el índice de salud de la próstata (PHI) y el TMPRSS2-ERG. El PHI es un ensayo predictivo de la presencia de CaP que resulta del cálculo de la relación del (-2)proPSA, PSA libre y PSA total. El (-2) es un precursor inactivo del PSA que está asociado con el CaP y no así con la hiperplasia prostática benigna (Chistiakov et al., 2018; Jin et al., 2020; Nevo et al., 2020). La prueba PHI consiste en medir las tres formas de PSA (PSA total, PSA libre y (-2)proPSA) en el suero de los pacientes y se calcula como: $[-2] \text{ pro-antígeno prostático específico} / \text{antígeno prostático específico libre} \times \text{antígeno prostático específico} (1/2)$ (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020). La prueba PHI fue desarrollada por la empresa estadounidense Beckman Coulter Inc. (Brea, CA, USA) y en

junio del 2012 recibió la aprobación de la FDA para su uso en la detección del CaP en hombres de 50 años (Jin et al., 2020). En el caso de un CaP de alto grado, la prueba PHI mostro tener una especificidad de 0,34 con una sensibilidad de 0,93 y un AUC de 0,82. Un reciente meta-análisis informó una especificidad de 0,17 y una sensibilidad de 0,90 para detectar un CaP con grado de Gleason de 3+4 o mayor. Estos resultados mostraron un alto poder discriminatorio del PHI para identificar CaP agresivo (W. Wang et al., 2014). En pacientes luego de sufrir una prostatectomía radical, se encontró que la prueba PHI estaba asociada con características adversas del CaP (Fossati et al., 2015). Por otro lado, un estudio multicéntrico de 1026 pacientes con antecedentes familiares de CaP, el valor predictivo negativo (VPN) de PHI fue del 74,1 % (Lazzeri et al., 2013). A su vez, esta prueba se ha utilizado con otras variables en un nomograma, mejorando la detección del CaP de riesgo bajo a intermedio en comparación con la prueba PHI solo (Nevo et al., 2020).

El biomarcador TMPRSS2:ERG se basa en la expresión de un gen híbrido específico para el CaP. Resulta de la fusión del gen sensible a andrógenos TMPRSS2 con el factor de transcripción de diferenciación celular al linaje endotelial y hematopoyético. Dicha alteración genética es la más común en biopsias de CaP primario localizado, encontrándose en aproximadamente el 50% de los CaP en hombres caucásicos y estando ausente en tejido benigno (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020). En las metástasis de CaP virgen de tratamiento hormonal, la prevalencia de esta alteración genética es menor (cerca al 30%), lo que podría indicar una implicancia en la transición hacia un estadio invasivo (Chistiakov et al., 2018). El gen TMPRSS2 codifica para la serin-proteasa 2 transmembrana pro-oncogénica, que está regulada por andrógenos en las células prostáticas. La fusión con ERG, conduce a la independencia de andrógenos a través de la interrupción de la red de señalización mediada por el receptor de andrógenos (AR) (Chistiakov et al., 2018). El oncogén TMPRSS2:ERG también puede mediar la progresión del CaP a la fase metastásica a través de la regulación positiva de la plexina B1, un mediador de la migración celular (Chistiakov et al., 2018). La detección de los transcritos de TMPRSS2:ERG se realiza a partir de los primeros 20-30 ml de orina tras un masaje prostático (Nevo et al., 2020). Un reciente meta-análisis demostró que la fusión TMPRSS2:ERG tenía una sensibilidad de 0,474, especificidad de 0,926, valor

predictivo positivo (VPP) de 8,49 y un VPN de 0,49 (Yao et al., 2014). Para aumentar la sensibilidad y, por lo tanto, la precisión diagnóstica, la detección de TMPRSS2:ERG se puede combinar con otros marcadores, como por ejemplo el PSA (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020).

Las biopsias prostáticas de plantilla ha sido la biopsia estándar durante muchos años para el CaP, y aún hoy en día se utiliza como primera biopsia en varios lados. Esta biopsia se basa en el uso de una rejilla (plantilla) para insertar varias agujas finas a través de la piel en el área de la glándula prostática con el fin de obtener varias muestras de tejido para su posterior análisis. Esta técnica a ciegas suele pasar por alto varios CaP, especialmente aquellos con próstatas grandes y lesiones anteriores. La tasa de falsos negativos resultante de una primera biopsia es del 30% aproximadamente y no mejora al aumentar la cantidad de núcleos tomados de 12 a 24 (Nevo et al., 2020). La tasa de detección disminuye con cada biopsia posterior. Por estas razones se ha propuesto desarrollar biomarcadores para mejorar la selección de pacientes, con el fin de disminuir el número de biopsias repetidas innecesarias. El biomarcador propuesto para resolver este problema y más conocido es PCA3. El PCA3 es un RNA no codificante específico de la próstata, que se expresa en gran medida en las células de CaP y se encuentra ausente en patologías prostáticas no cancerosas, como la HPB, la proliferación acinar pequeña atípica, la prostatitis y la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (Chistiakov et al., 2018). Se demostró que PCA3 regula la supervivencia celular mediante el control de la señalización dependiente del AR y la expresión de cofactores AR y genes involucrados en la transición pro-carcinogénica epitelio-mesenquimal (Chistiakov et al., 2018). La prueba de PCA3 se basa en la recolección de orina luego del examen rectal digital (DRE) con masaje prostático, seguido de la detección cuantitativa por RT-PCR del RNA de PCA3 y PSA (Nevo et al., 2020). Los resultados se informan como la relación entre los transcritos de PCA3 y los transcritos del PSA y se indica para hombres con PSA sérico elevado y biopsia de próstata negativa (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020). Dicha puntuación puede ayudar a los médicos a decidir si repetir o no la biopsia en hombres mayores a 50 años que ya se han sometido a una o más biopsias (Chistiakov et al., 2018). Un estudio demostró que el AUC y la especificidad fueron de 0,66 y 66%, y 0,57 y 47% para el PCA3 y PSA, respectivamente (Van Gils et al., 2007). El PCA3 fue desarrollado por

Progenza (Marborough, MA, USA) y fue aprobado por la FDA en el 2012 (Chistiakov et al., 2018). Más adelante surgió el PCA3™ de tercera generación (desarrollado por Progenza Hologic Inc, Bedford, MA, USA), que ofrece una mejora en la sensibilidad mediante el uso de amplificaciones mediadas por transcripción (Nevo et al., 2020). La precisión de PCA3 fue significativamente mayor que la del PSA después de una biopsia negativa previa, con una sensibilidad del 47-58% y una especificidad del 71-72% y el VPN fue del 88% (Cucchiara et al., 2018; Vlaeminck-Guillem et al., 2010). Una revisión sistemática financiada por los NIH sobre la rentabilidad de la prueba planteó inquietudes con respecto a la precisión de las mediciones de la prueba de PCA3 y concluyó que no sería rentable (Nevo et al., 2020).

Como se mencionó anteriormente, el CaP es muy heterogéneo, lo que hace que pueda presentarse tanto en forma de cáncer de muy bajo riesgo y clínicamente no significativo que no siempre necesita tratamiento como también un cáncer de próstata agresivo y metastásico. En el caso de un CaP de muy bajo riesgo se ha demostrado que la vigilancia activa resulta segura con un bajo riesgo de muerte posterior por CaP (Klotz et al., 2010). Por esta razón, se han desarrollado varias pruebas basadas en tejidos para guiar la decisión del médico sobre el tratamiento activo o la vigilancia activa de los pacientes. Las pruebas más conocidas son Oncotype Dx™ genomic prostate score (GPS) y Prolaris™. La prueba de Oncotype Dx fue desarrollada por Genomic Health Inc (Redwood City, CA, USA) y se basa en la medición de la expresión de 12 genes implicados en la agresividad del CaP y 5 genes de referencia, mediante RT-qPCR. Los genes seleccionados y relacionados con el CaP están involucrados en la proliferación (TPX2), la ruta de los andrógenos (RAM13C, KLK2, AZGP1, SRD5A2), la respuesta del estroma (COL1A1, SFRP4, BGN) y la organización celular (GSTM2, GSN, FLNC, TPM2) (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020). Esta prueba se diseñó para la evaluación de muestras obtenidas de biopsias prostáticas con agujas, y por lo tanto es capaz de detectar transcritos de RNA con alta precisión analítica en cantidades muy pequeñas de tejido (alrededor de 0,005 ng) (Chistiakov et al., 2018). Luego, los resultados se informan como una puntuación genómica de la próstata (genomic prostate score: GPS) que varía entre 0 y 100, siendo 0 un CaP de más bajo riesgo y 100 el de riesgo más alto. La puntuación resultante es comunicada por la empresa con la correspondiente categoría de riesgo de

la Red Nacional Integral del Cáncer de Estados Unidos (NCCN) y ayuda a tomar la decisión de mantener a un paciente en vigilancia activa o pasar a un tratamiento inmediato (si el GPS está por encima de 20) (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020). Cada aumento de GPS en 20 puntos está asociado con la elevación del riesgo de CaP de alto grado en 2,3 veces. La prueba de GPS es útil para estratificar el riesgo de CaP en riesgo muy bajo, bajo e intermedio. Además, dicha prueba tuvo un alto valor predictivo para evaluar la agresividad del CaP y los eventos adversos, como la recurrencia después de la prostatectomía radical, la patología adversa en la cirugía y las metástasis (Chistiakov et al., 2018). Finalmente, se ha demostrado que la prueba de GPS permitió ahorrar dinero en pacientes que han utilizado GPS en comparación con pacientes que recibió un tratamiento estándar, como consecuencia de un aumento en la vigilancia activa y una disminución en el tratamiento activo (Albala et al., 2016).

La otra prueba conocida que ayuda a tomar la decisión de tratamiento o vigilancia activa de los pacientes es Prolaris™. Prolaris™ es otra prueba basada en genes para evaluar la agresividad del tumor a partir de muestras de tejido obtenidas por biopsias. Dicha prueba fue desarrollada por Myriad Genomics Inc. (Salt Lake City, UT, EUA) y se puede realizar a partir de muestras de tejido incluido en parafina fijado con formalina obtenido por biopsia o una muestra obtenida en una prostatectomía radical. Prolaris™ mide la expresión de 31 genes implicados en la progresión del ciclo celular (CCP) que se sabe que están regulados positivamente en el CaP agresivo y luego se normaliza a los niveles de expresión de 15 genes de referencia. Se informa como una puntuación de la CCP (Chistiakov et al., 2018; Nevo et al., 2020). La puntuación de CCP se vio asociada significativamente con la recurrencia bioquímica (BCR) y la muerte por CaP (Nevo et al., 2020). El aumento en la puntuación de CCP en una unidad se asoció significativamente con un aumento del cociente de riesgo (HR) de muerte en 2,57 (Cuzick et al., 2012). Esta correlación fue validada por varios estudios, lo que sugiere que la puntuación CCP podría servir como biomarcador independiente para el pronóstico de eventos adversos, como la muerte por CaP (Cuzick et al., 2012, 2015). La puntuación CCP demostró una alta precisión pronóstica en la predicción de los resultados de la prostatectomía, como la recurrencia del CaP después de la cirugía, después de controlar todos los datos clínicos y patológicos disponibles (Cooperberg et al., 2013). La implementación de la puntuación

CCP tuvo un impacto significativo en la elección de la terapia intervencionista o no intervencionista en la práctica clínica (Chistiakov et al., 2018). Sin embargo, una revisión sistemática de la utilidad clínica y la evidencia económica de la prueba encontró una calidad de evidencia muy baja. Los resultados del CCP cambiaron el plan de tratamiento en el 50-65% de los casos, pero no hubo evidencia disponible sobre los resultados clínicos. Se estimó que el costo de la prueba superará el ahorro de costos, lo que resultará en un gran incremento en el costo de la atención (Bauman et al., 2017).

Por el momento, tal como se comentó anteriormente, hay muchos biomarcadores potenciales para el diagnóstico y/o pronóstico del CaP. Sin embargo, sólo unos pocos son lo suficientemente sólidos para mostrar un verdadero valor analítico y clínico y poder cumplir con los criterios de selección de la FDA para su uso clínico. Incluso, la aprobación de la FDA no resulta una garantía de la aplicación clínica exitosa de un biomarcador (Chistiakov et al., 2018). De esta forma, una validación positiva de un potencial biomarcador es un requisito previo esencial para su introducción en la práctica clínica, aunque existen muchos obstáculos que pueden reducir la importancia de un biomarcador en su uso clínico luego de la validación, y es por ello que hasta el día de hoy no se ha encontrado e implementado en la clínica un buen biomarcador para el diagnóstico y/o pronóstico del CaP.

En general, el diagnóstico del cáncer se basa tradicionalmente en el análisis histopatológico de las células cancerosas a partir de biopsias de tejido. Sin embargo, a causa de la naturaleza multifocal de la mayoría de los CaP, la heterogeneidad clonal dentro de cada paciente y la imposibilidad de obtener muestras de todo el tumor, la información de una biopsia de un solo tejido suele ser insuficiente y no refleja la dinámica del tumor en toda la próstata (Jingpu Wang et al., 2020). Más aún, el 60-90% de los CaP son multifocales con agresividad variable. Por lo tanto, debido a la heterogeneidad del CaP la precisión de las pruebas genéticas basadas en un único núcleo para predecir los resultados y la toma de decisiones de tratamiento se encuentran limitadas. Se necesitarían muestreos secuenciales de lesiones primarias y metastásicas, que no siempre son factibles debido a la invasividad de la biopsia de una metástasis, las dificultades logísticas para acceder a las muestras y la incapacidad de realizar ciertas pruebas genéticas en tejidos de biopsias incluidos en parafina y fijados

en formalina (Jingpu Wang et al., 2020). Debido a estos obstáculos, es que la búsqueda de nuevos potenciales biomarcadores está principalmente basada en biopsias líquidas.

Las biopsias líquidas resultan ser no invasivas y brindan la oportunidad de obtener información sobre el panorama genético y realizar un seguimiento de la evolución genómica a medida que los tumores progresan para adaptar el manejo terapéutico a los pacientes (Jingpu Wang et al., 2020). Dicha técnica se basa en el estudio de células tumorales y ácidos nucleicos provenientes de los tumores en fluidos corporales de pacientes con cáncer. Parte del principio de que en los pacientes con cáncer, las células tumorales y los fragmentos genéticos de las células cancerosas se eliminan en los fluidos corporales que pueden ser detectados y utilizarse como biomarcadores para aplicaciones clínicas (Riaz et al., 2018). Las biopsias líquidas han sido evaluadas como una técnica potencial para el manejo efectivo del cáncer a varios niveles tales como: detección de enfermedad mínima residual después de la cirugía o terapia adyuvante; el seguimiento de la respuesta a los tratamientos y evaluación del mecanismo de resistencia; la selección de terapias dirigidas en función del perfil de mutación del tumor; detección de lesiones precancerosas e identificación del origen del tumor en las primeras etapas de la enfermedad (Watanabe et al., 2021). Evalúan en fluidos corporales, tales como sangre, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo o heces, la presencia de células tumorales circulantes (CTC) o fragmentos genéticos de las células tumorales incluyendo DNA tumoral circulante libre de células, miRNAs libres de células, proteínas y microvesículas extracelulares (entre ellos exosomas conteniendo miRNAs) (Poulet et al., 2019; Riaz et al., 2018; Vaidyanathan et al., 2019; Jingpu Wang et al., 2020; Watanabe et al., 2021).

En particular, ciertos miRNAs presentes en exosomas, han sido propuestos como posibles biomarcadores en biopsias líquidas para el diagnóstico del CaP (Endzeliņš et al., 2016; Huang et al., 2013). La principal ventaja que presentan los miRNAs es que además de circular en fluidos corporales, son extremadamente estables en los mismos. En el laboratorio de la Dra. De Siervi se ha encontrado que los miRNAs se mantienen estables en sangre entera a temperatura ambiente al menos por 48h. En la literatura, aún no se ha llegado a un consenso sobre la utilización de plasma o suero para obtener miRNAs circulantes en sangre. Si bien el uso de suero sería una buena opción debido a la sencillez

con la que se lo obtiene, durante el tiempo que lleva el proceso de coagulación se pueden liberar miRNAs provenientes de células presentes en la sangre o incluso los miRNAs podrían quedar dentro del coágulo (Felekkis and Papaneophytou 2020). A la hora de utilizar plasma, se minimizan estos efectos, pero resulta de suma importancia elegir un anticoagulante adecuado, ya que compuestos como la heparina o el citrato inhiben la RT-qPCR (Felekkis and Papaneophytou 2020). En nuestro laboratorio se comparó experimentalmente el uso del suero y plasma, obteniendo mejores resultados con muestras de este último. Por esta razón, las muestras utilizadas para la validación experimental por RT-qPCR fueron plasma, colectadas siempre en EDTA, que no interfiere en las etapas posteriores.

Los miRNAs circulantes se pueden encontrar tanto libres, como asociados a proteínas o dentro de vesículas como exosomas, tal como se mencionó anteriormente (Felekkis & Papaneophytou, 2020). En la literatura se ha propuesto que el modo en que se secretan los miRNAs depende tanto de la célula de la que se esté liberando como del destino y de la función que va a cumplir el mismo (Felekkis & Papaneophytou, 2020). Por otro lado, otra ventaja del uso de miRNAs circulantes como biomarcadores de diagnóstico es que son enfermedad-específicos (Felekkis & Papaneophytou, 2020). Todos los individuos presentan un conjunto de miRNAs en circulación; sin embargo, en presencia de enfermedades oncológicas, metabólicas o incluso otro tipo de enfermedades, como cardiológicas o neuropatologías, este conjunto se altera, pudiendo aprovechar esta característica para el diagnóstico y/o pronóstico de enfermedades. Al hacer un análisis en particular de los 5 miRNAs identificados, muy pocos de ellos se encuentran reportados como biomarcadores para el CaP presentes en plasma o suero de pacientes en comparación con VS, la mayoría de ellos sólo han sido reportados en su rol como miRNAs en tejidos en CaP y/u otros cánceres.

En la literatura hay muy poca información acerca de la función del hsa-miR-101-3p en el CaP. No solo eso, sino que la mayoría de los datos resultan ser contradictorios. Sin embargo, lo poco que se conoce sobre el mismo, ha sido descrito en el primer capítulo de la sección de Discusión de este trabajo de tesis. A modo de resumen, el miR-101-3p se ha encontrado aumentado en células de CaP sensibles a andrógenos LNCaP y disminuido en células insensibles a andrógenos PC3, en comparación con la línea celular

epitelial de próstata no tumorigénica PWR-1E, como así también se lo ha visto disminuido en tumores y el torrente sanguíneo de pacientes con CaP metastásico en comparación con pacientes con CaP no metastásicos (Antognelli et al., 2018; P. Cao et al., 2010; Y. Lin et al., 2018). Estos resultados sumados a los hallados en esta tesis, sugieren que el miR-101-3p varía su expresión de acuerdo al tipo de tejido/muestra donde se lo mida, como así también el estadio de la enfermedad. A sí mismo, a partir de los resultados presentados en el primer capítulo de la sección Resultados, se sugiere que el miR-101-3p podría cumplir una función a nivel del nicho metastásico y no tanto a nivel tumoral.

El hsa-miR-21-5p ha sido propuesto como oncomiR ya que se encuentra aumentado en casi todos los tumores derivados de células epiteliales, incluyendo los de mama, páncreas, pulmón, estómago, esófago, colon y próstata (O'Connell et al., 2010). Además, este miRNA ha sido identificado en un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio, para generar un ensayo de detección temprana del cáncer de mama (Tesis Doctoral de Paula Lucía Farré, 2022). Los genes blanco reportados del miR-21-5p resultaron ser, en su mayoría, genes supresores tumorales, entre ellos PTEN, Fas ligando (FasL), TAP63 y BAX que llevan a una inhibición de la apoptosis celular (Jia et al., 2012; Papagiannakopoulos et al., 2008). A su vez, se ha demostrado que el miR-21-5p tiene como blanco directo a MARCKS, lo que hace que inhiba la apoptosis y la invasión celular en células de CaP (T. Li et al., 2009). Un estudio reciente mostró que el miR-21-5p se encontraba aumentado en muestras de orina de pacientes con CaP en comparación con VS (Ghorbanmehr et al., 2019). Además, encontraron que no había diferencias significativas en la presencia de este miRNA en muestras de orina de pacientes con CaP y HPB, lo que indicaría que el miR-21-5p está involucrado en cáncer y no en procesos inflamatorios que son los responsables del fenotipo de la hiperplasia prostática benigna (Ghorbanmehr et al., 2019). Al igual que los resultados obtenidos en este tercer capítulo, un análisis de curvas ROC mostró que el miR-21-5p resultó ser un buen biomarcador para distinguir entre muestras normales y malignas de CaP con un AUC de 0,88 (valor $p < 0,0001$) y una especificidad de 0,88 (Ghorbanmehr et al., 2019). Sumado a esto, se vio que el miR-21-5p también era buen biomarcador para discriminar eficientemente a los pacientes con HPB de los pacientes con CaP, a diferencia del PSA que incapaz de

discriminar esas dos formas (Ghorbanmehr et al., 2019). *Danarto et al.* (Danarto et al., 2020) demostró que el miR-21-5p estaba sobreexpresado en muestras de orina de pacientes con CaP no metastásico y metastásico en comparación con pacientes con HPB. Finalmente, se ha identificado al miR-21-5p en exosomas provenientes de muestras de suero de pacientes con CaP (Malla et al., 2018).

