

**EVALUACIÓN DEL PROTEOGLICANO FIBROMODULINA (FMOD) COMO  
NUEVO BIOMARCADOR DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

**Alfonso Carlos Bettin Martínez, BSc. MSc.**

**Trabajo de tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Biomédicas**

---

**Niradiz Reyes Ramos, PhD.  
Grupo de Investigación Genética y Biología Molecular  
Departamento de Ciencias Básicas  
Facultad de Medicina  
Directora de tesis**



**Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Instituto de Investigaciones Inmunológicas  
Campus Zaragocilla  
Universidad de Cartagena  
2016**

**Nota de aceptación.**

---

---

---

---

---

**Jurado 1**

---

**Jurado 2**

---

**Jurado 3**

**Cartagena, D. T y C. junio de 2016.**

*A mi Madre Escilda Martínez*

*A mi esposa Ruth Bossio*

## **AGRADECIMIENTOS.**

Quiero aprovechar esta oportunidad para agradecer a todas esas personas que de una u otra forma contribuyeron positivamente en mi formación profesional. Especialmente, a la Dra Niradiz Reyes Ramos, mi tutora y guía en todo momento. Una persona que siempre tuvo la mejor disposición y entusiasmo para enseñarme en este duro camino de las ciencias. Le doy las gracias por dejarme hacer parte de su grupo de trabajo y permitirme trabajar en su laboratorio durante todos estos años.

También, quiero dejar por escrito mis agradecimientos con las siguientes personas:

- ❖ Juan Rebollo: compañero y amigo de luchas interminables en el grupo de investigación.
- ❖ Ines Benedetti Padrón: nuestra patóloga, compañera y amiga del laboratorio, quien gastó su tiempo para contribuir en los análisis histopatológicos de esta tesis.
- ❖ A los doctores Edgar Cerpa, radiólogo que nos otorgó los cilindros de tejido y al doctor Cesar Redondo que nos otorgó los datos patológicos.
- ❖ A lo doctores Luis Caraballo Gracia y Jesus Olivero Verbel, mis profesores del comité tutorial y que con su incansable dedicación a las ciencias, me ayudaron a comprender que siempre hay una razón en el universo para hacer mejor las cosas.

## TABLA DE CONTENIDO.

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA DE TABLAS. ....</b>	<b>8</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>9</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS. ....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>12</b>
<b>ABSTRACT. ....</b>	<b>14</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>16</b>
<b>MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
<b>Glándula prostática.....</b>	<b>21</b>
<b>Anatomía prostática.....</b>	<b>23</b>
<b>Prostatitis.....</b>	<b>26</b>
<b>Hiperplasia prostática benigna (HPB).....</b>	<b>27</b>
<b>Cáncer de próstata (CaP).....</b>	<b>29</b>
<b>Clasificación TNM del CaP.....</b>	<b>31</b>
<b>Diagnóstico del CaP.....</b>	<b>32</b>
Examen rectal digital (DRE).....	33
Antígeno prostático específico (PSA).....	34
Uso alternativo de PSA en la detección del cáncer de próstata.....	36
Biopsia de próstata.....	39
<b>Biomarcadores en Cáncer de próstata.....</b>	<b>42</b>
<b>Evaluación de nuevos biomarcadores para el CaP. ....</b>	<b>45</b>
Biomarcadores sanguíneos para el CaP.....	47
Biomarcadores en orina.....	49
<b>Líneas celulares de CaP como modelos de estudio. ....</b>	<b>53</b>
Línea celular LNCaP.....	53
Línea celular PC-3.....	54
Línea celular PWR-1E.....	55
<b>Proteoglicanos: Definición y Clasificación.....</b>	<b>56</b>
<b>Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucinas (SLRPs).....</b>	<b>58</b>

<b>Biología de FMOD, organización genómica y proteómica.....</b>	<b>60</b>
<b>Función celular de fibromodulina. ....</b>	<b>64</b>
<b>Relación de FMOD con el cáncer.....</b>	<b>68</b>
<b>OBJETIVOS. ....</b>	<b>73</b>
<b>Objetivo general. ....</b>	<b>73</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>73</b>
<b>METODOLOGÍA. ....</b>	<b>74</b>
<b>Diseño. ....</b>	<b>74</b>
<b>Cultivo de líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas. ....</b>	<b>74</b>
Extracción de RNA total a partir de líneas celulares. ....	76
Síntesis de cDNA a partir de RNA de líneas celulares. ....	77
PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) a partir de cDNA de líneas celulares. ....	78
<b>Paneles de cDNA de muestras clínicas de próstata humana.....</b>	<b>81</b>
PCR cuantitativo en tiempo real a partir de cDNA de paneles comerciales. ....	82
<b>Biopsias de pacientes con CaP y HPB. ....</b>	<b>83</b>
Muestras clínicas.....	83
Extracción de RNA total a partir de biopsias.....	84
Síntesis de cDNA a partir de RNA de biopsias. ....	86
PCR cuantitativo en tiempo real a partir de biopsias.....	86
<b>Inmunohistoquímica (IHQ) de fibromodulina a partir de biopsias. ....</b>	<b>87</b>
<b>Inmunoensayos enzimáticos (ELISAs) para FMOD Y PSA en pacientes con CaP y HPB. ....</b>	<b>89</b>
Recolección de las muestras de sangre y orina.....	90
Muestras de suero. ....	90
Muestras de orina. ....	91
Grupo control.....	91
<b>Ensayo ELISA para fibromodulina.....</b>	<b>92</b>
Estándares de fibromodulina. ....	92
Procedimiento del Ensayo: ....	93
Cuantificación de fibromodulina.....	93
<b>Ensayo ELISA para PSA. ....</b>	<b>94</b>
Procedimiento del ensayo PSA. ....	95
Cuantificación de PSA.....	95
<b>Características operativas de fibromodulina. ....</b>	<b>96</b>