Por otro lado, el hsa-miR-214-3p es un miRNA poco estudiado en el CaP. En particular, hay sólo un trabajo publicado donde se estudie la función del miR-214-3p en células o tumores de pacientes con CaP. *Cagle et al.* (Cagle et al., 2021) demostró que la eliminación del miR-214-3p promueve la proliferación, invasión, migración, transición epitelio-mesenquimal (EMT) de células de CaP y una mayor resistencia a anoikis (característica clave de las células de CaP que sufren metástasis). A su vez, la inactivación del miR-214-3p aumentó el crecimiento tumoral en xenotransplantes de CaP en ratones *nude* (Cagle et al., 2021). Finalmente, la eliminación del miR-214-3p produjo un aumento en la expresión de su proteína blanco, la tirosina quinasa 6 (PTK6), una proteína que promueve la señalización oncogénica y la tumorigénesis en el CaP (Cagle et al., 2021). Si bien el miR-214-3p ha sido estudiado prácticamente poco y nada en el CaP, la expresión anormal del miR-214-3p se la vio asociada con otros tipos de cáncer. Se vio que el miR-214-3p estaba aumentado en el plasma de pacientes con carcinoma nasofaríngeo en comparación con los VS. La expresión del miR-214-3p se encontraba significativamente alterada en pacientes con carcinoma nasofaríngeo con diferentes estadios, lo que indicaba la estrecha asociación entre el miR-214-3p y la progresión tumoral (Wang et al., 2020). A su vez, aquellos pacientes con carcinoma nasofaríngeo que han sufrido recurrencia o metástasis mostraron tener una expresión elevada del miR-214-3p en comparación con aquellos sin recurrencia o metástasis (Wang et al., 2020). Sumado a esto, se vio que la circulación en plasma del miR-214-3p disminuía de manera gradual en pacientes con carcinoma nasofaríngeo bajo tratamiento (Wang et al., 2020). De manera contraria al trabajo anterior, *Lu et al.* (Lu et al., 2020) demostró que el miR-214-3p se encontraba desregulado negativamente en tejidos de cáncer de pulmón de células escamosas. Pacientes con cáncer de pulmón de células escamosas con una alta expresión del miR-214-3p mostraron tener resultados clínicos más favorables (Lu et al., 2020). La sobreexpresión de dicho miRNA reprime la proliferación y las propiedades de

células madres *in vitro* e *in vivo* en un modelo murino con xenotransplantes (Lu et al., 2020). En la misma línea, el miR-214-3p se encontraba regulado negativamente en tejidos y células de cáncer de endometrio. Además, la sobreexpresión del miR-214-3p inhibió la migración, invasión y la transición epitelio-mesenquimal en células de cáncer de endometrio y suprimió el crecimiento tumoral al regular la EMT en un modelo *in vivo* (Fang, 2019). Por último, acorde con los resultados presentados en este tercer capítulo de tesis, Yamaoka et al. (Yamaoka et al., 2021) propuso al miR-214-3p como un nuevo biomarcador del tumor rabdoide del riñón (RTK). La expresión exosomal del miR-214-3p se encontraba significativamente aumentada en las líneas celulares derivadas de RTK en comparación con la línea celular renal embrionaria humana. A su vez, el nivel de expresión del miR-214-3p en exosomas de suero resultó ser significativamente mayor en ratones con xenotransplante de RTK en comparación con ratones control (Yamaoka et al., 2021). Por lo tanto, la función del miR-214-3p parecería variar de acuerdo al tipo de cáncer y muestra analizada. Sin embargo, de acuerdo a la evidencia presente en la literatura y este trabajo de tesis, el miR-214-3p resulta ser un buen y prometedor biomarcador a nivel de fluidos, en particular en sangre.

En cuanto al hsa-miR-324-3p, ha sido propuesto, en la literatura, como un oncomiR en distintos tipos de cáncer. Al igual que el miR-214-3p, el rol del miR-324-3p en CaP ha sido pobremente estudiado, encontrándose un solo trabajo publicado al respecto. Han et al. (han et al., 2019) reportó que el RNA largo no codificante conocido como lncRNA SNHG7 estaba sobreexpresado en células y tejidos de CaP y actuaba como una esponja para el miR-324-3p, regulando positivamente a WNR2B por efecto esponja. Un experimento *in vitro* sugirió que el lncRNA SNHG7 promueve la EMT en CaP por medio del miR-324-3p y WNT2B (han et al., 2019). Por lo tanto, el trabajo mencionado anteriormente sugiere un rol supresor tumoral por parte del miR-324-3p en el CaP, mientras que los resultados presentados en este trabajo de tesis lo proponen como un oncomiR útil como biomarcador para el diagnóstico del CaP. Sin embargo, al ser un solo trabajo disponible en la literatura, no se puede concluir una función concreta de este miRNA en el cáncer de próstata y es necesario realizar más análisis. Más allá del CaP, el miR-324-3p ha sido reportado como oncomiR en otros cánceres. En el cáncer de pulmón de células escamosas el miR-324-3p estaba aumentado significativamente en el plasma

de pacientes en etapa I en comparación con VS (X. Gao et al., 2016). Un análisis de curvas ROC mostró que el miR-324-3p resultó ser un buen biomarcador para distinguir entre pacientes con cáncer de pulmón de células escamosas y VS, con AUC de 0,79 (X. Gao et al., 2016). Además, el miR-324-3p estaba aumentado en cáncer de pulmón, y su sobreexpresión aumentó la proliferación celular pero no alteró la invasión de células de cáncer de pulmón (M. H. Lin et al., 2018). De la misma forma, este miRNA fue encontrado aumentado en tejidos de pacientes con cáncer de vejiga (CaV) en comparación con los tejidos normales adyacentes correspondientes. Más aún, en pacientes con CaV, altos niveles de expresión del miR-324-3p se correlacionó positivamente con una pobre supervivencia (Tsai et al., 2020). Se encontró que la expresión del mismo aumenta el crecimiento y motilidad de las células de CaV, y aceleró la capacidad de formación de colonias, migración e invasión de las células humanas de CaV BFTC905 (Tsai et al., 2020). El miR-324-3p estaba aumentado en tejido tumoral de cáncer gástrico (CaG) en comparación con el tejido normal adyacente. Además, la sobreexpresión del miR-324-3p produjo un aumento en el crecimiento celular, la migración y una disminución de la apoptosis en células de CaG (Sun et al., 2018). Se vio que el miR-324-3p reprimió la expresión de Smad4, lo que activó la vía de señalización Wnt/beta-catenina. Finalmente, la sobreexpresión del miR-324-3p generó un aumento en el nivel de ATP intracelular y facilitó la colonización y crecimiento de células tumorales en un experimento *in vivo* de CaG y contribuyó al crecimiento de organoides gástricos (Sun et al., 2018). Por último, el miR-324-3p se encontró aumentado en tejidos y líneas celulares de carcinoma hepatocelular (CHC). Tanto en experimentos *in vitro* e *in vivo* se vio que el miR-324-3p promovía la viabilidad celular, la formación de colonias, la proliferación y la progresión del ciclo celular en células de CHC. Pacientes con CHC y una alta expresión del miR-324-3p se correlacionaron con un mal pronóstico y una supervivencia general y libre de enfermedad más cortas (Tuo et al., 2017).

Por último, se encuentra el hsa-miR-181d-5p, un miRNA muy poco estudiado en la literatura en cánceres humanos. Se ha encontrado que el miR-181d-5p estaba disminuido en tumores de pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, en comparación con tejido normal. La sobreexpresión del miR-181d-5p inactivó la vía de señalización de Akt (L. M. Gao et al., 2019). Por lo tanto, Gao et al. (L. M. Gao et al.,

2019) ha propuesto que el miR-181d-5p tiene efectos de supresor tumoral en el cáncer de pulmón de células no pequeñas, a través de la inactivación de la vía de Akt por la supresión de CDKN3. En el mismo sentido, el miR-181d-5p ha sido reportado con funciones anti-oncogénicas en osteosarcoma (OS) al tener como blanco a FOXP1. En particular, la disminución del miR-181d-5p fue identificado como un factor pronóstico significativo para pacientes con OS (H. Chen et al., 2018). Se ha detectado al miR-181d-5p en exosomas derivados de fibroblastos asociados al cáncer (CAFs). Un experimento *in vitro* de co-cultivo entre CAF y células humanas de cáncer de mama (CaM) MCF-7 mostró que los CAFs prolongaban la proliferación y disminuían la apoptosis de las MCF-7 a través de la liberación de exosomas conteniendo al miR-181d-5p que tiene como blanco al CDX2 y HOXA5 (Wang et al., 2020). A su vez, los exosomas derivados de CAFs conteniendo al miR-181d-5p promovieron el crecimiento tumoral en ratones *nude* con xenotransplantes de células MCF-7 (Wang et al., 2020). Por lo tanto, este último resultado apoya los hallazgos presentados en este trabajo de tesis, proponiendo al miR-181d-5p con funciones de oncomiR.

En conclusión, se han identificado diversos miRNAs que se encuentran aumentados en circulación en pacientes con CaP y actúan a nivel tumoral como oncomiRs y/o como tsmiRs, cuyo rol en el CaP no ha sido descrito en su gran mayoría. Muy pocos de ellos han sido reportados como posibles biomarcadores para ser utilizados en la detección temprana del CaP, mientras que la mayoría están siendo descritos por primera vez en el presente trabajo como los hsa-miR-214-3p, el miR-324-3p y el miR-181d-5p.

A partir de estos hallazgos, el paso siguiente, es identificar la combinación de miRNAs que mejor pueda predecir el CaP mediante modelos logísticos y machine learning. Si bien este análisis ya fue realizado, seleccionando un modelo predictivo de 5 miRNAs (que resultó tener mayor sensibilidad y valor predictivo negativo), resulta necesario aumentar el n de pacientes, teniendo un mínimo de 100 pacientes, para tener resultados más robustos. De esta manera, el paso siguiente es generar un ensayo para la detección del CaP implementándose como método de tamizaje de rutina junto con el PSA. De la misma forma queda pendiente a futuro, evaluar la correlación de los miRNAs seleccionados con el grado de Gleason y posibles metástasis, pudiendo

generar un nuevo panel biomarcador pronóstico del CaP, que ayudarían a la toma de decisión de los médicos en cuanto al tratamiento que podría recibir o no el paciente.

ANEXO

ANEXO

Capítulo 3 Materiales y Métodos

Tabla suplementaria 1: Tabla resumen de las características principales de los pacientes utilizadas en las cohortes exploratoria y validatoria.

Datos identificatorios			Patología			
Código	Cohorte	Edad a diagnóstico	PSA (ng/ml)	Diagnóstico	Grado Gleason	Grupo Gleason
1	Exploratoria	72	17	Adenocarcinoma de próstata	5+4=9	4
2	Exploratoria	65	13.4	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
4	Exploratoria	56	11	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
5	Exploratoria	80	7.6	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
6	Exploratoria	67	2.7	Adenocarcinoma de próstata	IZQ:3+3=6 DER:4+3=7	2
12	Exploratoria	67	20	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
17	Exploratoria	S/D	S/D	Adenocarcinoma de próstata	IZQ:4+3=7 DER:5+4=9	4
19	Exploratoria	65	7	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
170	Exploratoria	70	S/D	Cancer de próstata	8	3
185	Exploratoria	58	1,4	Adenocarcinoma de próstata	IZQ:4+3=7 DER:3+3=6	2
189	Exploratoria	58	6,3	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
212	Validatoria	68	3,88	Cancer de próstata	4+5=9	4
213	Validatoria	60	2,62	S/D	S/D	S/D
214	Exploratoria/Validatoria	69	2,21	S/D	S/D	S/D
216	Validatoria	50	0,36	S/D	S/D	S/D
217	Validatoria	50	1,15	S/D	S/D	S/D
218	Validatoria	58	0,67	S/D	S/D	S/D
219	Validatoria	59	0,29	S/D	S/D	S/D
220	Validatoria	55	1,22	S/D	S/D	S/D
221	Validatoria	53	37,24	Cancer de próstata	4+3=7	2

222	Validatoria	50	85,9	Cancer de próstata	5+4=9	4
223	Validatoria	53	4,77	S/D	S/D	S/D
224	Validatoria	S/D	4,88	S/D	S/D	S/D
225	Validatoria	S/D	4,01	S/D	S/D	S/D
226	Validatoria	48	7,5	Cancer de próstata	3+4=7	2
234	Validatoria	67	9,72	Cancer de próstata	3+4=7	2
240	Validatoria	60	9,72	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
241	Validatoria	66	4,23	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
258	Exploratoria/Validatoria	60	3,75	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
259	Exploratoria/Validatoria	65	5,95	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
260	Exploratoria/Validatoria	59	37,49	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
263	Exploratoria/Validatoria	57	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
303	Exploratoria/Validatoria	69	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
304	Validatoria	68	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
311	Validatoria	60	9,2	Adenocarcinoma de próstata	4+5=9	4
315	Validatoria	59	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
317	Validatoria	64	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
352	Validatoria	45	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
354	Validatoria	59	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
366	Validatoria	53	S/D	Cancer de próstata	3+4=7	2
367	Validatoria	66	9,47	Cancer de próstata	3+4=7	2
368	Validatoria	61	5,8	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
373	Validatoria	S/D	elevado	S/D	S/D	S/D
374	Validatoria	60	8,7	Cancer de próstata	S/D	S/D

375	Validatoria	62	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
391	Validatoria	78	21,7	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
427	Validatoria	69	98,01	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7 y 4+5=9	4
428	Validatoria	68	4,53	Cancer de próstata	S/D	S/D
431	Validatoria	87	S/D	S/D	S/D	S/D
432	Validatoria	74	7,8	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
433	Validatoria	64	7,4	Cancer de próstata	S/D	S/D
434	Validatoria	71	7,73	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
437	Validatoria	60	6,1	Cancer de próstata	4+4=8	3
438	Validatoria	47	3,64	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
439	Validatoria	67	S/D	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
441	Validatoria	52	S/D	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
443	Validatoria	61	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
444	Validatoria	54	S/D	Cancer de próstata	3+4=7	2
445	Validatoria	64	S/D	Cancer de próstata	5+4=9	4
446	Validatoria	60	23	Cancer de próstata	4+4=8	3
448	Validatoria	73	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
451	Validatoria	70	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
453	Validatoria	69	7.48	Cancer de próstata	4+3=7	2
454	Validatoria	61	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
455	Validatoria	72	9.3	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
456	Validatoria	86	S/D	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
457	Validatoria	65	11	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2

461	Validatoria	67	S/D	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
462	Validatoria	71	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
463	Validatoria	58	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
464	Validatoria	70	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
465	Validatoria	54	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
467	Validatoria	45	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
468	Validatoria	73	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
471	Validatoria	68	S/D	Cancer de próstata	S/D	S/D
476	Validatoria	76	37	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
478	Validatoria	74	50	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
479	Validatoria	59	22	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
480	Validatoria	76	294.02	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
481	Validatoria	74	11.03	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
482	Validatoria	69	29.8	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
483	Validatoria	79	11.53	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
484	Validatoria	59	S/D	Adenocarcinoma de próstata	4+5 y 4+4	3
485	Validatoria	68	20	Cancer de próstata	4+3=7	2
486	Validatoria	50	S/D	Adenocarcinoma de próstata	4+4=8	3
487	Validatoria	60	S/D	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
488	Validatoria	82	22.13	Adenocarcinoma de próstata	3+3=6	1
489	Validatoria	65	S/D	Cancer de próstata	4+3=7	2
490	Validatoria	72	12.66	Adenocarcinoma de próstata	4+3=7	2
494	Validatoria	73	11.77	Adenocarcinoma de próstata	4+4=7	3

495	Validatoria	55	15.99	Adenocarcinoma de próstata	3+4=7	2
497	Validatoria	84	13.89	Cancer de próstata	S/D	S/D
498	Validatoria	70	16.08	Adenocarcinoma de próstata	4+5=9	4

De los pacientes informados en la tabla también se han colectado otros datos como BMI, peso, altura, diámetro de la cintura, presión arterial, presencia de metástasis ósea, antecedentes familiares y personales de cáncer entre otros datos, los cuales no son mostrados dado la falta de información en varios casos. Abreviaturas utilizadas en la tabla: S/D.

Capítulo 3 Resultados

Tabla suplementaria 2: Lista de miRNAs obtenidos a partir de microarreglos de expresión comparando CaP vs VS.

ID	Transcript ID(Array Design)	PCA Avg (log2)	NO PCA Avg (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val
20519463	hsa-miR-4668-5p	5,94	2,88	8,33	0,0012	0,3242
20517821	hsa-miR-3613-3p	4,75	1,94	7,01	0,0072	0,5221
20504316	hsa-miR-548a-3p	5,05	3,72	2,51	0,0306	0,7693
20512261	hsa-miR-2277-5p	3,7	2,39	2,49	0,0034	0,4414
20536308	hsa-mir-320e	7,44	6,29	2,21	0,002	0,3745
20515640	hsa-miR-548x-3p	2,13	1,16	1,96	0,0056	0,5221
20518933	hsa-miR-4532	9,92	9,06	1,82	0,0081	0,5291
20534392	hsa-mir-101-1	1,51	0,74	1,7	0,0068	0,5221
20534393	hsa-mir-101-1	1,48	0,77	1,64	0,0231	0,7142
20534637	hsa-mir-320a	6,58	5,88	1,62	0,0096	0,5514
20525747	hsa-miR-6893-5p	1,79	1,11	1,61	0,0352	0,779
20536563	hsa-mir-3659	1,45	0,84	1,53	0,0068	0,5221
20519584	hsa-miR-4737	1,3	0,72	1,5	0,0124	0,5886
20506813	hsa-miR-1285-3p	1,49	0,91	1,5	0,0056	0,5221

Para la obtención de una lista de miRNAs se utilizaron los siguientes criterios de selección: valor $p < 0,05$ y $FC > 1,5$.