<b>RESULTADOS.</b> .....	<b>97</b>
Expresión del transcrito FMOD en líneas celulares de cáncer de próstata.....	97
Expresión del transcrito FMOD en paneles comerciales de cáncer de próstata. ....	102
Expresión del transcrito FMOD en biopsias de pacientes con cáncer y otros desordenes prostáticos benignos. ....	105
Inmunohistoquímica en biopsias de tejido prostático.....	111
Niveles proteicos de fibromodulina en suero de pacientes con HPB y CaP.....	115
Niveles proteicos de fibromodulina en orina de pacientes con HPB y CaP. ....	120
Características operativas de FMOD como nuevo biomarcador del CaP. ....	126
<b>DISCUSIÓN.</b> .....	<b>132</b>
<b>CONCLUSIONES.</b> .....	<b>148</b>
<b>ANEXO 1.</b> .....	<b>151</b>
<b>ANEXO 2.</b> .....	<b>152</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.</b> .....	<b>153</b>

## LISTA DE TABLAS.

<b>Tabla 1.</b> Fases para el desarrollo de biomarcadores en cáncer.....	43
<b>Tabla 2.</b> Información de transcritos y proteínas para el gen FMOD.....	62
<b>Tabla 3.</b> Lista de cebadores utilizados en el estudio.....	80
<b>Tabla 4.</b> Perfiles de expresión de FMOD y PSA en las líneas celulares de próstata humana.....	99
<b>Tabla 5.</b> Características generales de los pacientes.....	107
<b>Tabla 6.</b> Perfil de expresión de FMOD en biopsias de tejido prostático.....	108
<b>Tabla 7.</b> Niveles séricos y curvas ROC para tres categorías de acuerdo al grupo analizado.....	128
<b>Tabla 8.</b> Características operativas de los niveles de fibromodulina en orina (ng/mL).....	129

## LISTA DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b> Ubicación anatómica y representación esquemática de las zonas de la próstata.....	25
<b>Figura 2.</b> Distribución tisular de las familias de proteoglicanos.....	57
<b>Figura 3.</b> Organización estructural de los proteoglicanos SLRPs. ....	59
<b>Figura 4.</b> Organización genómica y estructural de FMOD. ....	63
<b>Figura 5.</b> Frecuencia de mutaciones de FMOD en muestras de 13 tejidos tumorales depositados en COSMIC. ....	72
<b>Figura 6.</b> Niveles de expresión del transcrito FMOD en las líneas celulares. ...	100
<b>Figura 7.</b> Curvas de amplificación para FMOD y PSA en líneas celulares. ....	101
<b>Figura 8.</b> Niveles del transcrito FMOD en muestras clínicas comerciales de CaP humano. ....	104
<b>Figura 9.</b> Niveles del transcrito FMOD en pacientes diagnosticados con HPB y cáncer de próstata a partir de biopsia. ....	110
<b>Figura 10.</b> Expresión proteica de fibromodulina en secciones de tejido prostático.....	112

<b>Figura 11.</b> Distribución de la intensidad de la señal de fibromodulina en tejido prostático.....	114
<b>Figura 12.</b> Niveles proteicos de fibromodulina en muestras de suero.....	117
<b>Figura 13.</b> Distribución de las Concentraciones séricas de acuerdo a la Edad, VP y puntaje de Gleason. ....	119
<b>Figura 14.</b> Niveles proteicos de fibromodulina en muestras de orina.....	121
<b>Figura 15.</b> Fibromodulina en orina normalizado frente a los volúmenes prostáticos. ....	122
<b>Figura 16.</b> Distribución de las Concentraciones de fibromodulina en orina de acuerdo a la edad y el VP. ....	124
<b>Figura 17.</b> Comparación entre los niveles séricos y urinarios de fibromodulina en los tres grupos de estudio. ....	125
<b>Figura 18.</b> Curvas ROC distribuidas por tipo de muestra y de acuerdo la categoría analizada. ....	131

## LISTA DE ABREVIATURAS.

**FMOD:** símbolo del gen que codifica la proteína fibromodulina.

**PG:** proteoglicanos.

**CaP:** cáncer de próstata.

**HPB:** hiperplasia prostática benigna.

**DRE:** examen rectal digital / tacto rectal digital.

**TRUS:** biopsia transrectal guiada por ultrasonido.

**PSA:** antígeno específico de la próstata / Antígeno prostático específico.

**PSAD:** densidad de PSA.

**VP:** volumen prostático.

**SLRPs:** proteoglicanos pequeños ricos en leucinas.

**TNM:** clasificación del tumor, nódulo, metástasis.

**GS:** score de Gleason / puntuación de Gleason.

**LNCaP:** línea celular de cáncer de próstata de nódulo linfático.

**PC-3:** línea celular de cáncer de próstata altamente metastásico.

**PWR-1E:** línea celular de epitelio prostático no tumorigénica.

**cDNA:** ácido desoxirribonucleico complementario.

## RESUMEN.

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tumor maligno diagnosticado a nivel mundial; en Colombia, es la segunda causa de muerte en hombres mayores de 65 años. Actualmente, los métodos para el diagnóstico y pronóstico son inadecuados. En los últimos años un gran número de nuevos marcadores potenciales para el CaP se han descubierto, sin embargo, aún se encuentran en fase de experimentación, por lo que se recomienda continuar investigando en este campo. En este sentido, este estudio evaluó el potencial del proteoglicano fibromodulina como nuevo biomarcador del CaP en dos etapas: en la primera, validó el perfil de expresión del transcrito FMOD en líneas celulares con diferentes fenotipos metastásicos y en muestras clínicas comerciales de CaP y tejido benigno, y en biopsias de pacientes lo evaluó a nivel de transcrito y proteína. La segunda etapa, evaluó los niveles proteicos en suero y orina de individuos sanos, con CaP y otros desordenes prostáticos; luego, se calcularon las características operativas como nuevo biomarcador. La línea LNCaP tuvo una expresión de FMOD significativamente mayor que la línea PC-3 de fenotipo altamente agresivo ( $p=0.0001$ ), comparado con la línea no tumorigénica (PWR-1E). En las muestras clínicas comerciales fue mayor en individuos con cáncer ( $n=10$ ) vs sin cáncer (grupo normal, HPB y prostatitis ( $n=38$ )) ( $p = 0.0284$ ). En la cohorte de 90 pacientes, los niveles del transcrito FMOD fueron mayores en el grupo de CaP vs HPB ( $p=0.003$ ). La tinción inmunohistoquímica de la proteína fibromodulina fue más intensa en los acinos glandulares malignos que en los benignos adyacentes dentro de la misma muestra. En el tejido canceroso la tinción fue tanto en el