Tabla suplementaria 3: Lista de miRNAs obtenidos a partir de secuenciación de miRNAs comparando CaP vs VS.

miRNAs	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-217-5p	3,785954515	4,306177989	1,82330452	2,36174371	0,01818921	0,62162758
hsa-miR-190a-3p	2,809460215	2,761353457	1,40513912	1,96518154	0,04939323	0,72023882
hsa-miR-490-5p	29,84355844	2,702304043	0,88289571	3,06072848	0,00220799	0,61860647
hsa-miR-548ba	1,736278055	2,108064911	1,36302499	1,54660767	0,12195788	0,87298076
hsa-miR-1197	5,13747458	2,053927099	0,85423737	2,40439856	0,0161991	0,62162758
hsa-miR-4662b	1,852414833	2,037579744	1,15718317	1,76081004	0,07827056	0,79431149
hsa-miR-4662a-3p	1,57906567	1,972925448	1,11953671	1,76226955	0,07802377	0,79431149
hsa-miR-7845-5p	2,789752788	1,706567869	0,8717331	1,95767245	0,05026846	0,72023882
hsa-miR-552-3p	4,880930819	1,64355376	0,84271728	1,95030267	0,05114005	0,72023882
hsa-miR-214-3p	14,1626981	1,637025214	1,20145565	1,36253486	0,17302915	0,94188663
hsa-miR-655-3p	41,06015167	1,4841049	0,93100489	1,59408926	0,11091604	0,87298076
hsa-miR-539-3p	30,74270673	1,45388919	0,96153303	1,5120533	0,1305203	0,87298076
hsa-miR-6131	3,319417524	1,395227091	0,93868424	1,48636466	0,13718269	0,87298076
hsa-miR-5698	4,02942842	1,387817383	0,88523425	1,56774027	0,11694176	0,87298076
hsa-miR-296-3p	5,901441664	1,384429121	0,78658576	1,76004855	0,07839958	0,79431149
hsa-miR-146a-3p	8,369290048	1,365331226	1,05108645	1,29897138	0,19395375	0,94188663
hsa-miR-758-3p	12,2064167	1,217157722	0,77050457	1,57968916	0,11417807	0,87298076
hsa-miR-4662a-5p	7,731853407	1,198308064	0,54872993	2,18378476	0,02897807	0,62162758
hsa-miR-6513-3p	2,347331463	1,193116001	0,91625491	1,30216601	0,19285964	0,94188663
hsa-miR-410-5p	4,618003437	1,177441385	0,76936324	1,53041024	0,12591522	0,87298076
hsa-miR-381-5p	6,690275029	1,149480234	0,83008685	1,38477104	0,16612249	0,94188663
hsa-let-7d-3p	67,52258198	1,14104007	0,66439945	1,71740069	0,08590599	0,80346288
hsa-miR-485-3p	122,0658561	1,066128353	0,64673221	1,648485	0,09925319	0,87298076
hsa-miR-3188	9,906891279	1,033598256	0,66353111	1,55772389	0,11929872	0,87298076
hsa-miR-4488	8,063834702	1,004821061	0,70931596	1,41660573	0,15659823	0,93170132
hsa-let-7f-2-3p	124,2704832	0,948157075	0,62608295	1,51442723	0,12991752	0,87298076
hsa-miR-432-5p	1498,467843	0,895286992	0,62819587	1,42517173	0,15410757	0,92705332
hsa-miR-3174	20,76764661	0,892451757	0,37065619	2,40776167	0,01605066	0,62162758
hsa-miR-4687-5p	6,201552712	0,853099878	0,56344417	1,51408059	0,1300054	0,87298076
hsa-miR-664a-3p	40,15641743	0,852065261	0,42440596	2,00766563	0,04467884	0,71081783
hsa-miR-656-3p	47,08430976	0,815875708	0,59481407	1,37164829	0,17017295	0,94188663
hsa-miR-454-5p	6,139137271	0,786656124	0,5148973	1,5277923	0,12656411	0,87298076
hsa-miR-323a-5p	20,96967596	0,769273354	0,49046598	1,56845404	0,11677521	0,87298076
hsa-miR-329-3p	107,7578692	0,749710011	0,58005698	1,29247648	0,19619218	0,94188663
hsa-miR-130a-5p	25,21539296	0,746559497	0,4163007	1,79331791	0,0729221	0,78885296
hsa-miR-326	40,73646255	0,730909697	0,41990749	1,74064459	0,0817459	0,80346288
hsa-miR-497-5p	40,69045507	0,729928933	0,38373856	1,90215164	0,05715133	0,75873322
hsa-let-7g-3p	7,684505624	0,713168775	0,5513164	1,29357438	0,19581248	0,94188663
hsa-miR-181a-3p	619,3913951	0,711094718	0,37346315	1,90405593	0,0569029	0,75873322
hsa-miR-664a-5p	382,9118969	0,66311002	0,24657781	2,68925267	0,00716122	0,61860647
hsa-miR-548ao-5p	27,04754556	0,621410237	0,40662808	1,52820296	0,12646215	0,87298076
hsa-miR-1304-3p	15,78482862	0,618174699	0,38217856	1,6175023	0,1057699	0,87298076
hsa-miR-4433a-3p	60,76732355	0,613977314	0,33798495	1,81658183	0,06928117	0,78885296
hsa-miR-4433b-5p	60,76732355	0,613977314	0,33798495	1,81658183	0,06928117	0,78885296
hsa-miR-191-3p	67,47755596	0,613587835	0,45373993	1,35228969	0,17628266	0,94188663

hsa-miR-625-5p	1915,855337	0,602269576	0,29115242	2,06857143	0,03858632	0,67198446
hsa-miR-30c-5p	5323,957151	0,556324452	0,30415238	1,82909783	0,06738495	0,78885296
hsa-miR-30b-5p	4783,013653	0,546911576	0,29424869	1,85867122	0,06307376	0,78885296
hsa-miR-5584-5p	18,65158864	0,546092957	0,39797261	1,37218728	0,17000514	0,94188663
hsa-miR-589-3p	18,25158251	0,534806082	0,38767862	1,37950884	0,16773792	0,94188663
hsa-miR-181a-5p	5328,80669	0,53397633	0,37978047	1,40601313	0,15972023	0,93170132
hsa-miR-146a-5p	101495,2704	0,523528	0,20564741	2,54575532	0,01090416	0,61860647
hsa-miR-92a-1-5p	26,79704522	0,514327637	0,38822691	1,32481192	0,18523354	0,94188663
hsa-miR-29b-1-5p	24,2876202	0,513155521	0,33850561	1,5159439	0,12953354	0,87298076
hsa-miR-146b-5p	128593,5344	0,509818104	0,19188065	2,65695426	0,00788501	0,61860647
hsa-miR-628-5p	92,01164194	0,496270976	0,27730489	1,78962216	0,07351467	0,78885296
hsa-miR-26a-5p	925917,4402	0,49174004	0,3275984	1,50104531	0,13334384	0,87298076
hsa-miR-200c-3p	210,7136993	0,487403498	0,3029282	1,6089737	0,10762209	0,87298076
hsa-miR-584-5p	415,9725699	0,460010557	0,35156897	1,3084504	0,19072059	0,94188663
hsa-miR-3613-3p	172,9045147	0,4577666	0,3508614	1,30469352	0,19199723	0,94188663
hsa-miR-181d-5p	244,4792534	0,434592687	0,28250062	1,53837782	0,12395626	0,87298076
hsa-miR-301b-3p	56,46045076	0,434151212	0,31556831	1,37577568	0,16889109	0,94188663
hsa-miR-28-3p	7054,124331	0,423353099	0,28474862	1,48676085	0,13707799	0,87298076
hsa-miR-628-3p	187,8167487	0,40049373	0,30321206	1,32083709	0,18655569	0,94188663
hsa-miR-324-3p	95,30940921	0,373865023	0,23709582	1,57685205	0,11482957	0,87298076
hsa-miR-221-3p	22906,53041	0,371932641	0,26403199	1,40866508	0,15893423	0,93170132
hsa-miR-23b-3p	43529,52749	0,365098746	0,18744701	1,94774377	0,05144563	0,72023882
hsa-miR-197-3p	196,9742499	0,359957868	0,26087645	1,37980206	0,1676476	0,94188663
hsa-let-7a-5p	361200,6477	0,315038289	0,24164888	1,30370265	0,19233499	0,94188663
hsa-let-7c-5p	361045,1685	0,31493068	0,24164263	1,30329104	0,19247542	0,94188663
hsa-miR-23c	81,41841521	0,291785968	0,2008646	1,45265003	0,14632095	0,90133703
hsa-miR-23a-3p	25690,52334	0,232554173	0,14708131	1,58112662	0,11384909	0,87298076
hsa-miR-222-3p	2854,6921	0,230553903	0,14387462	1,60246408	0,10905303	0,87298076
hsa-let-7i-5p	74675,85306	-0,198479875	0,13285675	-1,49393899	0,13519157	0,87298076
hsa-miR-9-3p	134,1092199	-0,295744672	0,22423573	-1,31890074	0,1872023	0,94188663
hsa-miR-627-5p	85,96158921	-0,343215184	0,1984692	-1,72931209	0,08375325	0,80346288
hsa-miR-148b-3p	2432,32177	-0,349281767	0,18314494	-1,90713302	0,05650336	0,75873322
hsa-miR-769-5p	66,43138592	-0,356830045	0,24228499	-1,4727699	0,14081309	0,88831348
hsa-miR-103a-3p	39104,79554	-0,36120139	0,13963977	-2,58666568	0,00969096	0,61860647
hsa-miR-103b	39104,79554	-0,36120139	0,13963977	-2,58666568	0,00969096	0,61860647
hsa-miR-107	39102,40823	-0,361246649	0,13962885	-2,58719208	0,00967616	0,61860647
hsa-miR-223-5p	284,2812967	-0,366960631	0,18184289	-2,01800919	0,0435903	0,71081783
hsa-miR-22-3p	45440,72273	-0,421092212	0,21174047	-1,98871864	0,04673227	0,71967691
hsa-miR-20a-5p	58019,76237	-0,426975532	0,3197955	-1,33515179	0,18182667	0,94188663
hsa-miR-548d-5p	259,1828933	-0,481927388	0,26952206	-1,78808141	0,07376287	0,78885296
hsa-miR-548b-5p	252,9794542	-0,490365236	0,2679008	-1,83039853	0,06719037	0,78885296
hsa-miR-548g-5p	58,09151295	-0,494135203	0,32499902	-1,52042061	0,1284053	0,87298076
hsa-miR-548x-5p	58,09151295	-0,494135203	0,32499902	-1,52042061	0,1284053	0,87298076
hsa-miR-548aj-5p	58,09151295	-0,494135203	0,32499902	-1,52042061	0,1284053	0,87298076
hsa-miR-548aq-3p	55,3184546	-0,501822704	0,33323871	-1,5058956	0,13209398	0,87298076
hsa-miR-17-3p	927,81073	-0,521458873	0,23673447	-2,20271626	0,02761475	0,62162758

hsa-miR-106b-5p	38651,93924	-0,540156444	0,25171148	-2,1459349	0,03187817	0,62162758
hsa-miR-101-3p	1023,781301	-0,54852806	0,42719509	-1,2840224	0,19913412	0,94188663
hsa-miR-4659a-3p	15,87385262	-0,57647699	0,3297336	-1,74831136	0,08041013	0,80346288
hsa-miR-548au-5p	288,2116757	-0,588817187	0,27137213	-2,16977765	0,03002369	0,62162758
hsa-miR-18a-5p	11719,98091	-0,592404937	0,2776869	-2,13335571	0,03289556	0,62162758
hsa-miR-18b-5p	11713,22227	-0,5928101	0,27766893	-2,13495294	0,03276485	0,62162758
hsa-miR-651-5p	54,90408804	-0,597527738	0,25728353	-2,32244849	0,0202088	0,62162758
hsa-miR-548as-5p	5,788388922	-0,674089131	0,50980205	-1,3222566	0,18608272	0,94188663
hsa-miR-590-5p	1136,806314	-0,676518513	0,30215133	-2,23900554	0,02515556	0,62162758
hsa-miR-4454	28,78098535	-0,678573342	0,33769156	-2,00944718	0,04448973	0,71081783
hsa-miR-450b-5p	11,8096744	-0,716906435	0,47983795	-1,49405949	0,13516007	0,87298076
hsa-miR-424-5p	1167,623323	-0,723594127	0,42227195	-1,71357375	0,08660704	0,80346288
hsa-miR-3184-5p	215,4315352	-0,734728022	0,35643442	-2,06132737	0,03927182	0,67198446
hsa-miR-624-5p	80,48753029	-0,751901681	0,51943024	-1,44755084	0,14774271	0,9028721
hsa-miR-1537-3p	9,261542512	-0,753845056	0,52889628	-1,42531737	0,15406548	0,92705332
hsa-miR-363-3p	416,7828554	-0,757610946	0,48530836	-1,56109191	0,11850207	0,87298076
hsa-miR-5010-5p	56,10884993	-0,760338721	0,34581876	-2,19866244	0,02790193	0,62162758
hsa-miR-548h-5p	37,85716531	-0,761093154	0,31825696	-2,39144228	0,01678232	0,62162758
hsa-miR-548i	5,282597904	-0,782395526	0,53284004	-1,46834972	0,14200925	0,88831348
hsa-miR-210-3p	33,71015633	-0,809555799	0,37991753	-2,13087247	0,03309965	0,62162758
hsa-miR-29b-2-5p	5,85349035	-0,844164066	0,64944052	-1,29983276	0,1936583	0,94188663
hsa-miR-550a-3p	23,13786069	-0,853086364	0,64074014	-1,33140771	0,1830549	0,94188663
hsa-miR-550b-2-5p	23,13786069	-0,853086364	0,64074014	-1,33140771	0,1830549	0,94188663
hsa-miR-503-5p	205,3716765	-0,860710805	0,36827171	-2,3371624	0,01943074	0,62162758
hsa-miR-106a-5p	2150,267887	-0,864301475	0,47847924	-1,80635103	0,07086353	0,78885296
hsa-miR-450a-5p	65,67483645	-0,895595278	0,41352352	-2,16576626	0,03032905	0,62162758
hsa-miR-576-3p	54,17024338	-0,900831404	0,50703647	-1,77665997	0,0756242	0,79431149
hsa-miR-548ap-3p	13,00392759	-0,913499629	0,46738638	-1,95448493	0,05064389	0,72023882
hsa-miR-3143	64,80267736	-0,920072099	0,39225615	-2,34558998	0,01899699	0,62162758
hsa-miR-20b-5p	2647,443547	-0,944282886	0,51869737	-1,82048904	0,06868456	0,78885296
hsa-miR-181b-2-3p	2,965589369	-0,948528499	0,68425341	-1,38622401	0,16567851	0,94188663
hsa-miR-424-3p	262,5868484	-0,952548499	0,44346669	-2,1479595	0,03171697	0,62162758
hsa-miR-4677-3p	4,188786587	-0,986437456	0,57065102	-1,72861771	0,08387754	0,80346288
hsa-miR-629-5p	88,99880275	-1,008678808	0,46945004	-2,1486393	0,031663	0,62162758
hsa-miR-548ay-5p	122,6912608	-1,020639592	0,45037682	-2,26619033	0,02343973	0,62162758
hsa-miR-6514-5p	2,353757159	-1,081319179	0,81183056	-1,33195181	0,18287602	0,94188663
hsa-miR-4659b-3p	5,737033024	-1,085208887	0,65408581	-1,65912313	0,09709098	0,87298076
hsa-miR-1303	98,26616159	-1,090665699	0,37959305	-2,8732499	0,00406273	0,61860647
hsa-miR-664b-5p	9,043975821	-1,1307104	0,79975846	-1,41381486	0,15741627	0,93170132
hsa-miR-548ar-5p	23,36475582	-1,160386609	0,63639428	-1,82337686	0,06824633	0,78885296
hsa-miR-215-5p	13,18951186	-1,175891528	0,7571257	-1,55309948	0,12039937	0,87298076
hsa-miR-92b-5p	4,686424844	-1,246244015	0,81859633	-1,52241584	0,12790492	0,87298076
hsa-miR-4772-5p	31,70781733	-1,33610626	0,7855755	-1,70079931	0,08898068	0,81565623
hsa-miR-208b-3p	2,618677475	-1,407477768	0,89666269	-1,56968477	0,11648847	0,87298076
hsa-miR-1285-5p	1,774413004	-1,418550809	0,94380211	-1,50301721	0,13283461	0,87298076
hsa-miR-16-5p	228267,8239	-1,436415322	0,50731992	-2,83137972	0,00463477	0,61860647

hsa-miR-3688-3p	4,267616962	-1,443895622	0,8051267	-1,79337689	0,07291268	0,78885296
hsa-miR-4747-5p	3,463772917	-1,462172533	0,95186655	-1,53611085	0,1245112	0,87298076
hsa-miR-122b-3p	503,4761125	-1,509964769	0,87784979	-1,72007192	0,08541937	0,80346288
hsa-miR-3158-3p	18,45011254	-1,540860768	0,66857466	-2,30469513	0,02118365	0,62162758
hsa-miR-548aj-3p	17,32851073	-1,548290244	0,73587299	-2,10401832	0,03537685	0,63349241
hsa-miR-582-3p	5,16846874	-1,635263249	1,11658972	-1,46451576	0,14305308	0,88831348
hsa-miR-548ad-5p	67,81121206	-1,654639348	0,65904715	-2,51065398	0,01205078	0,61860647
hsa-miR-548ae-5p	67,81121206	-1,654639348	0,65904715	-2,51065398	0,01205078	0,61860647
hsa-miR-885-3p	4,080809629	-1,654767563	1,08530876	-1,52469751	0,12733456	0,87298076
hsa-miR-122-5p	1024,602522	-1,661007863	0,92166765	-1,80217659	0,07151763	0,78885296
hsa-miR-33b-3p	3,002466008	-1,683569644	0,6971906	-2,41479108	0,01574424	0,62162758
hsa-miR-1255b-5p	22,22815562	-1,732501648	0,7592366	-2,28189954	0,02249527	0,62162758
hsa-miR-182-5p	332,7902759	-1,756188537	0,64456711	-2,72460155	0,00643791	0,61860647
hsa-miR-6885-5p	2,104910826	-1,832842749	0,91528953	-2,0024732	0,04523386	0,71081783
hsa-miR-4732-3p	2,866095213	-1,879954438	1,3974631	-1,34526231	0,17854054	0,94188663
hsa-miR-4772-3p	14,20694577	-2,012346898	0,95343911	-2,11061921	0,03480506	0,63349241
hsa-miR-580-5p	1,724665439	-2,016982339	1,116009	-1,80731728	0,07071282	0,78885296
hsa-miR-122b-5p	37,83281645	-2,254019824	0,9580352	-2,35275262	0,01863503	0,62162758
hsa-miR-122-3p	36,53975607	-2,459811426	0,89806017	-2,7390274	0,00616212	0,61860647
hsa-miR-4508	3,469904974	-2,890256974	1,27904411	-2,25970078	0,02383983	0,62162758
hsa-miR-3200-5p	3,024427374	-2,956770691	1,23632798	-2,39157468	0,01677627	0,62162758
hsa-miR-6815-5p	3,649092284	-3,266347163	1,26632473	-2,57939144	0,00989746	0,61860647
hsa-miR-412-5p	1,95541001	-3,652029638	1,21563182	-3,00422348	0,0026626	0,61860647

Tabla suplementaria 4: Lista de miRNAs obtenidos a partir de secuenciación de miRNAs comparando CaP vs VS con criterios de selección.

miRNAs	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
hsa-miR-217-5p	3,785954515	4,306177989	1,82330452	2,36174371	0,01818921	0,62162758
hsa-miR-190a-3p	2,809460215	2,761353457	1,40513912	1,96518154	0,04939323	0,72023882
hsa-miR-490-5p	29,84355844	2,702304043	0,88289571	3,06072848	0,00220799	0,61860647
hsa-miR-548ba	1,736278055	2,108064911	1,36302499	1,54660767	0,12195788	0,87298076
hsa-miR-1197	5,13747458	2,053927099	0,85423737	2,40439856	0,0161991	0,62162758
hsa-miR-4662b	1,852414833	2,037579744	1,15718317	1,76081004	0,07827056	0,79431149
hsa-miR-4662a-3p	1,57906567	1,972925448	1,11953671	1,76226955	0,07802377	0,79431149
hsa-miR-7845-5p	2,789752788	1,706567869	0,8717331	1,95767245	0,05026846	0,72023882
hsa-miR-552-3p	4,880930819	1,64355376	0,84271728	1,95030267	0,05114005	0,72023882
hsa-miR-214-3p	14,1626981	1,637025214	1,20145565	1,36253486	0,17302915	0,94188663
hsa-miR-655-3p	41,06015167	1,4841049	0,93100489	1,59408926	0,11091604	0,87298076
hsa-miR-539-3p	30,74270673	1,45388919	0,96153303	1,5120533	0,1305203	0,87298076
hsa-miR-6131	3,319417524	1,395227091	0,93868424	1,48636466	0,13718269	0,87298076
hsa-miR-5698	4,02942842	1,387817383	0,88523425	1,56774027	0,11694176	0,87298076
hsa-miR-296-3p	5,901441664	1,384429121	0,78658576	1,76004855	0,07839958	0,79431149
hsa-miR-146a-3p	8,369290048	1,365331226	1,05108645	1,29897138	0,19395375	0,94188663
hsa-miR-758-3p	12,2064167	1,217157722	0,77050457	1,57968916	0,11417807	0,87298076
hsa-miR-4662a-5p	7,731853407	1,198308064	0,54872993	2,18378476	0,02897807	0,62162758