citoplasma como en el núcleo de las células epiteliales y con mayor expresión que en el estroma circundante. En el tejido benigno, la tinción fue negativa en las células epiteliales y débil en el estroma. No se encontró correlación significativa entre la expresión de FMOD y la edad, grado de lesión del tumor (Gleason score) y volumen prostático (VP). Los niveles séricos en CaP (media: 12.09 ng/mL/VP; IC:7.414 – 16.77) fueron significativamente mayores que en los pacientes con HPB (media: 5.705 ng/mL/VP; IC: 3.586 – 7.825) ( $p=0.031$ ), comparados con el grupo control (media: 0.45 ng/mL; IC: 0.129 – 0.771 ng/mL). En orina los niveles fueron mayores en los tres grupos comparados con los niveles séricos. Para el grupo control (14.77 ng/mL; IC: 5.076 – 24.47ng/mL); HPB (16.16 ng/mL; IC: 6.95 – 25.41 ng/mL) y CaP (36.96 ng/mL; IC: 25.25 – 48.68 ng/mL). Las características de FMOD en orina para diferenciar un individuo con cáncer de un individuo sano o con una enfermedad benigna fue significativa en las tres categorías analizadas, independientemente del VP. En la categoría C el área bajo la curva (AUC=0.76) fue mayor a la categoría B (AUC=0.73) y A (AUC=0.71). Lo más significativo que se observó entre las tres categorías fue el hecho que el VP aumentó el desempeño de la prueba tanto en sangre como en orina, indicando que este parámetro influye positivamente en la sensibilidad y especificidad de la prueba. Este es el primer estudio que indica que fibromodulina tiene el potencial de nuevo biomarcador, de fácil detección y mínimamente invasivo para el CaP. La validación de estos resultados requiere de estudios prospectivos que utilicen una cohorte mayor de pacientes, así como de ensayos clínicos multicéntricos para definir el valor de FMOD como un biomarcador del CaP.

## ABSTRACT.

Prostate cancer (PCa) is the second malignancy diagnosed worldwide; in Colombia, it is the second leading cause of death in men over 65 years. Currently, methods for the diagnosis and prognosis are inadequate. In recent years a large number of new potential markers for PCa have been discovered, however, they are still in the experimental stage, so it is recommended to continue research in this area. In this regard, this study evaluated the potential of fibromodulin proteoglycan as a new biomarker for PCa in two stages: in the first, we validated the expression profile of the transcript FMOD in cell lines with different metastatic phenotypes, commercial clinical samples of both PCa and benign tissue, and biopsies of patients. Additionally, we also assessed protein level in biopsies samples. In the second stage, we assessed protein levels in serum and urine of healthy individuals with PCa and other prostate disorders (BPH); Then, the operating characteristics as a new biomarker were calculated using ROC analysis. The LNCaP line had a significantly higher expression of FMOD the line PC-3 highly aggressive phenotype ( $p = 0.0001$ ), compared to non-tumorigenic line (PWR-1E). In commercial clinical specimens it was greater in individuals with cancer ( $n = 10$ ) vs non-cancer (normal group, BPH and prostatitis ( $n = 38$ )) ( $p = 0.0284$ ). In the cohort of 90 patients, FMOD transcript levels were higher in PCa vs BPH group ( $p = 0.003$ ). In the same histological core, fibromodulin staining was more intense in malignant glandular acini than in adjacent benign one. In cancer tissue staining it was in both the cytoplasm and nucleus of epithelial cells and increased expression in the

surrounding stroma. In benign tissue, the staining was negative and in epithelial cells in the stroma the expression was weak. No significant correlation between the expression of FMOD and age, degree of injury tumor (Gleason score) and prostate volume (PV) was found. Serum levels in PCa (mean: 12.09 ng/mL/VP CI 7.414 - 16.77) were significantly higher than in patients with BPH (mean: 5.705 ng/mL/VP CI 3.586-7.825) ( $p = 0.031$ ) compared with the control group (mean: 0.45 ng/mL, CI: 0.129 to 0.771 ng/mL). Urine levels were higher in the three groups compared with serum levels. For the control group urine levels were 14.77 ng/mL (CI: 5.076 - 24.47ng/mL); for BPH, 16.16 ng/mL (CI: 6.95 - 25.41 ng/mL) and for PCa, 36.96 ng/mL (CI: 25.25 - 48.68 ng/mL). FMOD present in urine allowed to distinguish between a PCa patient and a healthy individual with or without benign disease, being significant in all three categories analyzed, regardless of the VP. In category C the area under the curve (AUC = 0.76) was higher than category B (AUC = 0.73) and A (AUC = 0.71). The most significant was observed between the three categories, and it was that VP increased test performance in both blood and urine, indicating that this parameter has a positive effect on the sensitivity and specificity of the test. This is the first study indicating that fibromodulin has the potential as a new biomarker, easy detection and minimally invasive for PCa. Validation of these results requires prospective studies using a larger cohort of patients, as well as multicenter clinical trials, to define the value of FMOD as a biomarker for PCa.

## INTRODUCCIÓN.

El cáncer es una enfermedad del genoma, por lo tanto, todos los cánceres surgen como resultado de los cambios que han ocurrido en la secuencia de ADN de los genomas de las células cancerosas (1). Durante el último cuarto de siglo se ha aprendido mucho acerca de los cambios y los genes anormales que operan en los cánceres humanos gracias a los avances en las tecnologías de alto rendimiento, como el análisis de los perfiles de expresión génica, la secuenciación de próxima generación, la proteómica y la metabolómica, que en conjunto han permitido la caracterización molecular detallada de diversos tumores (2). La integración y el análisis de estos datos de alto rendimiento han desentrañado nuevas alteraciones moleculares en los tumores, llegando al punto de caracterizar genes con mutaciones conductoras de cáncer que confieren ventaja de crecimiento a las células cancerosas y genes con mutaciones pasajeras que no confieren ninguna ventaja de crecimiento a las células tumorales ni contribuyen al desarrollo del mismo (3); además, muchos de estos eventos genómicos están siendo utilizados en el diagnóstico del cáncer, mientras que otros son dirigidos terapéuticamente. Como resultado de todo lo anterior, las investigaciones sobre biomarcadores se ha desplazado hacia la utilización de los métodos “ómicos” para el descubrimiento y análisis de las aberraciones en el ADN, el ARN y más recientemente, para el análisis de los mecanismos epigenéticos del tumor (2, 4).

El cáncer de próstata (CaP) es el segundo tumor maligno diagnosticado en hombres a nivel mundial; actualmente se estima que aproximadamente uno de cada 6 hombres será diagnosticado con cáncer de próstata y uno de cada 36 morirá por esta causa (5). En Colombia, el Instituto de Nacional de Cancerología indica que el adenocarcinoma de próstata es la segunda causa de muerte en hombres mayores de 65 años, representando una enfermedad de alta carga socio-económica para el país, alcanzando incidencias de 6.521 casos por año (30/100.000 habitantes) (6). El gran impacto que tiene esta enfermedad en la población se debe en parte a los métodos de detección, los cuales son inadecuados para su diagnóstico y pronóstico, trayendo consigo un manejo clínico inadecuado y tardío (7, 8).

Actualmente, en la práctica clínica el diagnóstico del CaP se basa en el uso del examen rectal digital (ERD), el antígeno prostático específico (PSA) y la biopsia transrectal guiada por ecografía (TRUS biopsy), los cuales forman la triada diagnóstica. La evidencia actual indica que el método ERD a pesar de que es rápido, simple y relativamente sin dolor, este aprecia sólo una pequeña área de la próstata, por lo que un examen sospechoso sólo confiere la oportunidad de detectar entre el 20 y 25% de los cánceres (9, 10). Por su parte el PSA, que es utilizado de forma masiva como el único marcador biológico, no es específico de tumor, y a menudo, está elevado en condiciones benignas como la hiperplasia (HPB) y prostatitis, lo que resulta en la aplicación de tratamientos excesivos en hombres con bajo riesgo de cáncer (11, 12); además, una proporción significativa

de hombres con niveles normales de PSA ( $\leq 4.0$  ng/ml) tiene CaP (9, 13). La biopsia transrectal es el último recurso de la triada diagnóstica; un procedimiento claramente invasivo que tiene una baja tolerabilidad y conlleva a un riesgo significativo de bacteriemias en el paciente (10); su principal limitante es que solo una pequeña porción de la glándula prostática se logra muestrear, por lo que cánceres clínicamente significativos pueden perderse, lo que reduce la sensibilidad (32 %) y especificidad (51 %) del diagnóstico (10).

En conjunto, todo lo anterior pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevos y mejores marcadores que permitan un diagnóstico oportuno, una adecuada predicción del comportamiento clínico, o que de alguna forma permitan potenciar el valor clínico del PSA (11, 14). En este sentido, en los últimos años un gran número de nuevos marcadores potenciales para el CaP se han descubierto (14, 15), sin embargo, estos aún se encuentran en fase de experimentación, por lo que expertos recomiendan continuar con las investigaciones en este campo con el fin de mejorar el panorama actual (14, 15). Siguiendo este orden de ideas, nuestro grupo de investigación en un estudio previo (12), a través de un análisis de micro matrices de ADN (*microarrays*) en líneas celulares de próstata de rata determino que la expresión génica de fibromodulina (FMOD) estuvo asociada a fenotipos metastásicos en el modelo estudiado (12), y con base en este análisis, es que FMOD se convirtió en nuestro objeto de estudio para ser validado en humanos.

Fibromodulina es un miembro de los proteoglicanos pequeños ricos en leucinas (SLRPs) cuya función principal está relacionada con la maduración y ensamblaje de las fibras de colágeno en la matriz extracelular (16-18); sin embargo, para este proteoglicano funciones adicionales han sido descritas recientemente, incluyendo su acción moduladora en la actividad del TGF- $\beta$  durante la reparación de tejidos (19, 20); su papel como estimulador de procesos angiogénicos, especialmente en el crecimiento de células endoteliales, migración y formación de redes capilares (21), y adicionalmente, también ha sido asociado con la respuesta inflamatoria a través de la activación de la vía clásica del sistema de complemento (22). En cuanto a su relación con cáncer, los primeros hallazgos provienen de estudios en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica de células B (CLL-B) donde se encontró significativamente sobre-expresado (23, 24); luego fue caracterizado como un antígeno asociado a tumor (TAA), debido a su potencial para generar una respuesta antitumoral específica, permitiendo seleccionar linfocitos T CD8+ específicos de tumor (25). Otro aspecto que resulto interesante en la biología de FMOD es el hecho de que otros miembros de la misma familia de proteoglicanos SLRPs han sido relacionados con la regulación del crecimiento celular y el inicio de la tumorigénesis (26, 27). Cabe resaltar que para nuestro conocimiento, este gen no ha sido reportado previamente en cáncer de próstata (28, 29); por lo tanto, tiene el potencial de ser evaluado como nuevo biomarcador para esta enfermedad. Para lograr este propósito, en este estudio inicialmente se validó el perfil de expresión del transcrito FMOD a nivel de líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas con diferentes fenotipos metastásicos, así como en paneles

comerciales de cáncer de próstata y tejido prostático benigno. De igual forma se determinó la expresión de FMOD como transcrito y proteína en biopsias de pacientes con cáncer y también se evaluaron los niveles proteicos en sangre y orina de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata y otros desordenes prostáticos. Finalmente, se evaluaron internamente sus características operativas como nuevo biomarcador de cáncer de próstata en un grupo de pacientes y controles.