hsa-miR-6513-3p	2,347331463	1,193116001	0,91625491	1,30216601	0,19285964	0,94188663
hsa-miR-410-5p	4,618003437	1,177441385	0,76936324	1,53041024	0,12591522	0,87298076
hsa-miR-381-5p	6,690275029	1,149480234	0,83008685	1,38477104	0,16612249	0,94188663
hsa-let-7d-3p	67,52258198	1,14104007	0,66439945	1,71740069	0,08590599	0,80346288
hsa-miR-485-3p	122,0658561	1,066128353	0,64673221	1,648485	0,09925319	0,87298076
hsa-miR-3188	9,906891279	1,033598256	0,66353111	1,55772389	0,11929872	0,87298076
hsa-miR-4488	8,063834702	1,004821061	0,70931596	1,41660573	0,15659823	0,93170132
hsa-let-7f-2-3p	124,2704832	0,948157075	0,62608295	1,51442723	0,12991752	0,87298076
hsa-miR-432-5p	1498,467843	0,895286992	0,62819587	1,42517173	0,15410757	0,92705332
hsa-miR-3174	20,76764661	0,892451757	0,37065619	2,40776167	0,01605066	0,62162758
hsa-miR-4687-5p	6,201552712	0,853099878	0,56344417	1,51408059	0,1300054	0,87298076
hsa-miR-664a-3p	40,15641743	0,852065261	0,42440596	2,00766563	0,04467884	0,71081783
hsa-miR-656-3p	47,08430976	0,815875708	0,59481407	1,37164829	0,17017295	0,94188663
hsa-miR-454-5p	6,139137271	0,786656124	0,5148973	1,5277923	0,12656411	0,87298076
hsa-miR-323a-5p	20,96967596	0,769273354	0,49046598	1,56845404	0,11677521	0,87298076
hsa-miR-329-3p	107,7578692	0,749710011	0,58005698	1,29247648	0,19619218	0,94188663
hsa-miR-130a-5p	25,21539296	0,746559497	0,4163007	1,79331791	0,0729221	0,78885296
hsa-miR-326	40,73646255	0,730909697	0,41990749	1,74064459	0,0817459	0,80346288
hsa-miR-497-5p	40,69045507	0,729928933	0,38373856	1,90215164	0,05715133	0,75873322
hsa-let-7g-3p	7,684505624	0,713168775	0,5513164	1,29357438	0,19581248	0,94188663
hsa-miR-181a-3p	619,3913951	0,711094718	0,37346315	1,90405593	0,0569029	0,75873322
hsa-miR-664a-5p	382,9118969	0,66311002	0,24657781	2,68925267	0,00716122	0,61860647
hsa-miR-548a-5p	27,04754556	0,621410237	0,40662808	1,52820296	0,12646215	0,87298076
hsa-miR-1304-3p	15,78482862	0,618174699	0,38217856	1,6175023	0,1057699	0,87298076
hsa-miR-4433a-3p	60,76732355	0,613977314	0,33798495	1,81658183	0,06928117	0,78885296
hsa-miR-4433b-5p	60,76732355	0,613977314	0,33798495	1,81658183	0,06928117	0,78885296
hsa-miR-191-3p	67,47755596	0,613587835	0,45373993	1,35228969	0,17628266	0,94188663
hsa-miR-625-5p	1915,855337	0,602269576	0,29115242	2,06857143	0,03858632	0,67198446
hsa-miR-30c-5p	5323,957151	0,556324452	0,30415238	1,82909783	0,06738495	0,78885296
hsa-miR-30b-5p	4783,013653	0,546911576	0,29424869	1,85867122	0,06307376	0,78885296
hsa-miR-5584-5p	18,65158864	0,546092957	0,39797261	1,37218728	0,17000514	0,94188663
hsa-miR-589-3p	18,25158251	0,534806082	0,38767862	1,37950884	0,16773792	0,94188663
hsa-miR-181a-5p	5328,80669	0,53397633	0,37978047	1,40601313	0,15972023	0,93170132
hsa-miR-146a-5p	101495,2704	0,523528	0,20564741	2,54575532	0,01090416	0,61860647
hsa-miR-92a-1-5p	26,79704522	0,514327637	0,38822691	1,32481192	0,18523354	0,94188663
hsa-miR-29b-1-5p	24,2876202	0,513155521	0,33850561	1,5159439	0,12953354	0,87298076
hsa-miR-146b-5p	128593,5344	0,509818104	0,19188065	2,65695426	0,00788501	0,61860647
hsa-miR-628-5p	92,01164194	0,496270976	0,27730489	1,78962216	0,07351467	0,78885296
hsa-miR-26a-5p	925917,4402	0,49174004	0,3275984	1,50104531	0,13334384	0,87298076
hsa-miR-200c-3p	210,7136993	0,487403498	0,3029282	1,6089737	0,10762209	0,87298076
hsa-miR-584-5p	415,9725699	0,460010557	0,35156897	1,3084504	0,19072059	0,94188663
hsa-miR-3613-3p	172,9045147	0,4577666	0,3508614	1,30469352	0,19199723	0,94188663
hsa-miR-181d-5p	244,4792534	0,434592687	0,28250062	1,53837782	0,12395626	0,87298076
hsa-miR-301b-3p	56,46045076	0,434151212	0,31556831	1,37577568	0,16889109	0,94188663
hsa-miR-28-3p	7054,124331	0,423353099	0,28474862	1,48676085	0,13707799	0,87298076
hsa-miR-628-3p	187,8167487	0,40049373	0,30321206	1,32083709	0,18655569	0,94188663
hsa-miR-324-3p	95,30940921	0,373865023	0,23709582	1,57685205	0,11482957	0,87298076
hsa-miR-221-3p	22906,53041	0,371932641	0,26403199	1,40866508	0,15893423	0,93170132
hsa-miR-23b-3p	43529,52749	0,365098746	0,18744701	1,94774377	0,05144563	0,72023882
hsa-miR-197-3p	196,9742499	0,359957868	0,26087645	1,37980206	0,1676476	0,94188663
hsa-let-7a-5p	361200,6477	0,315038289	0,24164888	1,30370265	0,19233499	0,94188663
hsa-let-7c-5p	361045,1685	0,31493068	0,24164263	1,30329104	0,19247542	0,94188663

hsa-miR-23c	81,41841521	0,291785968	0,2008646	1,45265003	0,14632095	0,90133703
hsa-miR-23a-3p	25690,52334	0,232554173	0,14708131	1,58112662	0,11384909	0,87298076
hsa-miR-222-3p	2854,6921	0,230553903	0,14387462	1,60246408	0,10905303	0,87298076

Para la obtención de una lista de miRNAs se utilizaron los siguientes criterios de selección: valor $p < 0,2$ y $FC > 0$.

Tabla suplementaria 5: Lista de miRNAs obtenidos a partir de microarreglos de expresión comparando CaP vs VS con nuevos criterios de selección.

ID	Transcript ID(Array Design)	PCA Avg (log2)	NO PCA Avg (log2)	Fold Change	P-val	FDR P-val
20519463	hsa-miR-4668-5p	5,94	2,88	8,33	0,0012	0,3242
20517821	hsa-miR-3613-3p	4,75	1,94	7,01	0,0072	0,5221
20504316	hsa-miR-548a-3p	5,05	3,72	2,51	0,0306	0,7693
20525461	hsa-miR-6750-5p	3,97	2,64	2,5	0,0519	0,779
20512261	hsa-miR-2277-5p	3,7	2,39	2,49	0,0034	0,4414
20536308	hsa-mir-320e	7,44	6,29	2,21	0,002	0,3745
20515640	hsa-miR-548x-3p	2,13	1,16	1,96	0,0056	0,5221
20518852	hsa-miR-4467	4,18	3,3	1,85	0,188	0,8493
20519427	hsa-miR-4647	2,15	1,28	1,83	0,1617	0,8349
20518933	hsa-miR-4532	9,92	9,06	1,82	0,0081	0,5291
20534392	hsa-mir-101-1	1,51	0,74	1,7	0,0068	0,5221
20525386	hsa-miR-6511b-5p	3,53	2,77	1,69	0,0957	0,8045
20500185	hsa-miR-101-5p	3,6	2,84	1,69	0,0627	0,779
20534393	hsa-mir-101-1	1,48	0,77	1,64	0,0231	0,7142
20534637	hsa-mir-320a	6,58	5,88	1,62	0,0096	0,5514
20525747	hsa-miR-6893-5p	1,79	1,11	1,61	0,0352	0,779
20535333	hsa-mir-550a-1	4,78	4,14	1,55	0,0734	0,779
20535334	hsa-mir-550a-2	4,78	4,14	1,55	0,0734	0,779
20535436	hsa-mir-550a-3	4,78	4,14	1,55	0,0734	0,779
20536563	hsa-mir-3659	1,45	0,84	1,53	0,0068	0,5221
20519584	hsa-miR-4737	1,3	0,72	1,5	0,0124	0,5886
20506813	hsa-miR-1285-3p	1,49	0,91	1,5	0,0056	0,5221
20506857	hsa-miR-1263	2,25	1,67	1,49	5,99E-05	0,1494
20535205	hsa-mir-501	1,18	0,64	1,46	0,098	0,8045
20529143	hsa-miR-7851-3p	1,24	0,7	1,45	0,0417	0,779
20536626	hsa-mir-3923	1,33	0,79	1,45	0,1363	0,8073
20506782	hsa-miR-1233-3p	1,3	0,78	1,44	0,0012	0,3242
20526868	hsa-miR-7154-5p	1,7	1,18	1,44	0,0092	0,5514
20535940	hsa-mir-320d-2	3,47	2,95	1,43	0,0108	0,5804
20537592	hsa-mir-6847	1,34	0,83	1,42	0,0598	0,779
20538314	hsa-mir-3133	1,35	0,86	1,41	0,0679	0,779
20537464	hsa-mir-6722	4,72	4,23	1,4	0,0321	0,779
20520573	hsa-miR-5193	1,36	0,88	1,4	0,0479	0,779
20525534	hsa-miR-6786-3p	1,34	0,86	1,4	0,0402	0,779
20518848	hsa-miR-548aj-3p	1,75	1,27	1,39	0,186	0,8493
20529793	hsa-miR-8083	1,14	0,66	1,39	0,0229	0,7142
20525641	hsa-miR-6839-5p	1,1	0,63	1,38	0,0133	0,5893
20519552	hsa-miR-4720-5p	1,79	1,32	1,38	0,0647	0,779
20500745	hsa-miR-140-5p	1,18	0,72	1,37	0,0123	0,5886
20501240	hsa-miR-377-5p	1,11	0,67	1,36	0,0429	0,779

20536914	hsa-mir-4684	1,15	0,71	1,36	0,0179	0,6778
20536616	hsa-mir-3914-2	1,18	0,73	1,36	0,0063	0,5221
20536615	hsa-mir-3914-2	1,18	0,74	1,36	0,0043	0,4997
20501205	hsa-miR-363-5p	1,01	0,58	1,36	0,0009	0,3242
20503882	hsa-miR-503-5p	1,41	0,98	1,35	0,1811	0,8493
20536744	hsa-mir-3689d-1	1,18	0,75	1,35	0,0086	0,5479
20536745	hsa-mir-3689d-2	1,18	0,75	1,35	0,0086	0,5479
20537030	hsa-mir-4777	1,18	0,75	1,34	0,0012	0,3242
20536703	hsa-mir-548ag-1	1,18	0,76	1,34	0,0498	0,779
20523010	hsa-miR-6078	1,02	0,6	1,34	0,0669	0,779
20536879	hsa-mir-4658	1,35	0,93	1,34	0,011	0,5812
20519560	hsa-miR-4723-3p	1,41	0,99	1,33	0,0322	0,779
20535260	hsa-mir-487b	1,08	0,66	1,33	0,0023	0,3745
20536725	hsa-mir-548aj-1	1,07	0,66	1,33	0,0268	0,7383
20525574	hsa-miR-6806-3p	5,07	4,66	1,33	0,1568	0,8275
20526187	hsa-miR-7114-3p	1,51	1,1	1,33	0,1253	0,8073
20525648	hsa-miR-6842-3p	1,15	0,75	1,32	0,0424	0,779
20503876	hsa-miR-500a-3p	1,05	0,65	1,32	0,0041	0,4941
20525000	hsa-miR-6500-3p	1,18	0,78	1,32	0,0097	0,5514
20504218	hsa-miR-487b-3p	1	0,61	1,32	0,016	0,6455
20505791	hsa-miR-877-5p	2,54	2,14	1,32	0,1368	0,8073
20525740	hsa-miR-6889-3p	1,34	0,94	1,31	0,0462	0,779
20537558	hsa-mir-6814	1,34	0,94	1,31	0,0538	0,779
20505806	hsa-miR-208b-3p	0,82	0,43	1,31	0,1584	0,8312
20534399	hsa-mir-103a-2	1,07	0,68	1,31	0,0383	0,779
20537522	hsa-mir-6779	1,27	0,88	1,31	0,0461	0,779
20534398	hsa-mir-103a-2	1,03	0,64	1,31	0,069	0,779
20500163	hsa-miR-30a-3p	1,13	0,75	1,31	0,0438	0,779
20537044	hsa-mir-4788	1,13	0,75	1,3	0,0081	0,5291
20500748	hsa-miR-141-3p	1,11	0,73	1,3	0,0538	0,779
20507093	hsa-miR-1321	1,11	0,74	1,3	0,1207	0,8045
20535689	hsa-mir-938	1,12	0,75	1,29	0,0282	0,7506
20519617	hsa-miR-4754	1,25	0,88	1,29	0,0081	0,5291
20529142	hsa-miR-7850-5p	1,28	0,92	1,29	0,0024	0,3745
20500190	hsa-miR-103a-2-5p	1,3	0,93	1,29	0,0057	0,5221
20536511	hsa-mir-4291	1,27	0,91	1,29	0,0069	0,5221
20537086	hsa-mir-5094	1	0,63	1,29	0,108	0,8045
20536812	hsa-mir-4532	1,15	0,79	1,29	0,0857	0,7896
20525417	hsa-miR-6727-3p	1,47	1,11	1,29	0,0059	0,5221
20519574	hsa-miR-4731-5p	1,13	0,77	1,28	0,0434	0,779
20519705	hsa-miR-4802-3p	1,12	0,76	1,28	0,0539	0,779
20525426	hsa-miR-6732-5p	8,01	7,65	1,28	0,0137	0,5995
20536205	hsa-mir-548s	1,21	0,85	1,28	0,0695	0,779
20537259	hsa-mir-6086	1,17	0,82	1,28	0,0254	0,7291
20500794	hsa-miR-190a-3p	1,15	0,79	1,28	0,0492	0,779
20534361	hsa-mir-21	1,01	0,66	1,28	0,0058	0,5221
20519519	hsa-miR-4703-5p	1,13	0,78	1,28	0,0543	0,779
20506871	hsa-miR-548h-3p	1,33	0,98	1,28	0,0236	0,7142
20518724	hsa-miR-548z	1,33	0,98	1,28	0,0236	0,7142
20505794	hsa-miR-887-3p	1	0,65	1,28	0,0644	0,779
20525687	hsa-miR-6862-3p	1,43	1,08	1,27	0,1699	0,8399
20501297	hsa-miR-338-3p	1,07	0,72	1,27	0,063	0,779

20525434	hsa-miR-6736-5p	1,5	1,15	1,27	0,0807	0,7895
20537033	hsa-mir-4780	1,1	0,76	1,27	0,0419	0,779
20536433	hsa-mir-4295	1,17	0,82	1,27	0,154	0,8275
20525682	hsa-miR-6769b-3p	1,24	0,9	1,27	0,0208	0,6989
20535412	hsa-mir-654	1,32	0,98	1,27	0,0064	0,5221
20504385	hsa-miR-632	1,11	0,77	1,27	0,0696	0,779
20536473	hsa-mir-4254	1	0,66	1,27	0,1027	0,8045
20537523	hsa-mir-6780a	1,05	0,71	1,27	0,0742	0,779
20503897	hsa-miR-510-5p	1,04	0,71	1,26	0,0062	0,5221
20536446	hsa-mir-4305	1	0,66	1,26	0,144	0,8163
20536226	hsa-mir-3137	1,2	0,86	1,26	0,0207	0,6989
20536729	hsa-mir-4469	1,17	0,84	1,26	0,0799	0,7895
20537997	hsa-mir-7854	1,34	1,01	1,26	0,1771	0,8456
20537458	hsa-mir-6717	1,12	0,8	1,25	0,042	0,779
20535082	hsa-mir-423	1,1	0,77	1,25	0,0115	0,5812
20536910	hsa-mir-4680	0,95	0,63	1,25	0,0027	0,4024
20537272	hsa-mir-6131	1,02	0,7	1,25	0,0114	0,5812
20536663	hsa-mir-548ab	1,2	0,88	1,25	0,1163	0,8045
20518926	hsa-miR-4526	1,05	0,74	1,25	0,0709	0,779
20519509	hsa-miR-4696	1,12	0,8	1,25	0,0818	0,7895
20521803	hsa-miR-548aq-3p	1,22	0,9	1,25	0,0347	0,779
20526865	hsa-miR-7152-3p	0,93	0,61	1,25	0,0062	0,5221
20506022	hsa-miR-297	6,38	6,06	1,25	0,0559	0,779
20535355	hsa-mir-608	1,15	0,84	1,25	0,042	0,779
20518795	hsa-miR-548ac	2,55	2,23	1,25	0,0469	0,779
20522025	hsa-miR-5691	0,99	0,67	1,25	0,0379	0,779
20500713	hsa-let-7g-5p	1,18	0,86	1,25	0,0457	0,779
20536878	hsa-mir-4657	1,35	1,03	1,24	0,1508	0,8268
20515621	hsa-miR-3186-3p	1,05	0,73	1,24	0,0265	0,7383
20519692	hsa-miR-4795-3p	1,05	0,74	1,24	0,0261	0,7363
20518917	hsa-miR-4520a-5p	1	0,69	1,24	0,0133	0,5893
20519557	hsa-miR-4520b-5p	1	0,69	1,24	0,0133	0,5893
20536664	hsa-mir-548ab	1,15	0,84	1,24	0,0142	0,6138
20525022	hsa-miR-6510-3p	0,97	0,66	1,24	0,1032	0,8045
20501275	hsa-miR-330-5p	1,03	0,73	1,24	0,0204	0,6942
20535176	hsa-mir-520c	0,94	0,64	1,24	0,048	0,779
20535799	hsa-mir-1231	0,98	0,67	1,24	0,1386	0,8075
20536039	hsa-mir-2681	1,03	0,73	1,24	0,1628	0,8364
20519662	hsa-miR-4780	1,06	0,76	1,24	0,0284	0,7506
20537999	hsa-mir-7856	0,85	0,55	1,24	0,0666	0,779
20537537	hsa-mir-6794	1,12	0,81	1,23	0,1179	0,8045
20537429	hsa-mir-548ay	1	0,69	1,23	0,0057	0,5221
20537457	hsa-mir-6716	1,09	0,79	1,23	0,0701	0,779
20500112	hsa-let-7a-5p	0,92	0,62	1,23	0,1223	0,8045
20535069	hsa-mir-384	1,12	0,81	1,23	0,0685	0,779
20510800	hsa-miR-1973	0,91	0,61	1,23	0,1028	0,8045
20501155	hsa-miR-194-3p	1,32	1,02	1,23	0,0409	0,779
20506711	hsa-miR-1180-5p	1,58	1,29	1,23	0,0112	0,5812
20518862	hsa-miR-4476	0,91	0,62	1,23	0,0239	0,7163
20500455	hsa-miR-187-3p	1,03	0,73	1,23	0,0091	0,5514
20501298	hsa-miR-339-5p	1,02	0,73	1,22	0,0531	0,779
20536796	hsa-mir-4518	1,19	0,9	1,22	0,1339	0,8073

20517755	hsa-miR-500b-3p	1,07	0,78	1,22	0,0391	0,779
20536759	hsa-mir-4487	1,04	0,75	1,22	0,1087	0,8045
20525437	hsa-miR-6737-3p	1,43	1,14	1,22	0,0217	0,6989
20537065	hsa-mir-5001	1,31	1,03	1,22	0,0521	0,779
20525428	hsa-miR-6733-5p	1,03	0,75	1,22	0,1458	0,8175
20537243	hsa-mir-6070	1,2	0,91	1,22	0,0513	0,779
20519641	hsa-miR-4766-3p	0,92	0,63	1,22	0,0645	0,779
20537496	hsa-mir-6753	1,24	0,95	1,22	0,0235	0,7142
20504578	hsa-miR-449c-3p	0,83	0,55	1,22	0,0408	0,779
20503817	hsa-miR-515-5p	1	0,71	1,22	0,0073	0,5221
20536849	hsa-mir-3977	1	0,72	1,22	0,1112	0,8045
20518936	hsa-miR-378i	1,05	0,77	1,22	0,0703	0,779
20500776	hsa-miR-136-3p	0,93	0,65	1,21	0,0212	0,6989
20536247	hsa-mir-3152	1,03	0,75	1,21	0,0889	0,7913
20515600	hsa-miR-323b-5p	1,05	0,77	1,21	0,156	0,8275
20520352	hsa-miR-5096	1,33	1,05	1,21	0,0924	0,8003
20519528	hsa-miR-4708-3p	0,98	0,7	1,21	0,1134	0,8045
20536767	hsa-mir-4493	1,09	0,81	1,21	0,0434	0,779
20500731	hsa-miR-125b-1-3p	0,9	0,62	1,21	0,0554	0,779
20517950	hsa-miR-3688-3p	1,08	0,8	1,21	0,1957	0,8547
20515605	hsa-miR-3177-5p	1,01	0,73	1,21	0,0516	0,779
20525579	hsa-miR-6809-5p	0,98	0,71	1,21	0,0114	0,5812
20535835	hsa-mir-1297	1,05	0,77	1,21	0,1209	0,8045
20535912	hsa-mir-1283-2	1	0,72	1,21	0,06	0,779
20534402	hsa-mir-105-1	1,17	0,9	1,21	0,0065	0,5221
20534403	hsa-mir-105-2	1,17	0,9	1,21	0,0065	0,5221
20537430	hsa-mir-6500	1,02	0,74	1,21	0,0367	0,779
20500425	hsa-miR-30d-3p	0,94	0,67	1,21	0,0838	0,7896
20519569	hsa-miR-4727-3p	1,28	1,01	1,21	0,1266	0,8073
20536743	hsa-mir-548x-2	1,01	0,73	1,21	0,0232	0,7142
20519424	hsa-miR-4645-3p	0,94	0,67	1,21	0,0435	0,779
20534860	hsa-mir-382	1,06	0,79	1,21	0,0954	0,8045
20535159	hsa-mir-515-1	1,16	0,89	1,21	0,0666	0,779
20535163	hsa-mir-515-2	1,16	0,89	1,21	0,0666	0,779
20504276	hsa-miR-556-5p	0,83	0,56	1,21	0,0064	0,5221
20536690	hsa-mir-548ae-2	1	0,73	1,21	0,0372	0,779
20529764	hsa-miR-8054	0,88	0,61	1,2	0,0301	0,7652
20501201	hsa-miR-362-5p	0,93	0,66	1,2	0,0484	0,779
20504343	hsa-miR-603	1,12	0,86	1,2	0,0335	0,779
20529784	hsa-miR-8074	1,08	0,81	1,2	0,0811	0,7895
20534814	hsa-mir-200a	1,06	0,8	1,2	0,0586	0,779
20536584	hsa-mir-3681	1,03	0,77	1,2	0,022	0,7003
20535896	hsa-mir-1276	1,05	0,79	1,2	0,0926	0,8003
20535756	hsa-mir-1178	0,98	0,72	1,2	0,0356	0,779
20504333	hsa-miR-596	1,03	0,77	1,2	0,0413	0,779
20525419	hsa-miR-6728-3p	1	0,74	1,2	0,0902	0,7959
20519652	hsa-miR-4774-5p	0,91	0,66	1,2	0,0077	0,5221
20536276	hsa-mir-3168	0,82	0,56	1,2	0,0597	0,779
20537993	hsa-mir-7850	1,34	1,08	1,2	0,0591	0,779
20501245	hsa-miR-379-3p	1,1	0,84	1,19	0,07	0,779
20501294	hsa-miR-324-5p	1,16	0,9	1,19	0,0201	0,6942
20517902	hsa-miR-3651	0,92	0,66	1,19	0,1054	0,8045

20506878	hsa-miR-548p	1,02	0,77	1,19	0,0015	0,3473
20517933	hsa-miR-3677-3p	1	0,75	1,19	0,0328	0,779
20535668	hsa-mir-877	1,09	0,84	1,19	0,0627	0,779
20537568	hsa-mir-6824	1,02	0,77	1,19	0,0434	0,779
20509231	hsa-miR-1911-3p	1,02	0,76	1,19	0,0712	0,779
20518921	hsa-miR-4522	0,98	0,73	1,19	0,1441	0,8163
20506855	hsa-miR-1261	1,03	0,78	1,19	0,0883	0,7896
20520328	hsa-miR-5089-3p	0,96	0,71	1,19	0,1201	0,8045
20503098	hsa-miR-376b-5p	0,87	0,62	1,19	0,0051	0,5221
20517928	hsa-miR-3673	1,05	0,8	1,19	0,0382	0,779
20518429	hsa-miR-3908	1,05	0,8	1,19	0,0169	0,6662
20506820	hsa-miR-548k	0,99	0,74	1,19	0,0326	0,779
20518803	hsa-miR-548ad	0,84	0,6	1,19	0,0769	0,7865
20501173	hsa-miR-299-3p	0,99	0,74	1,19	0,1286	0,8073
20525538	hsa-miR-6788-3p	1,09	0,84	1,19	0,1403	0,8094
20525678	hsa-miR-6858-3p	1,21	0,97	1,19	0,0687	0,779
20535666	hsa-mir-744	0,99	0,75	1,19	0,0571	0,779
20515598	hsa-miR-3173-3p	1,05	0,81	1,18	0,0015	0,3473
20535367	hsa-mir-619	1,29	1,04	1,18	0,0678	0,779
20518796	hsa-miR-4424	1,02	0,77	1,18	0,1504	0,8268
20536906	hsa-mir-4679-1	0,94	0,7	1,18	0,0398	0,779
20537043	hsa-mir-4787	1,25	1	1,18	0,0736	0,779
20503894	hsa-miR-508-3p	0,94	0,7	1,18	0,1727	0,8403
20503095	hsa-miR-412-3p	0,93	0,69	1,18	0,1148	0,8045
20536605	hsa-mir-3909	0,91	0,67	1,18	0,1908	0,8542
20536225	hsa-mir-544b	1,03	0,79	1,18	0,1287	0,8073
20525696	hsa-miR-6867-3p	1,03	0,79	1,18	0,1031	0,8045
20525631	hsa-miR-6835-5p	1,22	0,98	1,18	0,1085	0,8045
20535328	hsa-mir-587	0,91	0,67	1,18	0,1028	0,8045
20537034	hsa-mir-4436b-1	1,02	0,78	1,18	0,0251	0,7264
20537140	hsa-mir-4436b-2	1,02	0,78	1,18	0,0251	0,7264
20515581	hsa-miR-3159	0,97	0,73	1,18	0,0428	0,779
20536929	hsa-mir-4698	1,13	0,89	1,18	0,1623	0,8356
20506883	hsa-miR-1282	0,93	0,7	1,18	0,0073	0,5221
20535845	hsa-mir-1302-8	0,86	0,62	1,18	0,0389	0,779
20515597	hsa-miR-3173-5p	1,07	0,83	1,18	0,0783	0,7886
20515541	hsa-miR-3136-3p	0,95	0,71	1,18	0,1659	0,8375
20536820	hsa-mir-548an	0,96	0,73	1,18	0,1197	0,8045
20500453	hsa-miR-183-3p	0,96	0,72	1,18	0,1656	0,8375
20536324	hsa-mir-3199-2	1,06	0,82	1,18	0,0691	0,779
20515527	hsa-miR-3127-3p	0,82	0,59	1,18	0,0776	0,7886
20500174	hsa-miR-93-3p	1,13	0,9	1,17	0,1126	0,8045
20503815	hsa-miR-498	1,34	1,1	1,17	0,1555	0,8275
20536658	hsa-mir-548aa-1	0,99	0,76	1,17	0,0528	0,779
20504554	hsa-miR-668-5p	2,3	2,07	1,17	0,191	0,8543
20536316	hsa-mir-548x	1,11	0,88	1,17	0,0127	0,5886
20537640	hsa-mir-6894	1	0,77	1,17	0,1396	0,8082
20536683	hsa-mir-4432	1,23	1	1,17	0,067	0,779
20520218	hsa-miR-5010-5p	1,05	0,82	1,17	0,1588	0,8312
20520213	hsa-miR-548ap-3p	1,2	0,97	1,17	0,195	0,8547
20504566	hsa-miR-1468-5p	0,99	0,76	1,17	0,1536	0,8275
20505793	hsa-miR-887-5p	0,95	0,73	1,17	0,0734	0,779

20536573	hsa-mir-3669	1,02	0,79	1,17	0,1505	0,8268
20536732	hsa-mir-4472-1	0,96	0,74	1,17	0,161	0,8349
20536285	hsa-mir-3174	0,85	0,62	1,17	0,1189	0,8045
20535834	hsa-mir-1295a	0,98	0,76	1,17	0,0217	0,6989
20507092	hsa-miR-513c-3p	0,97	0,75	1,17	0,1557	0,8275
20522043	hsa-miR-5706	0,88	0,66	1,16	0,1708	0,8399
20501230	hsa-miR-371a-3p	1,14	0,92	1,16	0,0216	0,6989
20517756	hsa-miR-4328	0,91	0,69	1,16	0,0368	0,779
20519579	hsa-miR-4733-3p	1	0,78	1,16	0,0218	0,6989
20536189	hsa-mir-3116-2	0,98	0,76	1,16	0,0732	0,779
20537579	hsa-mir-6835	0,91	0,7	1,16	0,1318	0,8073
20535327	hsa-mir-586	0,85	0,64	1,16	0,0509	0,779
20522991	hsa-miR-1199-3p	0,9	0,68	1,16	0,0362	0,779
20535135	hsa-mir-486	1,02	0,81	1,16	0,112	0,8045
20507946	hsa-miR-103b	0,97	0,76	1,16	0,0583	0,779
20535102	hsa-mir-450a-1	1,11	0,9	1,16	0,0673	0,779
20525477	hsa-miR-6758-5p	1,15	0,94	1,16	0,1322	0,8073
20535906	hsa-mir-548i-4	1,01	0,8	1,16	0,0526	0,779
20525008	hsa-miR-6503-3p	0,88	0,67	1,16	0,1942	0,8547
20536954	hsa-mir-4720	1,02	0,81	1,16	0,1973	0,8547
20535261	hsa-mir-487b	0,92	0,71	1,16	0,0118	0,5876
20535197	hsa-mir-519a-1	0,92	0,71	1,16	0,1119	0,8045
20535101	hsa-mir-450a-1	1,1	0,89	1,16	0,061	0,779
20535641	hsa-mir-890	1,03	0,82	1,15	0,0554	0,779
20517672	hsa-miR-4295	0,86	0,66	1,15	0,0267	0,7383
20524996	hsa-miR-6499-3p	0,91	0,7	1,15	0,0018	0,3576
20518720	hsa-miR-642b-5p	0,99	0,78	1,15	0,1343	0,8073
20536590	hsa-mir-3687	1,1	0,89	1,15	0,0776	0,7886
20521823	hsa-miR-5584-3p	1,14	0,94	1,15	0,1206	0,8045
20535136	hsa-mir-486	1,06	0,86	1,15	0,0095	0,5514
20501158	hsa-miR-106b-3p	0,88	0,67	1,15	0,04	0,779
20519667	hsa-miR-4782-5p	0,85	0,65	1,15	0,063	0,779
20536753	hsa-mir-4481	0,89	0,69	1,15	0,1865	0,8493
20515625	hsa-miR-3189-5p	1,22	1,01	1,15	0,1612	0,8349
20519501	hsa-miR-4691-3p	1,12	0,92	1,15	0,033	0,779
20502122	hsa-miR-422a	0,98	0,78	1,15	0,0714	0,779
20525726	hsa-miR-6882-3p	0,87	0,66	1,15	0,1011	0,8045
20502236	hsa-miR-18b-3p	0,94	0,74	1,15	0,0011	0,3242
20537428	hsa-mir-6499	1,1	0,9	1,15	0,1662	0,8375
20535903	hsa-mir-548i-2	1,07	0,88	1,15	0,0166	0,6642
20500716	hsa-let-7i-3p	0,88	0,68	1,15	0,0924	0,8003
20501295	hsa-miR-324-3p	1,55	1,35	1,15	0,1277	0,8073
20536261	hsa-mir-3159	0,98	0,78	1,15	0,0455	0,779
20537601	hsa-mir-6856	1,02	0,82	1,15	0,1059	0,8045
20519426	hsa-miR-4646-3p	0,94	0,75	1,15	0,1209	0,8045
20517741	hsa-miR-4282	0,97	0,77	1,15	0,1174	0,8045
20520217	hsa-miR-5009-3p	1,03	0,84	1,14	0,0997	0,8045
20517926	hsa-miR-3671	0,9	0,71	1,14	0,1312	0,8073
20517707	hsa-miR-4258	1,59	1,39	1,14	0,0139	0,6068
20535806	hsa-mir-1202	0,89	0,7	1,14	0,0274	0,7439
20503791	hsa-miR-511-5p	0,72	0,53	1,14	0,0641	0,779
20536583	hsa-mir-3680-1	0,84	0,65	1,14	0,1696	0,8399

20537143	hsa-mir-3680-2	0,84	0,65	1,14	0,1696	0,8399
20536730	hsa-mir-4470	1,06	0,87	1,14	0,137	0,8073
20500132	hsa-miR-18a-5p	0,96	0,77	1,14	0,186	0,8493
20537980	hsa-mir-7705	0,85	0,66	1,14	0,0618	0,779
20504270	hsa-miR-552-3p	0,9	0,71	1,14	0,1654	0,8375
20504576	hsa-miR-1185-2-3p	0,92	0,73	1,14	0,0744	0,779
20506890	hsa-miR-1252-3p	0,9	0,71	1,14	0,0927	0,8003
20534843	hsa-mir-302d	0,89	0,7	1,14	0,1568	0,8275
20536975	hsa-mir-3064	0,88	0,69	1,14	0,1422	0,8127
20518822	hsa-miR-4446-5p	1,02	0,83	1,14	0,0642	0,779
20500141	hsa-miR-21-5p	0,8	0,61	1,14	0,071	0,779
20535189	hsa-mir-518a-1	0,93	0,74	1,14	0,0856	0,7896
20506013	hsa-miR-942-5p	0,9	0,71	1,14	0,1696	0,8399
20537870	hsa-mir-7154	0,91	0,73	1,14	0,0196	0,6942
20525556	hsa-miR-6797-3p	1,17	0,98	1,14	0,0837	0,7896
20535675	hsa-mir-301b	0,93	0,75	1,14	0,0877	0,7896
20503811	hsa-miR-181d-5p	1,02	0,83	1,14	0,065	0,779
20525620	hsa-miR-6829-3p	1,04	0,85	1,13	0,1801	0,8493
20522031	hsa-miR-5696	0,83	0,65	1,13	0,0775	0,7886
20525438	hsa-miR-6738-5p	0,98	0,8	1,13	0,0058	0,5221
20535420	hsa-mir-421	0,9	0,72	1,13	0,1004	0,8045
20536741	hsa-mir-4478	0,93	0,75	1,13	0,0967	0,8045
20537852	hsa-mir-7112-1	0,88	0,7	1,13	0,1987	0,8547
20538091	hsa-mir-7112-2	0,88	0,7	1,13	0,1987	0,8547
20505796	hsa-miR-873-5p	0,85	0,67	1,13	0,0383	0,779
20502437	hsa-miR-431-5p	0,83	0,65	1,13	0,1811	0,8493
20518947	hsa-miR-4540	0,81	0,64	1,13	0,1977	0,8547
20517737	hsa-miR-4277	0,73	0,55	1,13	0,1283	0,8073
20502126	hsa-miR-424-3p	0,97	0,8	1,13	0,0928	0,8003
20506854	hsa-miR-548g-3p	0,93	0,76	1,13	0,0674	0,779
20504216	hsa-miR-376a-2-5p	0,81	0,63	1,13	0,0826	0,7896
20504421	hsa-miR-654-3p	0,82	0,64	1,13	0,1529	0,8275
20521814	hsa-miR-5581-5p	0,87	0,7	1,13	0,1542	0,8275
20500730	hsa-miR-125b-5p	0,86	0,69	1,13	0,0218	0,6989
20534848	hsa-mir-371a	0,91	0,73	1,13	0,1643	0,8375
20536485	hsa-mir-4268	0,93	0,76	1,13	0,0979	0,8045
20519653	hsa-miR-4774-3p	0,94	0,77	1,13	0,1085	0,8045
20504325	hsa-miR-550a-3p	0,92	0,75	1,12	0,0595	0,779
20537068	hsa-mir-5004	0,89	0,72	1,12	0,0868	0,7896
20536635	hsa-mir-676	0,87	0,7	1,12	0,0099	0,5539
20518873	hsa-miR-4480	0,8	0,63	1,12	0,0507	0,779
20519639	hsa-miR-4765	0,96	0,79	1,12	0,0074	0,5221
20502360	hsa-miR-429	0,97	0,8	1,12	0,0183	0,6778
20500116	hsa-let-7b-3p	1,03	0,86	1,12	0,1484	0,8253
20536779	hsa-mir-4504	0,93	0,77	1,12	0,1022	0,8045
20537150	hsa-mir-5579	0,89	0,73	1,12	0,1097	0,8045
20535640	hsa-mir-874	1,23	1,06	1,12	0,1778	0,8456
20506861	hsa-miR-548o-3p	0,69	0,53	1,12	0,0113	0,5812
20535440	hsa-mir-320b-1	1,03	0,86	1,12	0,1199	0,8045
20535354	hsa-mir-607	0,97	0,81	1,12	0,0824	0,7896
20520208	hsa-miR-5006-5p	1,31	1,15	1,12	0,072	0,779
20518451	hsa-miR-3925-5p	1,04	0,88	1,12	0,0969	0,8045

20535443	hsa-mir-1296	0,87	0,71	1,12	0,1603	0,8349
20504352	hsa-miR-611	0,93	0,77	1,12	0,1001	0,8045
20535927	hsa-mir-1197	0,87	0,71	1,12	0,1197	0,8045
20519428	hsa-miR-4648	1,08	0,92	1,12	0,0829	0,7896
20537060	hsa-mir-4802	0,84	0,68	1,12	0,1558	0,8275
20536873	hsa-mir-4652	0,84	0,68	1,12	0,0984	0,8045
20525650	hsa-miR-6844	0,79	0,63	1,12	0,0993	0,8045
20535907	hsa-mir-548i-4	1,01	0,85	1,12	0,1052	0,8045
20500168	hsa-miR-33a-5p	0,94	0,79	1,12	0,107	0,8045
20525643	hsa-miR-6840-5p	1,17	1,02	1,12	0,1978	0,8547
20520565	hsa-miR-5187-5p	1	0,85	1,12	0,1564	0,8275
20520330	hsa-miR-5091	0,82	0,66	1,12	0,1662	0,8375
20500143	hsa-miR-22-5p	0,89	0,73	1,11	0,0884	0,7896
20536804	hsa-mir-4524a	0,9	0,75	1,11	0,0284	0,7506
20505749	hsa-miR-888-5p	1,03	0,87	1,11	0,1487	0,8253
20519605	hsa-miR-4747-3p	1	0,84	1,11	0,1881	0,8493
20517692	hsa-miR-4312	0,91	0,76	1,11	0,1077	0,8045
20525433	hsa-miR-6735-3p	1,16	1	1,11	0,0464	0,779
20525725	hsa-miR-6882-5p	0,81	0,65	1,11	0,1187	0,8045
20521841	hsa-miR-5591-3p	1,03	0,87	1,11	0,1075	0,8045
20536764	hsa-mir-4490	1,21	1,06	1,11	0,0901	0,7959
20500758	hsa-miR-152-3p	0,82	0,67	1,11	0,0969	0,8045
20536936	hsa-mir-4705	0,95	0,8	1,11	0,0422	0,779
20535939	hsa-mir-320c-2	1,04	0,88	1,11	0,0938	0,8003
20503867	hsa-miR-522-3p	0,93	0,78	1,11	0,1271	0,8073
20536445	hsa-mir-4303	0,92	0,77	1,11	0,1917	0,8543
20502440	hsa-miR-433-5p	0,92	0,77	1,11	0,1991	0,8547
20525590	hsa-miR-6814-3p	0,87	0,72	1,11	0,1386	0,8075
20537130	hsa-mir-5188	0,91	0,76	1,11	0,0125	0,5886
20535109	hsa-mir-433	0,95	0,81	1,11	0,1504	0,8268
20525689	hsa-miR-6864-5p	1	0,85	1,11	0,1836	0,8493
20500789	hsa-miR-186-5p	0,84	0,69	1,11	0,0735	0,779
20500769	hsa-miR-126-3p	0,73	0,58	1,11	0,1553	0,8275
20525672	hsa-miR-6855-3p	0,94	0,8	1,1	0,1944	0,8547
20501311	hsa-miR-325	1	0,86	1,1	0,1716	0,8403
20500170	hsa-miR-92a-1-5p	1	0,86	1,1	0,1953	0,8547
20535215	hsa-mir-506	0,96	0,82	1,1	0,1884	0,8493
20525691	hsa-miR-6865-5p	1,52	1,38	1,1	0,2	0,8547
20536863	hsa-mir-4643	0,86	0,72	1,1	0,036	0,779
20500722	hsa-miR-27b-5p	1,18	1,04	1,1	0,1795	0,8493
20537479	hsa-mir-6735	1,01	0,87	1,1	0,1893	0,8499
20506005	hsa-miR-936	0,99	0,85	1,1	0,1941	0,8547
20524051	hsa-miR-6130	0,96	0,82	1,1	0,1866	0,8493
20515511	hsa-miR-3117-3p	1,08	0,94	1,1	0,1971	0,8547
20525588	hsa-miR-6813-3p	1,3	1,17	1,1	0,0201	0,6942
20536281	hsa-mir-1193	0,89	0,75	1,1	0,0761	0,7833
20536631	hsa-mir-3925	0,8	0,66	1,1	0,1842	0,8493
20517917	hsa-miR-3664-5p	0,75	0,62	1,1	0,189	0,8493
20519647	hsa-miR-4770	0,81	0,68	1,1	0,1073	0,8045
20535296	hsa-mir-555	0,89	0,76	1,1	0,0265	0,7383
20519559	hsa-miR-4723-5p	0,97	0,83	1,1	0,1962	0,8547
20517832	hsa-miR-23c	0,97	0,84	1,1	0,0632	0,779