Los hallazgos más relevantes de este estudio se encuentran reportados en las siguientes publicaciones:

1. Bettin A, Reyes I and Reyes N. *Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer*. Int J Biol Markers. **2016**; 31(2): e153 - e162.
2. Reyes, N. Benedetti I, Bettin A, Rebollo J and Geliebter J.. *The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue*. Cancer Biomark, **2016**. 16(1): p. 191-202.

## MARCO TEÓRICO.

### Glándula prostática.

La palabra "*próstata*" proviene de la expresión griega *προστάτης* (prostates) que significa "*que está delante*", es decir, indica la posición de la glándula que vista del suelo pélvico se encuentra ubicada delante de la vejiga urinaria (Harper, Douglas. "Prostate". Online Etymology Dictionary). La próstata es la glándula universal del sistema reproductor de todos los mamíferos machos conocidos, la cual realiza funciones de secreción durante tres cuartas partes de la vida, gracias al efecto que ejerce la hormona androgénica testosterona y otras hormonas como estrógenos y esteroides suprarrenales, los cuales, en conjunto, producen diferentes efectos sobre la próstata dependiendo de la etapa del desarrollo (vida fetal, neonatal, la pubertad, la edad adulta, y el envejecimiento). En principio, la próstata es muy sensible a los estrógenos, a los 5 meses de gestación se desarrolla una extensa metaplasia de células escamosas que alcanza su máximo desarrollo a las 36 semanas. Después del nacimiento, este crecimiento de células escamosas disminuye y a la edad de 3 mes, la próstata se ha reducido en tamaño (30). Durante el curso de la vida, en respuesta a la regulación endocrina, la próstata pasa por una fase rápida de crecimiento en la pubertad, luego mantiene su tamaño y finalmente, en algunos casos, se ve sometida a un crecimiento anormal con el envejecimiento lo que puede conducir al desarrollo de cualquiera de las enfermedades benignas o malignas conocidas. Aunque el tamaño varía de persona a persona durante la vida, en promedio puede estar entre 20 y 25 gramos (1 onza) y aproximadamente 4 cm de ancho y 3 cm de espesor, por eso se dice

que su tamaño va desde el de una nuez hasta el de una manzana pequeña (30). En conclusión, la próstata presenta dos tipos de crecimiento: uno fisiológico que es parte de la maduración de dicho órgano, el cual se presenta durante la pubertad o juventud temprana, y otro que es de tipo degenerativo el cual se da después de los 45 años y que es el causante de trastornos urinarios o motivo de enfermedad en dicho órgano.

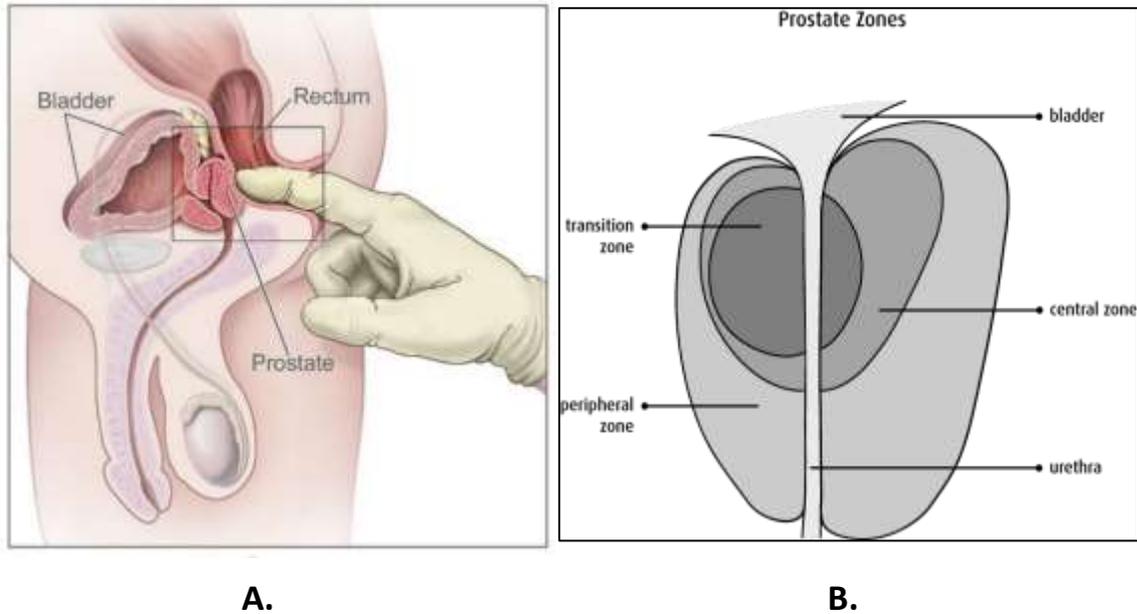
La próstata dista mucho de ser un órgano accesorio o prescindible en el hombre. Su ubicación la convierte en un órgano esencial para la función sexual, reproductiva y urinaria. Se encuentra debajo de la vejiga y rodeando la uretra, comparte vascularización con las vesículas seminales, la vejiga, el recto y la uretra; además, forma parte del aparato esfinteriano urinario (ver Figura 1A). Todas las enfermedades que la afectan pueden conllevar a síntomas relacionados con estos sistemas y de ser permanentes, pueden generar daños irreversibles, así como llegar a comprometer la vida del individuo (31). La próstata tiene como función principal producir el líquido prostático que forma parte del semen. Esta secreción prostática contiene muchas enzimas, como el antígeno específico de la próstata (PSA) y esperminas que en conjunto aumentan la movilidad del semen y evitan su coagulación, además proporciona al semen, nutrientes y un medio adecuado para la supervivencia de los espermatozoides.