20518797	hsa-miR-4425	0,76	0,63	1,1	0,0066	0,5221
20519606	hsa-miR-4748	0,91	0,78	1,1	0,0682	0,779
20536320	hsa-mir-3199-1	0,86	0,72	1,1	0,1818	0,8493
20535922	hsa-mir-513b	0,99	0,86	1,1	0,0817	0,7895
20535322	hsa-mir-582	0,99	0,86	1,1	0,0809	0,7895
20536771	hsa-mir-4497	0,95	0,82	1,09	0,0482	0,779
20534618	hsa-mir-127	0,92	0,79	1,09	0,1393	0,8081
20519445	hsa-miR-4659a-3p	0,85	0,72	1,09	0,1876	0,8493
20500442	hsa-miR-34a-5p	0,78	0,65	1,09	0,1443	0,8163
20519578	hsa-miR-4733-5p	1,12	0,99	1,09	0,0247	0,7241
20536710	hsa-mir-4453	1,54	1,41	1,09	0,1327	0,8073
20500154	hsa-miR-26b-5p	0,82	0,7	1,09	0,1838	0,8493
20521811	hsa-miR-664b-3p	1,11	0,98	1,09	0,0799	0,7895
20518459	hsa-miR-3928-3p	0,77	0,64	1,09	0,1464	0,8179
20529787	hsa-miR-8077	0,88	0,75	1,09	0,031	0,7732
20535167	hsa-mir-519b	0,82	0,69	1,09	0,1173	0,8045
20505800	hsa-miR-374b-3p	0,8	0,68	1,09	0,1691	0,8399
20535199	hsa-mir-516a-1	0,87	0,75	1,09	0,1274	0,8073
20535200	hsa-mir-516a-2	0,87	0,75	1,09	0,1274	0,8073
20519676	hsa-miR-2467-3p	0,94	0,82	1,09	0,1951	0,8547
20503809	hsa-miR-497-5p	0,65	0,53	1,09	0,0114	0,5812
20537506	hsa-mir-6763	0,97	0,85	1,09	0,0729	0,779
20536892	hsa-mir-4667	1,01	0,89	1,09	0,1493	0,8264
20500472	hsa-miR-214-3p	0,75	0,63	1,09	0,0615	0,779
20519534	hsa-miR-4711-5p	0,86	0,73	1,09	0,0686	0,779
20535938	hsa-mir-320c-2	1	0,88	1,08	0,1994	0,8547
20500169	hsa-miR-33a-3p	0,9	0,78	1,08	0,1092	0,8045
20525445	hsa-miR-6741-3p	1,01	0,9	1,08	0,052	0,779
20517688	hsa-miR-4307	0,77	0,66	1,08	0,1639	0,8375
20534376	hsa-mir-29a	0,89	0,77	1,08	0,0246	0,724
20535873	hsa-mir-1260a	1,09	0,97	1,08	0,1988	0,8547
20535373	hsa-mir-625	0,94	0,83	1,08	0,1674	0,8398
20535315	hsa-mir-575	0,85	0,73	1,08	0,0725	0,779
20535854	hsa-mir-548f-4	0,99	0,87	1,08	0,1294	0,8073
20503807	hsa-miR-193b-5p	0,8	0,69	1,08	0,1105	0,8045
20536909	hsa-mir-4679-2	0,82	0,7	1,08	0,1187	0,8045
20534538	hsa-mir-221	0,85	0,74	1,08	0,0291	0,7588
20535855	hsa-mir-548f-4	0,86	0,75	1,08	0,1367	0,8073
20502438	hsa-miR-431-3p	0,7	0,59	1,08	0,131	0,8073
20535574	hsa-mir-765	0,9	0,79	1,08	0,183	0,8493
20519538	hsa-miR-4713-5p	1,02	0,91	1,08	0,1252	0,8073
20537494	hsa-mir-6751	1,01	0,9	1,08	0,197	0,8547
20525005	hsa-miR-6502-5p	0,8	0,69	1,08	0,1974	0,8547
20525466	hsa-miR-6752-3p	1,17	1,06	1,08	0,0097	0,5514
20518838	hsa-miR-4458	0,85	0,75	1,08	0,0687	0,779
20526884	hsa-miR-7162-5p	0,6	0,49	1,08	0,1889	0,8493
20500117	hsa-let-7c-5p	0,92	0,82	1,08	0,124	0,8073
20537221	hsa-mir-5699	1,02	0,92	1,08	0,1961	0,8547
20519686	hsa-miR-4791	0,84	0,74	1,07	0,0254	0,7291
20518823	hsa-miR-4446-3p	1,17	1,07	1,07	0,0391	0,779
20500468	hsa-miR-212-5p	1,26	1,16	1,07	0,1388	0,8078
20501771	hsa-miR-196b-5p	0,94	0,84	1,07	0,1121	0,8045

20534829	hsa-mir-26a-2	0,79	0,69	1,07	0,18	0,8493
20536234	hsa-mir-3142	0,69	0,59	1,07	0,08	0,7895
20500737	hsa-miR-132-3p	0,83	0,73	1,07	0,0712	0,779
20525397	hsa-miR-892c-5p	0,72	0,63	1,06	0,0273	0,7437
20536297	hsa-mir-3181	0,77	0,69	1,06	0,021	0,6989
20536540	hsa-mir-3615	0,84	0,75	1,06	0,0333	0,779
20515569	hsa-miR-3152-3p	0,87	0,79	1,06	0,1963	0,8547
20536561	hsa-mir-3657	0,97	0,89	1,06	0,0567	0,779
20519076	hsa-miR-3974	0,79	0,71	1,06	0,1751	0,843
20500149	hsa-miR-24-2-5p	0,86	0,78	1,06	0,1577	0,83
20536939	hsa-mir-4708	0,89	0,81	1,05	0,0736	0,779
20534531	hsa-mir-214	0,82	0,75	1,05	0,0734	0,779
20525660	hsa-miR-6849-3p	0,74	0,67	1,05	0,052	0,779
20522020	hsa-miR-5687	0,77	0,7	1,05	0,1261	0,8073
20520201	hsa-miR-5002-3p	0,91	0,84	1,05	0,1114	0,8045
20525431	hsa-miR-6734-3p	0,89	0,82	1,05	0,1617	0,8349
20534570	hsa-mir-15b	0,72	0,65	1,05	0,1613	0,8349
20536267	hsa-mir-3160-2	0,9	0,83	1,05	0,1129	0,8045
20525605	hsa-miR-6822-5p	0,67	0,6	1,05	0,1426	0,8127
20536688	hsa-mir-4437	0,81	0,74	1,05	0,1861	0,8493
20526877	hsa-miR-7158-3p	0,67	0,61	1,04	0,1826	0,8493
20519590	hsa-miR-4740-5p	0,78	0,72	1,04	0,1151	0,8045
20537463	hsa-mir-6721	0,74	0,68	1,04	0,1351	0,8073
20537443	hsa-mir-6512	1,28	1,22	1,04	0,0749	0,7801
20505744	hsa-miR-450b-3p	0,73	0,67	1,04	0,0297	0,7649
20536617	hsa-mir-3916	0,95	0,9	1,04	0,0658	0,779
20534626	hsa-mir-154	0,88	0,83	1,04	0,1509	0,8268
20519644	hsa-miR-4768-3p	0,71	0,65	1,04	0,0103	0,563
20534480	hsa-mir-197	1,03	0,98	1,04	0,0988	0,8045
20501162	hsa-miR-200a-5p	1,04	0,99	1,04	0,1912	0,8543
20504592	hsa-miR-2113	0,85	0,8	1,03	0,0801	0,7895
20525436	hsa-miR-6737-5p	1,01	0,96	1,03	0,0791	0,7895
20537163	hsa-mir-548au	0,89	0,84	1,03	0,0695	0,779
20525393	hsa-miR-6722-5p	0,99	0,95	1,03	0,074	0,779
20519439	hsa-miR-4655-5p	1,21	1,16	1,03	0,1638	0,8375
20522012	hsa-miR-5681a	1	0,96	1,03	0,1202	0,8045
20536321	hsa-mir-3199-1	0,84	0,8	1,03	0,0828	0,7896
20522044	hsa-miR-5707	0,66	0,62	1,03	0,0958	0,8045
20536734	hsa-mir-4474	0,88	0,85	1,03	0,1474	0,8209
20517943	hsa-miR-3682-3p	0,85	0,82	1,03	0,1948	0,8547
20504376	hsa-miR-627-3p	0,67	0,64	1,02	0,0577	0,779
20525470	hsa-miR-6754-3p	1,7	1,66	1,02	0,1885	0,8493
20537582	hsa-mir-6837	0,8	0,77	1,02	0,0275	0,7451
20521826	hsa-miR-5586-5p	0,81	0,78	1,02	0,03	0,7649
20537874	hsa-mir-7158	0,77	0,74	1,02	0,0343	0,779
20519658	hsa-miR-4777-3p	0,81	0,78	1,02	0,0806	0,7895
20536233	hsa-mir-3142	0,71	0,68	1,02	0,1279	0,8073
20500479	hsa-miR-218-1-3p	0,79	0,77	1,02	0,1867	0,8493
20536533	hsa-mir-3606	0,74	0,72	1,01	0,0076	0,5221
20519708	hsa-miR-4804-3p	0,7	0,69	1,01	0,1919	0,8543
20536301	hsa-mir-3185	1,18	1,16	1,01	0,1294	0,8073
20519458	hsa-miR-4665-3p	0,77	0,75	1,01	0,131	0,8073

20536819	hsa-mir-4536-1	0,9	0,88	1,01	0,1292	0,8073
20501159	hsa-miR-29c-5p	0,69	0,68	1,01	0,1216	0,8045
20537491	hsa-mir-6748	0,78	0,77	1,01	0,0673	0,779
20534496	hsa-mir-129-1	0,83	0,82	1,01	0,1055	0,8045
20536675	hsa-mir-4425	0,8	0,79	1,01	0,1684	0,8399
20529128	hsa-miR-7843-5p	0,76	0,76	1,01	0,152	0,8275
20525500	hsa-miR-6769a-3p	0,79	0,79	1	0,1941	0,8547
20506888	hsa-miR-1292-3p	0,97	0,96	1	0,1233	0,8045
20505752	hsa-miR-541-5p	0,85	0,85	1	0,1841	0,8493
20536307	hsa-mir-3189	0,7	0,69	1	0,1214	0,8045
20518942	hsa-miR-4536-3p	0,73	0,73	1	0,1769	0,8456
20506812	hsa-miR-1285-5p	0,67	0,67	1	0,1056	0,8045

Para la obtención de una lista de miRNAs se utilizaron los siguientes criterios de selección: valor $p < 0,2$ y $FC > 0$.

Tabla suplementaria 6: Resultados correspondientes al análisis de la expresión de los 21 miRNAs candidatos originales en muestras de plasma correspondientes a la cohorte exploratoria.

**GSE113234: Microarreglo de expresión en plasma, VS=27
CaP=27**

miRNA	Resultado	Valor p
hsa-miR-3613-3p	No da diferencias significativas	0,4094
hsa-miR-2277-5p	No da diferencias significativas	0,2967
hsa-miR-4532	No da diferencias significativas	0,9633
hsa-miR-101-3p	No da diferencias significativas	0,7969
hsa-miR-548x-3p	No da diferencias significativas	0,2558
hsa-miR-4668-5p	No da diferencias significativas	0,6679
hsa-miR-320e	Disminuido en CaP	2,34E-03
hsa-miR-21-5p	No da diferencias significativas	0,0568
hsa-miR-5095	No está en el set de datos	
hsa-miR-3174	No da diferencias significativas	0,0935
hsa-miR-1197	No da diferencias significativas	0,6401
hsa-miR-92a-1-5p	Disminuido en CaP	0,0143
hsa-miR-181d-5p	No está en el set de datos	
hsa-miR-552-3p	No está en el set de datos	
hsa-miR-190a-3p	No está en el set de datos	
hsa-miR-214-3p	Disminuido en CaP	2,80E-03

hsa-miR-23c	No da diferencias significativas	0,3184
hsa-miR-324-3p	No da diferencias significativas	6,13E-01
let-7c-5p	No está en el set de datos	
let-7a-5p	No da diferencias significativas	5,68E-02

La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Wilcoxon o de la mediana, según correspondiera.

Tabla suplementaria 7: Resultados correspondientes al análisis de la expresión de los 21 miRNAs candidatos originales en muestras de suero correspondientes a la cohorte exploratoria.

GSE112264: Secuenciación en suero, VS=282 CaP=282

miRNA	Resultado	Valor p
hsa-miR-3613-3p	No da diferencias significativas	0,4002
hsa-miR-2277-5p	No da diferencias significativas	0,7628
hsa-miR-4532	Aumentado en CaP	0,01249
hsa-miR-101-3p	Aumentado en CaP	0,0041
hsa-miR-548x-3p	No da diferencias significativas	0,3997
hsa-miR-4668-5p	Aumentado en CaP	0,01721
hsa-miR-320e	Aumentado en CaP	9,44E-20
hsa-miR-21-5p	Disminuido en CaP	0,0004136
hsa-miR-5095	Aumentado en CaP	1,19E-05
hsa-miR-3174	No da diferencias significativas	0,5073
hsa-miR-1197	No da diferencias significativas	0,1296
hsa-miR-92a-1-5p	No da diferencias significativas	0,08783
hsa-miR-181d-5p	No da diferencias significativas	0,9681
hsa-miR-552-3p	No da diferencias significativas	0,07811
hsa-miR-190a-3p	No da diferencias significativas	0,7266
hsa-miR-214-3p	Aumentado en CaP	4,35E-07
hsa-miR-23c	No da diferencias significativas	0,08697
hsa-miR-324-3p	Aumentado en CaP	1,50E-12
let-7c-5p	No da diferencias significativas	0,1522
let-7a-5p	Aumentado en CaP	4,00E-04

La significancia estadística utilizada fue del 5% y se analizaron los datos utilizando prueba-T, test de Wilcoxon o de la mediana, según correspondiera.

REFERENCIAS

- Abd El-Maqsoud, N. M. R., Osman, N. A. A., El-Hamid, A. M. A., El-Baba, T. K. F., & Galal, E. M. (2015). GOLPH3 and YB-1 are novel markers correlating with poor prognosis in prostate cancer. *World Journal of Oncology*, 6(6), 473–484. <https://doi.org/10.14740/wjon952w>
- Albala, D., Kemeter, M. J., Febbo, P. G., Lu, R., John, V., Stoy, D., Denes, B., Mccall, M., Shindel, A. W., & Dubeck, F. (2016). Health Economic Impact and. *Rev Urol*, 18(3), 123–132. <https://doi.org/10.3909/riu0725>
- Ambrosini, G. L., Fritschi, L., de Klerk, N. H., Mackerras, D., & Leavy, J. (2008). Dietary Patterns Identified Using Factor Analysis and Prostate Cancer Risk: A Case Control Study in Western Australia. *Annals of Epidemiology*, 18(5), 364–370. <https://doi.org/10.1016/j.annepidem.2007.11.010>
- Andersson, S.-O., Wolk, A., Bergstrom, R., Hans-Olov, A., Goran, E., Englund, A., & Nyren, O. (2012). Body Size and Prostate Cancer : a 20-Year Follow-up Study Among 135 006 Swedish Construction Workers Hans-Olov Adami , Go Engholm , Anders Englund , Olof Nyre ´ n * Background : Obesity is associated with Follow-up Cohort Results The age-adjusted RRs by d. *Journal of the National Cancer Institute*, 89(5), 385–389.
- Antognelli, C., Cecchetti, R., Riuzzi, F., Peirce, M. J., & Talesa, V. N. (2018). Glyoxalase 1 sustains the metastatic phenotype of prostate cancer cells via EMT control. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(5), 2865–2883. <https://doi.org/10.1111/jcmm.13581>

- Askari, F., Parizi, M. K., Jessri, M., & Rashidkhani, B. (2014). Fruit and vegetable intake in relation to prostate cancer in Iranian men: A case-control study. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(13), 5223–5227. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.13.5223>
- Bartholow, T. L., Chandran, U. R., Becich, M. J., & Parwani, A. V. (2011). Immunohistochemical staining of radixin and moesin in prostatic adenocarcinoma. *BMC Clinical Pathology*, 11(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1472-6890-11-1>
- Bauman, G., Breau, R. H., Kamel-Reid, S., Louie, A. V., & Pautlere, S. (2017). Ontario health technology assessment series: Prolaris cell cycle progression test for localized prostate cancer: A health technology assessment. *Ontario Health Technology Assessment Series*, 17(6), 1–75.
- Bello-DeOcampo, D., Kleinman, H. K., Deocampo, N. D., & Webber, M. M. (2001). Laminin-1 and $\alpha 6\beta 1$ integrin regulate acinar morphogenesis of normal and malignant human prostate epithelial cells. *Prostate*, 46(2), 142–153. [https://doi.org/10.1002/1097-0045\(20010201\)46:2<142::AID-PROS1018>3.0.CO;2-B](https://doi.org/10.1002/1097-0045(20010201)46:2<142::AID-PROS1018>3.0.CO;2-B)
- Betts, A. M., Collett, G. P., Neal, D. E., & Robson, C. N. (1998). Paracrine regulation of talin mRNA expression by androgen in human prostate. *FEBS Letters*, 434(1–2), 66–70. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00953-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00953-3)
- Bijnsdorp, I. V., Geldof, A. A., Lavaei, M., Piersma, S. R., van Moorselaar, R. J. A., & Jimenez, C. R. (2013). Exosomal ITGA3 interferes with non-cancerous prostate cell functions and is increased in urine exosomes

- of metastatic prostate cancer patients. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2(1), 22097. <https://doi.org/10.3402/jev.v2i0.22097>
- Breitling, R., Armengaud, P., Amtmann, A., & Herzyk, P. (2004). Rank products: A simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Letters*, 573(1–3), 83–92. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.07.055>
- Cagle, P., Smith, N., Adekoya, T. O., Li, Y., Kim, S., Rios-Colon, L., Deep, G., Niture, S., Albanese, C., Suy, S., Collins, S. P., & Kumar, D. (2021). Knockdown of microrna-214-3p promotes tumor growth and epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *Cancers*, 13(23). <https://doi.org/10.3390/cancers13235875>
- Cao, P., Deng, Z., Wan, M., Huang, W., Cramer, S. D., Xu, J., Lei, M., & Sui, G. (2010). MicroRNA-101 negatively regulates Ezh2 and its expression is modulated by androgen receptor and HIF-1 α /HIF-1 β . *Molecular Cancer*, 9, 1–12. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-9-108>
- Cao, Y., & Ma, J. (2011). Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Prevention Research*, 4(4), 486–501. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0229>
- Chen, C., Ridzon, D. A., Broomer, A. J., Zhou, Z., Lee, D. H., Nguyen, J. T., Barbisin, M., Xu, N. L., Mahuvakar, V. R., Andersen, M. R., Lao, K. Q., Livak, K. J., & Guegler, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 33(20), 1–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gni178>
- Chen, H., Xiao, Z., Yu, R., Wang, Y., Xu, R., & Zhu, X. (2018). miR-181d-5p-

- FOXP1 feedback loop modulates the progression of osteosarcoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 503(3), 1434–1441. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.07.060>
- Chistiakov, D. A., Myasoedova, V. A., Grechko, A. V., Melnichenko, A. A., & Orekhov, A. N. (2018). New biomarkers for diagnosis and prognosis of localized prostate cancer. *Seminars in Cancer Biology*, 52(December 2017), 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.012>
- Coarfa Cristian, Fiskus Warren, Eedunuri Vijay Kumar, Rajapakshe Kimal, Foley Christopher, Chew Sue Anne, Shah Shrijal S., Geng Chuandong, Shou John, Mohamed Junaith S., O. B. W. and M. N. (2016). Comprehensive proteomic profiling identifies the androgen receptor axis and other signaling pathways as targets of microRNAs suppressed in metastatic prostate cancer Cristian. *Oncogene*, 176(3), 2345–2356. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.295>. Comprehensive
- Cooperberg, M. R., Simko, J. P., Cowan, J. E., Reid, J. E., Djalilvand, A., Bhatnagar, S., Gutin, A., Lanchbury, J. S., Swanson, G. P., Stone, S., & Carroll, P. R. (2013). Validation of a cell-cycle progression gene panel to improve risk stratification in a contemporary prostatectomy cohort. *Journal of Clinical Oncology*, 31(11), 1428–1434. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.4396>
- Cucchiara, V., Cooperberg, M. R., Dall’Era, M., Lin, D. W., Montorsi, F., Schalken, J. A., & Evans, C. P. (2018). Genomic Markers in Prostate Cancer Decision Making. *European Urology*, 73(4), 572–582. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2017.10.036>
- Cuzick, J., Berney, D. M., Fisher, G., Mesher, D., Møller, H., Reid, J. E.,