La próstata también desempeña un papel en el control del flujo de orina, debido a que la porción fibromuscular de la glándula ejerce una presión directa contra la parte de la uretra que rodea y de esta manera se reduce la velocidad y se detiene el flujo de orina durante la micción. Estas características anatómicas propician que todos los cambios y procesos tanto benignos como malignos en la glándula provoquen alteraciones notables en la micción (30, 32).

### **Anatomía prostática.**

Desde el punto de vista histológico, la glándula prostática está cubierta por una capa de tejido conectivo denominado capsula prostática. Dentro de esta capsula se encuentran diferentes tipos de células, tales como: células epiteliales glandulares organizadas en forma de acinos, las cuales se encargan de producir el líquido prostático que forma el semen; las células musculares, que controlan el flujo de orina y la eyaculación; y las células fibrosas, que proporcionan la estructura de apoyo de la glándula. A su vez, estas células se encuentran organizadas de dos formas: *la unidad epitelial*, formada por las células secretorias, las basales, madres y neuroendocrinas; y *la unidad estromal*, formada por el músculo liso, fibroblastos, vasos sanguíneos, células neuronales y las células inmunológicas (30, 32).

El modelo anatómico que actualmente se acepta para la glándula, distingue tres zonas diferentes que van desde la más interna que rodea la uretra, hasta las más externa rodeada por la capsula (ver Figura 1 B). En este sentido, aparece la *zona de transición*, que se encuentra en el interior de la glándula y es la parte más pequeña, ocupa aproximadamente el 10% del volumen de la glándula y rodea la uretra entre la vejiga y el tercio superior de la uretra. Esta zona puede llegar a constituir alrededor del 20% de la glándula hasta la edad de 40 años. Luego, puede comenzar a aumentar, hasta que se convierte en la mayor superficie de la próstata, produciendo lo que se conoce como hiperplasia prostática benigna (HPB). *La zona central* (ver Figura 1 B), rodea la zona de transición y constituye aproximadamente un cuarto de la masa total; aquí es donde el conducto común de la próstata, el conducto seminal y las vesículas seminales se encuentran; este conducto se conoce también como el conducto eyaculador (Ductus ejaculatorius). Esta zona es la parte de la próstata que está más lejos del recto, y debido a esto los tumores de próstata en esta zona no se pueden sentir durante el examen rectal digital (DRE). Por último, se encuentra *la zona periférica* la cual es de origen endodérmico y a su vez es la región anatómica más grande de la próstata glandular, ocupa el 75% del volumen total y es el área que está más cerca del recto, por lo que puede ser fácilmente percibida por el médico durante un examen rectal digital; además, es la zona donde la mayoría de los tumores de próstata se desarrollan (aproximadamente 75%).



**Figura 1. Ubicación anatómica y Representación esquemática de las zonas de la próstata.** (A) la próstata se encuentra localizada en la cavidad pélvica del hombre, detrás del pubis, delante del recto, debajo de la vejiga urinaria (Bladder) y por encima de los músculos de la pelvis. Ya que el recto está detrás de la próstata, es posible palpar la glándula usando el tacto. Fuente: [https://en.wikipedia.org/wiki/Prostate#/media/File:Digital\\_rectal\\_exam\\_nci-vol-7136-300.jpg](https://en.wikipedia.org/wiki/Prostate#/media/File:Digital_rectal_exam_nci-vol-7136-300.jpg). (B) La próstata puede dividirse en partes: la zona transicional, la zona central, la zona periférica y el estroma fibromuscular. Los conductos de la glándula desembocan en la uretra que pasa por la próstata. Fuente: <http://www.cancer.ca/en/cancer-information/cancer-type/prostate/anatomy-and-physiology/?region=on#ixzz40lqdqgXv>.

Fundamentalmente, son tres los procesos patológicos que pueden desarrollarse en la próstata: la prostatitis y la hiperplasia prostática benigna (HPB) clasificadas como patologías benignas, y el adenocarcinoma de próstata o cáncer de próstata (CaP) denominado la patología maligna. A continuación, se describirán las principales características de estas tres patologías.

### **Prostatitis.**

El término prostatitis se utiliza para definir aquellos procesos de naturaleza inflamatoria o infecciosa que afectan a la glándula prostática. Son procesos benignos y su padecimiento no tiene relación directa con la probabilidad de padecer hiperplasia benigna de próstata o cáncer de próstata. La inflamación secundaria al proceso infeccioso se puede clasificar como prostatitis de tipo aguda o crónica según su tiempo de evolución y número de episodios inflamatorios (33). Esta se puede presentar en la juventud como un fenómeno asociado a infecciones de transmisión sexual o infecciones urinarias, generando síntomas como ardor al orinar y deseos de hacerlo con una mayor frecuencia; dolores lumbosacro, perineal, en el pene y a nivel rectal; también, genera fiebre, artralgias y mialgias en general. El tratamiento es exitoso y amerita el uso de antibióticos por largo tiempo, y su complicación mayor es el desarrollo de un absceso en la próstata (32). Existen otros procesos inflamatorios de la próstata que no tienen un origen infeccioso sino propiamente generados por diversos factores inmunológicos, hormonales y humorales, que conllevan a los mismos síntomas de la prostatitis

infecciosa; en esos casos, aunque clínicamente no se diferencian son tratados de la misma forma y su diagnóstico final es a través de la biopsia transrectal (33).

Finalmente, la prostatitis es un trastorno de salud muy común en los hombres, y la padecen alrededor de un 25% de los hombres jóvenes que acuden a la atención médica por cuestiones relacionadas con los sistemas genital y urinario.

### **Hiperplasia prostática benigna (HPB).**

La hiperplasia prostática benigna (HPB) es un aumento del tamaño de la próstata. Involucra la hiperplasia (un aumento en el número de células) tanto del estroma como de las células epiteliales, lo que resulta en la formación de nódulos grandes bastante discretos en la zona de transición que cuando son lo suficientemente grandes, ejercen presión sobre la uretra y aumentan la resistencia al flujo de orina desde la vejiga, causando obstrucción. Esta resistencia al flujo de la orina desde la vejiga implica un mayor esfuerzo durante la micción, lo que puede dar lugar a la hiperplasia progresiva, inestabilidad o debilidad (atonía) del músculo de la vejiga (34). Esta enfermedad es la que con mayor frecuencia se presentan en hombres adultos de edad avanzada y constituye la primera causa de consulta en los servicios de urología y la segunda causa de ingreso para intervención quirúrgica (32).

En la génesis de la HPB se han descrito diversos factores, que en algunas ocasiones no se puede demostrar su participación activa pero sí se puede afirmar que son necesarios para su desarrollo. Se ha sugerido que una edad superior a 50

años y la presencia de hormonas androgénicas producidas por los testículos juegan un papel importante en la génesis de HPB, así como la existencia en la célula prostática de altos niveles de la enzima 5- $\alpha$ -reductasa, implicada en la conversión de la testosterona en dihidrotestosterona (DHT), el metabolito activo (35). Otra evidencia, indica que no se desarrolla HPB en individuos castrados antes de la pubertad y es raro que se desarrolle en aquellos castrados después de la pubertad, y aunque histológicamente puede aparecer en varones de 40 años, clínicamente se suele manifestar a partir de los 60 años; por esto, algunos autores consideran la edad como un factor importante en la génesis de la enfermedad y aseguran que con el envejecimiento se produce una serie de cambios morfológicos a nivel de la zona cervical de la vejiga en su unión con la uretra y la próstata, pudiendo comprimir ésta a partir del lóbulo medio, elevando la zona cervical, variando su eje y favoreciendo la obstrucción (32).

Para el diagnóstico de la HPB se tienen en cuenta la combinación de los siguientes parámetros: síntomas de obstrucción de flujo urinario, tamaño prostático determinado por el examen rectal digital, determinación de los niveles séricos de PSA y la edad como condición para el desarrollo de la misma (36). La determinación del PSA es útil en el control y seguimiento de pacientes con HPB, pero no es lo suficientemente específico como para distinguir la hiperplasia del cáncer. En general, la mayoría de los pacientes que solicitan un diagnóstico y tratamiento, lo hacen en relación a las molestias que afectan su calidad de vida (32).

En conclusión, la HPB es una enfermedad progresiva que va desde el aumento del volumen de la próstata hasta la reducción de las tasas de flujo urinario máximo. Además, El PSA y el volumen de la próstata son predictores comunes de progresión clínica, e impactan directamente en el inicio temprano de la terapia en pacientes identificados como de alto riesgo (34).

### **Cáncer de próstata (CaP).**

La mayoría de los cánceres de próstata (CaP) tienen lugar en la zona periférica de la próstata (hasta 80%), aunque se ha reportado CaP en un 15% en la zona de transición y en un 5% en la zona central. El cáncer de próstata es el segundo tumor maligno diagnosticado en hombres a nivel mundial; actualmente se estima que aproximadamente el 15% de los tumores masculinos son de origen prostático en países desarrollados, y el 4% en las naciones en vías de desarrollo (5). En Colombia, el Instituto de Nacional de Cancerología indica que el adenocarcinoma de próstata es la segunda causa de muerte en hombres mayores de 65 años, representando una enfermedad de alta carga socio-económica para el país. Se estiman, por diferentes fuentes, entre 6.500 y 8.000 casos nuevos de cáncer de próstata cada año, con una tasa ajustada por edad, que oscila entre 40.5 y 45.9 por cada 100.000 hombres. La enfermedad muestra una mayor incidencia en hombres mayores de 60 años, con un riesgo acumulado de tener cáncer de próstata antes de los 75 años del 4.3 % (31).

De acuerdo con el estudio de *“Evolución de la mortalidad por cáncer de próstata en Colombia”* (37), la tasa de mortalidad ha tenido una disminución en los últimos 4 años (tasas < 10 por cada 100.000 fallecimientos), de forma similar a otros países con amplio uso del PSA, como lo reportan Reino Unido y España, entre otros. Sin embargo, el estudio recomienda que se deben optimizar las estrategias de atención urológica en regiones con predominio de raza negra y población rural, donde las tasas son superiores al promedio; siendo los departamentos del César y Valle los que concentran las mayores tasas de mortalidad. La mortalidad actual es comparable con otros países latinoamericanos y en vías de desarrollo, por lo que los investigadores concluyen que el avance de programas de atención urológica debería permitir mantener estables o continuar disminuyendo las tasas de mortalidad, durante el envejecimiento de la población colombiana, en los próximos años (37).

El riesgo que tienen los hombres hoy en día de ser diagnosticados con cáncer de próstata en algún momento de su vida está cerca del 16%; este riesgo se relaciona especialmente con la edad, por ejemplo, a los 50 años el riesgo de encontrar focos microscópicos de cáncer en la próstata es de cerca del 42% y a los 80 años puede superar el 70% (31). Los factores de riesgo asociados con la enfermedad pueden ser divididos en aquellos no modificables en los que se encuentran la edad, la raza negra y la historia familiar (mutaciones, polimorfismos y genes aun no identificados); hombres que tuvieron o tienen a su padre o un hermano afectado por esta enfermedad tienen un riesgo dos a tres veces mayor; este riesgo se modifica por variables como el número de familiares afectados y la

edad a la cual se les hizo el diagnóstico: entre mayor número de familiares y más jóvenes, mayor el riesgo. El otro grupo de factores de riesgo son los externos, y aunque menos estudiados, podrían tener impacto en algún grado, entre ellos se destacan un consumo alto de grasas saturadas, un mayor índice de masa corporal, el consumo de alcohol y el hábito de fumar (31).