- Perry, M., Park, J., Younus, A., Gutin, A., Foster, C. S., Scardino, P., Lanchbury, J. S., & Stone, S. (2012). Prognostic value of a cell cycle progression signature for prostate cancer death in a conservatively managed needle biopsy cohort. *British Journal of Cancer*, 106(6), 1095–1099. <https://doi.org/10.1038/bjc.2012.39>
- Cuzick, J., Stone, S., Fisher, G., Yang, Z. H., North, B. V., Berney, D. M., Beltran, L., Greenberg, D., Møller, H., Reid, J. E., Gutin, A., Lanchbury, J. S., Brawer, M., & Scardino, P. (2015). Validation of an RNA cell cycle progression score for predicting death from prostate cancer in a conservatively managed needle biopsy cohort. *British Journal of Cancer*, 113(3), 382–389. <https://doi.org/10.1038/bjc.2015.223>
- Dalton, G. N., Massillo, C., Scalise, G. D., Duca, R., Porretti, J., Farré, P. L., Gardner, K., Paez, A., Gueron, G., De Luca, P., & De Siervi, A. (2019). CTBP1 depletion on prostate tumors deregulates miRNA/mRNA expression and impairs cancer progression in metabolic syndrome mice. *Cell Death and Disease*, 10(4). <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1535-z>
- Danarto, R., Astuti, I., Umbas, R., & Haryana, S. M. (2020). Urine miR-21-5p and miR-200c-3p as potential non-invasive biomarkers in patients with prostate cancer. *Turkish Journal of Urology*, 46(1), 26–30. <https://doi.org/10.5152/tud.2019.19163>
- Daugaard, I., & Hansen, T. B. (2017). Biogenesis and Function of Ago-Associated RNAs. *Trends in Genetics*, 33(3), 208–219. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.01.003>
- De Luca, P., Dalton, G. N., Scalise, G. D., Moiola, C. P., Porretti, J., Massillo,

- C., Kordon, E., Gardner, K., Zalazar, F., Flumian, C., Todaro, L., Vazquez, E. S., Meiss, R., & De Siervi, A. (2016). CtBP1 associates metabolic syndrome and breast carcinogenesis targeting multiple miRNAs. *Oncotarget*, 7(14), 18798–18811. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7711>
- De Marzo, A. M., Haffner, M. C., Lotan, T. L., Yegnasubramanian, S., & Nelson, W. G. (2016). Premalignancy in prostate cancer: Rethinking what we know. *Cancer Prevention Research*, 9(8), 648–656. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-15-0431>
- De Stefani, E., Ronco, A. L., Deneo-Pellegrini, H., Boffetta, P., Aune, D., Acosta, G., Brennan, P., Ferro, G., & Mendilaharsu, M. (2010). Dietary patterns and risk of advanced prostate cancer: A principal component analysis in Uruguay. *Cancer Causes and Control*, 21(7), 1009–1016. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9527-4>
- Discacciati, A., Orsini, N., Andersson, S. O., Andrén, O., Johansson, J. E., & Wolk, A. (2011). Body mass index in early and middle-late adulthood and risk of localised, advanced and fatal prostate cancer: A population-based prospective study. *British Journal of Cancer*, 105(7), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.319>
- Endzeliņš, E., Melne, V., Kalniņa, Z., Lietuvietis, V., Riekstiņa, U., Llorente, A., & Line, A. (2016). Diagnostic, prognostic and predictive value of cell-free miRNAs in prostate cancer: A systematic review. *Molecular Cancer*, 15(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12943-016-0523-5>
- Engeland, A., Tretli, S., & Bjørge, T. (2003). Height, body mass index, and prostate cancer: A follow-up of 950 000 Norwegian men. *British*

Journal of Cancer, 89(7), 1237–1242.

<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601206>

Fabris, L., Ceder, Y., Chinnaiyan, A. M., Jenster, G. W., Sorensen, K. D., Tomlins, S., Visakorpi, T., & Calin, G. A. (2016). The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. *European Urology*, 70(2), 312–322. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2015.12.054>

Fang, Y. (2019). *miR-214-3p inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of endometrial cancer cells by targeting TWIST1*. 9449–9458.

Farré, P. L., Scalise, G. D., Duca, R. B., Dalton, G. N., Massillo, C., Porretti, J., Graña, K., Gardner, K., De Luca, P., & De Siervi, A. (2018). CTBP1 and metabolic syndrome induce an mRNA and miRNA expression profile critical for breast cancer progression and metastasis. *Oncotarget*, 9(17), 13848–13858. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.24486>

Felekis, K., & Papanephytous, C. (2020). Challenges in using circulating micro-rnas as biomarkers for cardiovascular diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(2). <https://doi.org/10.3390/ijms21020561>

Fossati, N., Buffi, N. M., Haese, A., Stephan, C., Larcher, A., McNicholas, T., De La Taille, A., Freschi, M., Lughezzani, G., Abrate, A., Bini, V., Redorta, J. P., Graefen, M., Guazzoni, G., & Lazzeri, M. (2015). Preoperative prostate-specific antigen isoform p2PSA and its derivatives, %p2PSA and prostate health index, predict pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy for prostate

- cancer: Results from a multicentric european prospective stud.
European Urology, 68(1), 132–138.
<https://doi.org/10.1016/j.eururo.2014.07.034>
- Gacci, M., De Nunzio, C., Sebastianelli, A., Salvi, M., Vignozzi, L., Tubaro, A., Morgia, G., & Serni, S. (2017). Meta-Analysis of metabolic syndrome and prostate cancer. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 20(2), 146–155. <https://doi.org/10.1038/pcan.2017.1>
- Gao, L. M., Zheng, Y., Wang, P., Zheng, L., Zhang, W. L., Di, Y., Chen, L. L., Yin, X. B., Tian, Q., Shi, S. S., & Xu, S. F. (2019). Tumor-suppressive effects of microRNA-181d-5p on non-small-cell lung cancer through the CDKN3-mediated Akt signaling pathway in vivo and in vitro. In *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology* (Vol. 316, Issue 5).
<https://doi.org/10.1152/ajplung.00334.2018>
- Gao, X., Wang, Y., Zhao, H., Wei, F., Zhang, X., Su, Y., Wang, C., Li, H., & Ren, X. (2016). Plasma miR-324-3p and miR-1285 as diagnostic and prognostic biomarkers for early stage lung squamous cell carcinoma. *Oncotarget*, 7(37), 59664–59675.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.11198>
- Ghafouri-Fard, S., Shoorei, H., & Taheri, M. (2020). Role of microRNAs in the development, prognosis and therapeutic response of patients with prostate cancer. *Gene*, 759(July), 144995.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2020.144995>
- Ghorbanmehr, N., Gharbi, S., Korsching, E., Tavallaei, M., Einollahi, B., & Mowla, S. J. (2019). miR-21-5p, miR-141-3p, and miR-205-5p levels in

- urine—promising biomarkers for the identification of prostate and bladder cancer. *Prostate*, 79(1), 88–95.
<https://doi.org/10.1002/pros.23714>
- Giovannucci, E., Liu, Y., Platz, E. A., Stampfer, M. J., & Willett, W. C. (2007). Risk factors for prostate cancer incidence and progression in the health professionals follow-up study. *International Journal of Cancer*, 121(7), 1571–1578. <https://doi.org/10.1002/ijc.22788>
- Golden, S. H., Robinson, K. A., Saldanha, I., Anton, B., & Ladenson, P. W. (2009). Prevalence and incidence of endocrine and metabolic disorders in the united states: A comprehensive review. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(6), 1853–1878.
<https://doi.org/10.1210/jc.2008-2291>
- Goldman, M. J., Craft, B., Hastie, M., Repečka, K., McDade, F., Kamath, A., Banerjee, A., Luo, Y., Rogers, D., Brooks, A. N., Zhu, J., & Haussler, D. (2020). Visualizing and interpreting cancer genomics data via the Xena platform. *Nature Biotechnology*, 38(6), 675–678.
<https://doi.org/10.1038/s41587-020-0546-8>
- Hammarsten, J., & Högestedt, B. (2004). Clinical, haemodynamic, anthropometric, metabolic and insulin profile of men with high-stage and high-grade clinical prostate cancer. *Blood Pressure*, 13(1), 47–55.
<https://doi.org/10.1080/08037050310025735>
- han, Y., Hu, H., & zhou, jinsong. (2019). Knockdown of LncRNA SNHG7 inhibited epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer though miR-324-3p/WNT2B axis in vitro. *Pathology Research and Practice*, 215(10), 152537. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152537>

- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). Mirna-based biomarkers, therapies, and resistance in cancer. *International Journal of Biological Sciences*, 16(14), 2628–2647. <https://doi.org/10.7150/ijbs.47203>
- He, Z., Tang, F., Lu, Z., Huang, Y., Lei, H., Li, Z., & Zeng, G. (2018). Analysis of differentially expressed genes, clinical value and biological pathways in prostate cancer. *American Journal of Translational Research*, 10(5), 1444–1456.
- Hua, X., Yu, L., Pan, W., Huang, X., Liao, Z., Xian, Q., Fang, L., & Shen, H. (2012). Increased expression of Golgi phosphoprotein-3 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis of prostate cancer. *Diagnostic Pathology*, 7(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/1746-1596-7-127>
- Huang, X., Liang, M., Dittmar, R., & Wang, L. (2013). Extracellular microRNAs in urologic malignancies: Chances and challenges. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14785–14799.
<https://doi.org/10.3390/ijms140714785>
- Hudecova, S., Markova, J., Simko, V., Csaderova, L., Stracina, T., Sirova, M., Fojtu, M., Svastova, E., Gronesova, P., Pastorek, M., Novakova, M., Cholujo, D., Kopacek, J., Pastorekova, S., Sedlak, J., & Krizanov, O. (2016). Sulforaphane-induced apoptosis involves the type 1 IP3 receptor. *Oncotarget*, 7(38), 61403–61418.

<https://doi.org/10.18632/oncotarget.8968>

Hudson, R. S., Yi, M., Esposito, D., Watkins, S. K., Hurwitz, A. A., Yfantis, H. G., Lee, D. H., Borin, J. F., Naslund, M. J., Alexander, R. B., Dorsey, T. H., Stephens, R. M., Croce, C. M., & Ambis, S. (2012). MicroRNA-1 is a candidate tumor suppressor and prognostic marker in human prostate cancer. *Nucleic Acids Research*, 40(8), 3689–3703.

<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1222>

Jaggersa, J. R., , Xuemei Suia, Steven P. Hookera, Michael J. LaMonteb, C. E., & Matthewsc, Gregory A. Handa, and Steven N. Blaira, D. (2009). Metabolic Syndrome and Risk of Cancer Mortality in Men. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2009.01.031>. Metabolic

Jia, H. Y., Wang, Y. X., Yan, W. T., Li, H. Y., Tian, Y. Z., Wang, S. M., & Zhao, H. L. (2012). MicroRNA-125b functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8762–8774. <https://doi.org/10.3390/ijms13078762>

Jiang, N., Pan, J., Fang, S., Zhou, C., Han, Y., Chen, J., Meng, X., Jin, X., & Gong, Z. (2019). Liquid biopsy: Circulating exosomal long noncoding RNAs in cancer. *Clinica Chimica Acta*, 495(818), 331–337. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.04.082>

Jin, W., Fei, X., Wang, X., Song, Y., & Chen, F. (2020). Detection and Prognosis of Prostate Cancer Using Blood-Based Biomarkers. *Mediators of Inflammation*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8730608>

Jing Ma, PhD1, Haojie Li, PhD2, Ed Giovannucci, DSc [full professor]1, 3, L. M., ScD1, 4, Weiliang Qiu, PhD1, Paul L. Nguyen, MD5, J. Michael

- Gaziano, MD6, M. P., & MD [full professor]7,* and Meir Stampfer, DrPH [full professor]1, 3. (2005). A long-term survival analysis of prediagnostic body mass index, plasma C-peptide concentration, and prostate cancer-specific mortality among men with prostate cancer. *Bone*, 23(1), 1–7. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-10-0112>.The
- Kano, M., Seki, N., Kikkawa, N., Fujimura, L., Hoshino, I., Akutsu, Y., Chiyomaru, T., Enokida, H., Nakagawa, M., & Matsubara, H. (2010). MiR-145, miR-133a and miR-133b: Tumor-suppressive miRNAs target FSCN1 in esophageal squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*, 127(12), 2804–2814. <https://doi.org/10.1002/ijc.25284>
- Karagkouni, D., Paraskevopoulou, M. D., Chatzopoulos, S., Vlachos, I. S., Tastsoglou, S., Kanellos, I., Papadimitriou, D., Kavakiotis, I., Maniou, S., Skoufos, G., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2018). DIANA-TarBase v8: A decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D239–D245. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>
- Karatas, O. F., Guzel, E., Suer, I., Ekici, I. D., Caskurlu, T., Creighton, C. J., Ittmann, M., & Ozen, M. (2014). miR-1 and miR-133b are differentially expressed in patients with recurrent prostate cancer. *PLoS ONE*, 9(6), 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0098675>
- Karzai, F. H., Madan, R. A., & Dahut, W. L. (2016). Metabolic syndrome in prostate cancer: Impact on risk and outcomes. *Future Oncology*, 12(16), 1947–1955. <https://doi.org/10.2217/fon-2016-0061>
- Kawakami, K., Enokida, H., Chiyomaru, T., Tatarano, S., Yoshino, H., Kagara, I., Gotanda, T., Tachiwada, T., Nishiyama, K., Nohata, N., Seki,

- N., & Nakagawa, M. (2012). The functional significance of miR-1 and miR-133a in renal cell carcinoma. *European Journal of Cancer*, 48(6), 827–836. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.06.030>
- Klotz, L., Zhang, L., Lam, A., Nam, R., Mamedov, A., & Loblaw, A. (2010). Clinical results of long-term follow-up of a large, active surveillance cohort with localized prostate cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 28(1), 126–131. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.2180>
- Kojima, S., Chiyomaru, T., Kawakami, K., Yoshino, H., Enokida, H., Nohata, N., Fuse, M., Ichikawa, T., Naya, Y., Nakagawa, M., & Seki, N. (2012). Tumour suppressors miR-1 and miR-133a target the oncogenic function of purine nucleoside phosphorylase (PNP) in prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 106(2), 405–413. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.462>
- Konoshenko, M. Y., Bryzgunova, O. E., & Laktionov, P. P. (2021). miRNAs and radiotherapy response in prostate cancer. *Andrology*, 9(2), 529–545. <https://doi.org/10.1111/andr.12921>
- Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current Protocols in Molecular Biology*, SUPPL. 95, 1–15. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1510s95>
- Kurozumi, A., Goto, Y., Matsushita, R., Fukumoto, I., Kato, M., Nishikawa, R., Sakamoto, S., Enokida, H., Nakagawa, M., Ichikawa, T., & Seki, N. (2016). Tumor-suppressive microRNA-223 inhibits cancer cell migration and invasion by targeting ITGA3/ITGB1 signaling in prostate cancer. *Cancer Science*, 107(1), 84–94. <https://doi.org/10.1111/cas.12842>

- Labbé, D. P., Zadra, G., Yang, M., Reyes, J. M., Lin, C. Y., Cacciatore, S., Ebot, E. M., Creech, A. L., Giunchi, F., Fiorentino, M., Elfandy, H., Syamala, S., Karoly, E. D., Alshalalfa, M., Erho, N., Ross, A., Schaeffer, E. M., Gibb, E. A., Takhar, M., ... Brown, M. (2019). High-fat diet fuels prostate cancer progression by rewiring the metabolome and amplifying the MYC program. *Nature Communications*, *10*(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-12298-z>
- Lai, Y. H., Cheng, J., Cheng, D., Feasel, M. E., Beste, K. D., Peng, J., Nusrat, A., & Moreno, C. S. (2011). SOX4 interacts with plakoglobin in a Wnt3a-dependent manner in prostate cancer cells. *BMC Cell Biology*, *12*(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-12-50>
- Lazzeri, M., Haese, A., Abrate, A., De La Taille, A., Redorta, J. P., McNicholas, T., Lughezzani, G., Lista, G., Larcher, A., Bini, V., Cestari, A., Buffi, N., Graefen, M., Bosset, O., Corvoisier, P. Le, Breda, A., De La Torre, P., Fowler, L., Roux, J., & Guazzoni, G. (2013). Clinical performance of serum prostate-specific antigen isoform [-2]proPSA (p2PSA) and its derivatives, %p2PSA and the prostate health index (PHI), in men with a family history of prostate cancer: Results from a multicentre European study, the PROMetheuS project. *BJU International*, *112*(3), 313–321. <https://doi.org/10.1111/bju.12217>
- Li, S. M., Wu, H. L., Yu, X., Tang, K., Wang, S. G., Ye, Z. Q., & Hu, J. (2018). The putative tumour suppressor miR-1-3p modulates prostate cancer cell aggressiveness by repressing E2F5 and PFTK1. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, *37*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13046-018-0895-z>
- Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P., & Huang, Y. (2009). MicroRNA-21 directly

- targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 383(3), 280–285.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.077>
- Li, W., Guo, F., Gu, M., Wang, G., He, X., Zhou, J., Peng, Y., Wang, Z., & Wang, X. (2015). Increased expression of GOLPH3 is associated with the proliferation of prostate cancer. *Journal of Cancer*, 6(5), 420–429.
<https://doi.org/10.7150/jca.11228>
- Li, W., Qi, K., Wang, Z., Gu, M., Chen, G., Guo, F., & Wang, Z. (2015). Golgi phosphoprotein 3 regulates metastasis of prostate cancer via matrix metalloproteinase 9. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(4), 3691–3700.
- Lin, M. H., Chen, Y. Z., Lee, M. Y., Weng, K. P., Chang, H. T., Yu, S. Y., Dong, B. J., Kuo, F. R., Hung, L. T., Liu, L. F., Chen, W. S., & Tsai, K. W. (2018). Comprehensive identification of microRNA arm selection preference in lung cancer: MiR-324-5p and -3p serve oncogenic functions in lung cancer. *Oncology Letters*, 15(6), 9818–9826.
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8557>
- Lin, Y., Chen, F., Shen, L., Tang, X., Du, C., Sun, Z., Ding, H., Chen, J., & Shen, B. (2018). Biomarker microRNAs for prostate cancer metastasis: Screened with a network vulnerability analysis model. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12967-018-1506-7>
- Litwin, M. S., & Tan, H. J. (2017). The diagnosis and treatment of prostate cancer: A review. *JAMA - Journal of the American Medical Association*,

- 317(24), 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7248>
- Liu, T., Zhang, Q., Zhang, J., Li, C., Miao, Y. R., Lei, Q., Li, Q., & Guo, A. Y. (2019). EVmiRNA: A database of miRNA profiling in extracellular vesicles. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D89–D93. <https://doi.org/10.1093/nar/gky985>
- Lu, T., Yang, Y., Li, Z., & Lu, S. (2020). MicroRNA-214-3p inhibits the stem-like properties of lung squamous cell cancer by targeting YAP1. *Cancer Cell International*, 20(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s12935-020-01506-2>
- Luu, H. N., Lin, H. Y., Sørensen, K. D., Ogunwobi, O. O., Kumar, N., Chornokur, G., Phelan, C., Jones, D., Kidd, L. C., Batra, J., Yamoah, K., Berglund, A., Rounbehler, R. J., Yang, M., Lee, S. H., Kang, N., Kim, S. J., Park, J. Y., & Di Pietro, G. (2017). miRNAs associated with prostate cancer risk and progression. *BMC Urology*, 17(1), 1–18. <https://doi.org/10.1186/s12894-017-0206-6>
- Ma, Y., Zhang, P., Yang, J., Liu, Z., Yang, Z., & Qin, H. (2012). Candidate microRNA biomarkers in human colorectal cancer: Systematic review profiling studies and experimental validation. *International Journal of Cancer*, 130(9), 2077–2087. <https://doi.org/10.1002/ijc.26232>
- MacInnis, R. J., & English, D. R. (2006). Body size and composition and prostate cancer risk: Systematic review and meta-regression analysis. *Cancer Causes and Control*, 17(8), 989–1003. <https://doi.org/10.1007/s10552-006-0049-z>
- Malla, B., Aebersold, D. M., & Dal Pra, A. (2018). Protocol for serum exosomal miRNAs analysis in prostate cancer patients treated with

- radiotherapy. *Journal of Translational Medicine*, 16(1), 1–13.
<https://doi.org/10.1186/s12967-018-1592-6>
- Martens-Uzunova, E. S., Jalava, S. E., Dits, N. F., Van Leenders, G. J. L. H., Møller, S., Trapman, J., Bangma, C. H., Litman, T., Visakorpi, T., & Jenster, G. (2012). Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene*, 31(8), 978–991. <https://doi.org/10.1038/onc.2011.304>
- Massillo, C., Dalton, G. N., Farré, P. L., De Luca, P., & De Siervi, A. (2017). Implications of microRNA dysregulation in the development of prostate cancer. *Reproduction*, 154(4), R81–R97.
<https://doi.org/10.1530/REP-17-0322>
- Massillo, C., Dalton, G. N., Porretti, J., Scalise, G. D., Farré, P. L., Piccioni, F., Secchiari, F., Pascuali, N., Clyne, C., Gardner, K., De Luca, P., & De Siervi, A. (2019). CTBP1/CYP19A1/estradiol axis together with adipose tissue impacts over prostate cancer growth associated to metabolic syndrome. *International Journal of Cancer*, 144(5), 1115–1127.
<https://doi.org/10.1002/ijc.31773>
- Massillo, C., Duca, R. B., Lacunza, E., Dalton, G. N., Farré, P. L., Taha, N., Piccioni, F., Scalise, G. D., Gardner, K., & De Siervi, A. (2020). Adipose tissue from metabolic syndrome mice induces an aberrant miRNA signature highly relevant in prostate cancer development. *Molecular Oncology*, 14(11), 2868–2883. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12788>
- Matsushita, M., Fujita, K., & Nonomura, N. (2020). Influence of diet and nutrition on prostate cancer. *International Journal of Molecular*

- Sciences*, 21(4), 1–18. <https://doi.org/10.3390/ijms21041447>
- McGrowder, D. A., Jackson, L. A., & Crawford, T. V. (2012). Prostate cancer and metabolic syndrome: Is there a link? *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 13(1), 1–13.
<https://doi.org/10.7314/APJCP.2012.13.1.001>
- Mello-Grand, M., Gregnanin, I., Sacchetto, L., Ostano, P., Zitella, A., Bottoni, G., Oderda, M., Marra, G., Munegato, S., Pardini, B., Naccarati, A., Gasparini, M., Gontero, P., & Chiorino, G. (2019). Circulating microRNAs combined with PSA for accurate and non-invasive prostate cancer detection. *Carcinogenesis*, 40(2), 246–253.
<https://doi.org/10.1093/carcin/bgy167>
- Mertens-Walker, I., Fernandini, B. C., Maharaj, M. S. N., Rockstroh, A., Nelson, C. C., Herington, A. C., & Stephenson, S. A. (2015). The tumour-promoting receptor tyrosine kinase, EphB4, regulates expression of Integrin- β 8 in prostate cancer cells. *BMC Cancer*, 15(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1164-6>
- Micucci, C., Valli, D., Matakchione, G., & Catalano, A. (2016). Current perspectives between metabolic syndrome and cancer. *Oncotarget*, 7(25), 38959–38972. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8341>
- Mistry, K., & Cable, G. (2003). Meta-analysis of prostate-specific antigen and digital rectal examination as screening tests for prostate carcinoma. *Journal of the American Board of Family Practice*, 16(2), 95–101. <https://doi.org/10.3122/jabfm.16.2.95>
- Mitchelson, K. R. (2015). Roles of the canonical myomiRs miR-1, -133 and -206 in cell development and disease. *World Journal of Biological*

- Chemistry*, 6(3), 162. <https://doi.org/10.4331/wjbc.v6.i3.162>
- Moiola, C. P., Luca, P. De, Zalazar, F., Cotignola, J., Santiago, A., Gardner, K., Meiss, R., Vallecorsa, P., & Pignataro, O. (2014). *Prostate tumor growth is impaired by CtBP1 depletion in high-fat diet-fed mice*. 20(15), 4086–4095. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0322>.Prostate
- Nam, R. K., Wallis, C. J. D., Amemiya, Y., Benatar, T., & Seth, A. (2018). Identification of a novel MicroRNA panel associated with metastasis following radical prostatectomy for prostate cancer. *Anticancer Research*, 38(9), 5027–5034. <https://doi.org/10.21873/anticanres.12821>
- Nevo, A., Navaratnam, A., & Andrews, P. (2020). Prostate cancer and the role of biomarkers. *Abdominal Radiology*, 45(7), 2120–2132. <https://doi.org/10.1007/s00261-019-02305-8>
- Niclis, C., Román, M. D., Osella, A. R., Eynard, A. R., & Díaz, M. D. P. (2015). Traditional Dietary Pattern Increases Risk of Prostate Cancer in Argentina: Results of a Multilevel Modeling and Bias Analysis from a Case-Control Study. *Journal of Cancer Epidemiology*, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/179562>
- Nohata, N., Hanazawa, T., Enokida, H., & Seki, N. (2012). MicroRNA-1/133a and microRNA-206/133b clusters: Dysregulation and functional roles in human cancers. *Oncotarget*, 3(1), 9–21. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.424>
- O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune

- system. *Nature Reviews Immunology*, 10(2), 111–122.
<https://doi.org/10.1038/nri2708>
- Olive, V., Bennett, M. J., Walker, J. C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.-J., Lowe, S. W., Hannon, G. J., & He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev*, 23(24), 2839–2849.
- Osip'yants, A. I., Knyazev, E. N., Galatenko, A. V., Nyushko, K. M., Galatenko, V. V., Shkurnikov, M. Y., & Alekseev, B. Y. (2017). Changes in the Level of Circulating hsa-miR-297 and hsa-miR-19b-3p miRNA Are Associated with Generalization of Prostate Cancer. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 162(3), 379–382.
<https://doi.org/10.1007/s10517-017-3620-6>
- Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A., & Kosik, K. S. (2008). MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Research*, 68(19), 8164–8172.
<https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1305>
- Pashaei, E., Pashaei, E., Ahmady, M., Ozen, M., & Aydin, N. (2017). Meta-analysis of miRNA expression profiles for prostate cancer recurrence following radical prostatectomy. *PLoS ONE*, 12(6), 1–23.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179543>
- Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 1(November 2015).
<https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4>
- Pernar, C. H., Ebot, E. M., Wilson, K. M., & Mucci, L. A. (2018). The epidemiology of prostate cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(12), 1–18.

<https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030361>

Pezaro, C., Woo, H. H., & Davis, I. D. (2014). Prostate cancer: Measuring PSA. *Internal Medicine Journal*, 44(5), 433–440.

<https://doi.org/10.1111/imj.12407>

Porretti, J., Dalton, G. N., Massillo, C., Scalise, G. D., Farré, P. L., Elble, R., Gerez, E. N., Accialini, P., Cabanillas, A. M., Gardner, K., De Luca, P., & De Siervi, A. (2018). CLCA2 epigenetic regulation by CTBP1, HDACs, ZEB1, EP300 and miR-196b-5p impacts prostate cancer cell adhesion and EMT in metabolic syndrome disease. *Int J Cancer*, 143(4), 897–906.

Poulet, G., Massias, J., & Taly, V. (2019). Liquid Biopsy: General Concepts. *Acta Cytologica*, 63(6), 449–455. <https://doi.org/10.1159/000499337>

Qu, H., Xu, W., Huang, Y., & Yang, S. (2011). Circulating miRNAs: Promising biomarkers of human cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 12(5), 1117–1125.

Rezuchova, I., Hudecova, S., Soltysova, A., Matuskova, M., Durinikova, E., Chovancova, B., Zuzcak, M., Cihova, M., Burikova, M., Penesova, A., Lencesova, L., Breza, J., & Krizanova, O. (2019). Type 3 inositol 1,4,5-trisphosphate receptor has antiapoptotic and proliferative role in cancer cells. *Cell Death and Disease*, 10(3).

<https://doi.org/10.1038/s41419-019-1433-4>

Riaz, I. Bin, Wang, L., & Kohli, M. (2018). Liquid biopsy approach in the management of prostate cancer. *Translational Research*, 201, 60–70.

<https://doi.org/10.1016/j.trsl.2018.05.004>

- Robinson, W. R., Poole, C., & Godley, P. A. (2008). Systematic review of prostate cancer's association with body size in childhood and young adulthood. *Cancer Causes and Control*, 19(8), 793–803.
<https://doi.org/10.1007/s10552-008-9142-9>
- Sakamoto, S., O McCann, R., Dhir, R., & Kyprianou, N. (2010). Talin1 promotes tumor invasion and metastasis via focal adhesion signaling and anoikis resistance. *Cancer Res*, 70(5), 1885–1895.
- Schatten, H. (2018). Brief overview of prostate cancer statistics, grading, diagnosis and treatment strategies. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1095, 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95693-0_1
- Schmelz, M., Cress, A. E., Scott, K. M., Bürgery, F., Cui, H., Sallam, K., McDaniel, K. M., Dalkin, B. L., & Nagle, R. B. (2002). Different phenotypes in human prostate cancer: $\alpha 6$ or $\alpha 3$ integrin in cell-extracellular adhesion sites. *Neoplasia*, 4(3), 243–254.
<https://doi.org/10.1038/sj/neo/7900223>
- Schmid, H. P., Riesen, W., & Prikler, L. (2004). Update on screening for prostate cancer with prostate-specific antigen. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 50(1), 71–78.
<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2003.11.001>
- Schulz, W. A., Burchardt, M., & Cronauer, M. V. (2003). Molecular biology of prostate cancer. *Molecular Human Reproduction*, 9(7–8), 437–448.
<https://doi.org/10.1093/molehr/gag064>
- Scott, K. L., Kabbarah, O., Liang, M., Ivanova, E., Wu, J., Dhakal, S., Wu, M., Chen, S., Feinberg, T., Huang, J., Saci, A., Widlund, H. R., Fisher, D. E.,

- Xiao, Y., Rimm, L., Protopopov, A., Wong, K., & Chin, L. (2009). GOLPH3 modulates mTOR signaling and rapamycin sensitivity in cancer. *Nature*, 459(7250), 1085–1090.
<https://doi.org/10.1038/nature08109>. GOLPH3
- Sempere, L. F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., & Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biology*, 5(3).
<https://doi.org/10.1186/gb-2004-5-3-r13>
- Shah, V., & Shah, J. (2020). Recent trends in targeting miRNAs for cancer therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 72(12), 1732–1749.
<https://doi.org/10.1111/jphp.13351>
- Sharma, N., & Baruah, M. M. (2019). The microRNA signatures: aberrantly expressed miRNAs in prostate cancer. *Clinical and Translational Oncology*, 21(2), 126–144. <https://doi.org/10.1007/s12094-018-1910-8>
- Shen, M. M., & Abate-Shen, C. (2010). Molecular genetics of prostate cancer: New prospects for old challenges. *Genes and Development*, 24(18), 1967–2000. <https://doi.org/10.1101/gad.1965810>
- Smolarz, B., Durczyński, A., Romanowicz, H., Szyłło, K., & Hogendorf, P. (2022). miRNAs in Cancer (Review of Literature). *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5). <https://doi.org/10.3390/ijms23052805>
- Spethmann, T., Böckelmann, L. C., Labitzky, V., Ahlers, A. K., Schröder-Schwarz, J., Bonk, S., Simon, R., Sauter, G., Huland, H., Kypta, R., Schumacher, U., & Lange, T. (2021). Opposing prognostic relevance of

- junction plakoglobin in distinct prostate cancer patient subsets.
Molecular Oncology, 15(7), 1956–1969.
<https://doi.org/10.1002/1878-0261.12922>
- Sun, G. L., Li, Z., Wang, W. Z., Chen, Z., Zhang, L., Li, Q., Wei, S., Li, B. W., Xu, J. H., Chen, L., He, Z. Y., Ying, K., Zhang, X., Xu, H., Zhang, D. C., & Xu, Z. K. (2018). miR-324-3p promotes gastric cancer development by activating Smad4-mediated Wnt/beta-catenin signaling pathway.
Journal of Gastroenterology, 53(6), 725–739.
<https://doi.org/10.1007/s00535-017-1408-0>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249.
<https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Szafranska, A. E., Davison, T. S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., & Hahn, S. A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*, 26(30), 4442–4452.
<https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210228>
- Tang, Y., Pan, J., Huang, S., Peng, X., Zou, X., Luo, Y., Ren, D., Zhang, X., Li, R., He, P., & Wa, Q. (2018). Downregulation of miR-133a-3p promotes prostate cancer bone metastasis via activating PI3K/AKT signaling.
Journal of Experimental and Clinical Cancer Research, 37(1), 1–16.
<https://doi.org/10.1186/s13046-018-0813-4>
- Tao, J., Wu, D., Xu, B., Qian, W., Li, P., Lu, Q., Yin, C., & Zhang, W. (2012).

- microRNA-133 inhibits cell proliferation, migration and invasion in prostate cancer cells by targeting the epidermal growth factor receptor. *Oncology Reports*, 27(6), 1967–1975.
<https://doi.org/10.3892/or.2012.1711>
- Thieu, W., Tilki, D., De Vere White, R. W., & Evans, C. P. (2014). The role of microRNA in castration-resistant prostate cancer. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations*, 32(5), 517–523.
<https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2013.11.004>
- Thompson, I. M. (1995). Prostate Cancer Screening. *Archives of Family Medicine*, 4(4), 307–308. <https://doi.org/10.1001/archfami.4.4.307>
- Tian, L., Fang, Y. xiang, Xue, J. lun, & Chen, J. zhong. (2013). Four microRNAs promote prostate cell proliferation with regulation of PTEN and its downstream signals in vitro. *PloS One*, 8(9), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075885>
- Tsai, K. W., Kuo, W. T., & Jeng, S. Y. (2020). Microrna-324 plays an oncogenic role in bladder cancer cell growth and motility. *Translational Cancer Research*, 9(2), 707–716.
<https://doi.org/10.21037/tcr.2019.12.01>
- Tuo, H., Wang, Y., Wang, L., Yao, B., Li, Q., Wang, C., Liu, Z., Han, S., Yin, G., Tu, K., & Liu, Q. (2017). MiR-324-3p promotes tumor growth through targeting DACT1 and activation of Wnt/ β -catenin pathway in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 8(39), 65687–65698.
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.20058>
- Urabe, F., Matsuzaki, J., Yamamoto, Y., Kimura, T., Hara, T., Ichikawa, M., Takizawa, S., Aoki, Y., Niida, S., Sakamoto, H., Kato, K., Egawa, S.,

- Fujimoto, H., & Ochiya, T. (2019). Large-scale circulating microRNA profiling for the liquid biopsy of prostate cancer. In *Clinical Cancer Research* (Vol. 25, Issue 10). <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-2849>
- Vaidyanathan, R., Soon, R. H., Zhang, P., Jiang, K., & Lim, C. T. (2019). Cancer diagnosis: from tumor to liquid biopsy and beyond. *Lab on a Chip*, 19(1), 11–34. <https://doi.org/10.1039/c8lc00684a>
- Valderrama, F., Thevapala, S., & Ridley, A. J. (2012). Radixin regulates cell migration and cell-cell adhesion through Rac1. *Journal of Cell Science*, 125(14), 3310–3319. <https://doi.org/10.1242/jcs.094383>
- Van Gils, M. P. M. Q., Hessels, D., Van Hooij, O., Jannink, S. A., Peelen, W. P., Hanssen, S. L. J., Witjes, J. A., Cornel, E. B., Karthaus, H. F. M., Smits, G. A. H. J., Dijkman, G. A., Mulders, P. F. A., & Schalken, J. A. (2007). The time-resolved fluorescence-based PCA3 test on urinary sediments after digital rectal examination; a Dutch multicenter validation of the diagnostic performance. *Clinical Cancer Research*, 13(3), 939–943. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-2679>
- Vanoverberghe, K., Mariot, P., Vanden Abeele, F., Delcourt, P., Parys, J. B., & Prevarskaya, N. (2003). Mechanisms of ATP-induced calcium signaling and growth arrest in human prostate cancer cells. *Cell Calcium*, 34(1), 75–85. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00024-1](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00024-1)
- Vishnoi, A., & Rani, S. (2017). MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. *Methods in Molecular Biology*, 1509, 1–10. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6524-3_1

- Vlachos, I. S., Zagganas, K., Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Karagkouni, D., Vergoulis, T., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2015). DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, 43(W1), W460–W466. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv403>
- Vlaeminck-Guillem, V., Ruffion, A., André, J., Devonec, M., & Paparel, P. (2010). Urinary Prostate Cancer 3 Test: Toward the Age of Reason? *Urology*, 75(2), 447–453. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2009.03.046>
- Wang, Hongbin, Wei, H., Wang, J., Li, L., Chen, A., & Li, Z. (2020). MicroRNA-181d-5p-Containing Exosomes Derived from CAFs Promote EMT by Regulating CDX2/HOXA5 in Breast Cancer. *Molecular Therapy - Nucleic Acids*, 19(150), 654–667. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.11.024>
- Wang, Hui, An, H., Wang, B., Liao, Q., Li, W., Jin, X., Cui, S., Zhang, Y., Ding, Y., & Zhao, L. (2013). MiR-133a represses tumour growth and metastasis in colorectal cancer by targeting LIM and SH3 protein 1 and inhibiting the MAPK pathway. *European Journal of Cancer*, 49(18), 3924–3935. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2013.07.149>
- Wang, Jianfeng, Xu, Y., Wang, J., & Ying, H. (2020). Circulating miR-214-3p predicts nasopharyngeal carcinoma recurrence or metastasis. *Clinica Chimica Acta*, 503, 54–60. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2020.01.002>
- Wang, Jingpu, Ni, J., Beretov, J., Thompson, J., Graham, P., & Li, Y. (2020). Exosomal microRNAs as liquid biopsy biomarkers in prostate cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 145, 102860.

- <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2019.102860>
- Wang, S., Wu, W., & Claret, F. X. (2017). Mutual regulation of microRNAs and DNA methylation in human cancers. *Epigenetics*, 12(3), 187–197. <https://doi.org/10.1080/15592294.2016.1273308>
- Wang, W., Wang, M., Wang, L., Adams, T. S., Tian, Y., & Xu, J. (2014). Diagnostic ability of %p2PSA and prostate health index for aggressive prostate cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 4, 13–18. <https://doi.org/10.1038/srep05012>
- Watanabe, K., Nakamura, Y., & Low, S. K. (2021). Clinical implementation and current advancement of blood liquid biopsy in cancer. *Journal of Human Genetics*, 66(9), 909–926. <https://doi.org/10.1038/s10038-021-00939-5>
- Windus, L. C. E., Kiss, D. L., Glover, T., & Avery, V. M. (2012). In vivo biomarker expression patterns are preserved in 3D cultures of Prostate Cancer. *Experimental Cell Research*, 318(19), 2507–2519. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.07.013>
- Wong, T. S., Liu, X. B., Wong, B. Y. H., Ng, R. W. M., Yuen, A. P. W., & Wei, W. I. (2008). Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clinical Cancer Research*, 14(9), 2588–2592. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0666>
- Xiang, Y. Z., Xiong, H., Cui, Z. L., Jiang, S. B., Xia, Q. H., Zhao, Y., Li, G. Bin, & Jin, X. B. (2013). The association between metabolic syndrome and the risk of prostate cancer, high-grade prostate cancer, advanced prostate cancer, prostate cancer-specific mortality and biochemical recurrence. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*,

- 32(1), 1. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-32-9>
- Xie, M., Dart, D. A., Owen, S., Wen, X., Ji, J., & Jiang, W. (2016). Insights into roles of the miR-1, -133 and -206 family in gastric cancer (Review). *Oncology Reports*, 36(3), 1191–1198. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4908>
- Xu, N., Chen, H. J., Chen, S. H., Xue, X. Y., Chen, H., Zheng, Q. S., Wei, Y., Li, X. D., Huang, J. B., Cai, H., & Sun, X. L. (2016). Upregulation of Talin-1 expression associates with advanced pathological features and predicts lymph node metastases and biochemical recurrence of prostate cancer. *Medicine (United States)*, 95(29). <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004326>
- Yang, J., Song, Q., Cai, Y., Wang, P., Wang, M., & Zhang, D. (2015). RLIP76-dependent suppression of PI3K/AKT/Bcl-2 pathway by miR-101 induces apoptosis in prostate cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463(4), 900–906. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.06.032>
- Yao, Y., Wang, H., Li, B., & Tang, Y. (2014). Evaluation of the TMPRSS2:ERG fusion for the detection of prostate cancer: A systematic review and meta-analysis. *Tumor Biology*, 35(3), 2157–2166. <https://doi.org/10.1007/s13277-013-1286-x>
- Zhang, L., Guo, F., Gao, X., & Wu, Y. (2015). Golgi phosphoprotein 3 expression predicts poor prognosis in patients with prostate cancer undergoing radical prostatectomy. *Molecular Medicine Reports*, 12(1), 1298–1304. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.3455>
- Zhou, P., Ma, L., Zhou, J., Jiang, M., Rao, E., Zhao, Y., & Guo, F. (2016). miR-

17-92 plays an oncogenic role and conveys chemo-resistance to cisplatin in human prostate cancer cells. *Int J Oncol*, 48(4), 1737–1748.