### **Clasificación TNM del CaP.**

El cáncer de próstata suele tener su origen en más del 70% de las veces en la zona periférica, y su tipo histológico más predominantemente es el adenocarcinoma; el cual tiene la particularidad de ser multifocal (50-97% de los casos) y se caracteriza por su progresión local inicialmente y una diseminación linfática ordenada a los ganglios linfáticos ilíacos, obturadores, pélvicos y sacros, para tener finalmente el hueso como principal órgano sólido de compromiso metastásico (31). Como consecuencia de lo anterior, fue necesario desarrollar la clasificación internacional TNM para valorar la extensión del adenocarcinoma de próstata en el paciente, y así poder clasificarlo en un estadio clínico definido. En esta clasificación, la **T** significa tumor primario y representa la extensión del cáncer dentro de la próstata y en los tejidos directamente vecinos; la **N** significa nódulos linfáticos e indica si el cáncer de próstata ha invadido nódulos linfáticos cercanos; la **M** significa metástasis e indica si el cáncer ha invadido tejidos lejanos como hueso y pulmones. Estas letras son seguidas por un número de 0 a 4 representando la extensión del tumor y ocasionalmente alguna letra minúscula que

representa información adicional. Así, estadio **T0**, sin evidencia de cáncer; estadio **T1**, el cáncer está confinado a la próstata y ha sido detectado por los métodos diagnósticos iniciales de mayor sensibilidad (Biopsia); estadio **T2**, el cáncer está confinado a la próstata y ha sido detectado por los métodos diagnósticos iniciales de mayor sensibilidad y ocasionalmente por los de menor sensibilidad (examen rectal digital); estadio **T3**, el cáncer se ha extendido a los tejidos inmediatamente vecinos a la próstata y/o a las vesículas seminales; y finalmente en el estadio **T4**, el cáncer se ha extendido a los órganos vecinos como la vejiga. Los estadios N y M son representados como N+ y M+, cuando son positivas y seguidas de números y/o letras en orden progresivo de acuerdo a su tamaño y extensión. Por ejemplo, si el reporte patológico indica **T2N0M0**, significa que el tumor está confinado en la próstata, NO tiene metástasis ganglionares regionales y mucho menos metástasis a gran distancia. Se trata de un cáncer localizado de bajo riesgo (31).

### **Diagnóstico del CaP.**

Actualmente en la práctica clínica el diagnóstico del Cáncer de próstata se basa en el uso del examen rectal digital (DRE), el antígeno prostático específico (PSA) y la biopsia transrectal guiada por ecografía (TRUS biopsy), los cuales forman la triada diagnóstica (7, 8).

### **Examen rectal digital (DRE).**

El DRE por sus siglas en inglés (*digital rectal examination*) es una herramienta útil en la evaluación de la próstata en términos de su forma, simetría, firmeza y nodularidad; además, es útil para descartar la existencia de enfermedades neurológicas, evaluar el tono del esfínter y detectar anomalías rectales que pueden causar síntomas de hiperplasia prostática benigna (HPB) (38). Durante la inspección rectal, el urólogo anuncia su resultado como un tacto rectal normal o anormal, en este último caso, se detecta un agrandamiento de la próstata que puede estar asociado a dolor o la necesidad de orinar durante el examen. Este fenómeno se describe como un abultamiento detrás de la pared del recto, lo que generalmente se diagnostica como prostatitis o HPB. Para el caso del cáncer de próstata, este lo describen como protuberancias en la superficie normalmente lisa de la próstata y generalmente asociado a una glándula reducida en volumen (38).

Antes de la llegada de las pruebas séricas del antígeno prostático específico (PSA) en 1986, el examen rectal digital era el único método de elección para la detección del cáncer de próstata; actualmente, a pesar de que es reconocido como un método rápido, simple y relativamente sin dolor, la evidencia indica que este procedimiento aprecia sólo una pequeña área de la próstata, por lo que un DRE sospechoso sólo confiere la oportunidad de detectar entre el 20 y 25% de los cánceres en hombres que tienen un nivel de PSA normal (9, 10) . Por lo tanto, este método no puede ser capaz de llegar al diagnóstico definitivo del CaP, y en todos los casos, el médico recomienda la cuantificación sérica de PSA y

dependiendo de sus niveles, puede recomendar un procedimiento mucho más invasivo como la biopsia transrectal guiada por ultrasonido.

### **Antígeno prostático específico (PSA).**

El PSA es una glicoproteína con actividad serino-proteasa de 3.3 kDa, codificada en por el gen KLK3 localizado en el brazo largo del cromosoma 19 (19q13.41). Pertenece a la familia de Calicreínas Humanas de la que se han descrito hasta ahora 15 miembros (39). Su función principal es aumentar la movilidad del semen, evitando su coagulación, por medio de la degradación de las semenogelinas I y II. Alcanza su mayor concentración (0.5 – 5.0 mg/ml) en el compartimento seminal de la glándula prostática donde la proteasa ejerce su acción primaria. Inicialmente se pensaba que era una proteína específica de la próstata, sin embargo, investigaciones posteriores demostraron que el PSA es secretado en pequeñas cantidades por otros tejidos (glándulas perianales, para-uretrales, sudoríparas) e incluso algunos tejidos femeninos (placenta, mama, endometrio) (40).

Su potencial como marcador de CaP inicio en 1986, cuando la agencia administradora de drogas y alimentos de estados unidos (FDA), lo aprobara como marcador de seguimiento del cáncer de próstata, y luego, en 1994 le diera el aval como el único marcador de detección de CaP en hombres mayores de 45 años, designado como puntos de corte valores iguales o mayores que 4.0 mg/ml en sangre (41). Con la utilización masiva de la prueba, se pensó por mucho tiempo que una nueva era en la detección de cáncer de próstata había comenzado; la

prueba de PSA revolucionó la capacidad de detectar, tratar y hacer seguimiento a los pacientes. Antes, solo el 25% de los tumores prostáticos se diagnosticaba en fases tempranas y con el PSA este porcentaje alcanzó el 90%. Así, consecuente con este cambio en el diagnóstico, la mortalidad disminuyó gracias a que se podían realizar acciones curativas. Sin embargo, una década después de su introducción, los ensayos clínicos aleatorizados ERSPC (42) y PLCO (43) presentaron resultados un tanto contradictorios en cuanto a la capacidad de PSA como herramienta de tamizaje y detección del cáncer. El estudio europeo ERSPC (European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer, ERSPC), mostró 20% de reducción en la mortalidad por cáncer de próstata en comparación con el grupo control durante 8 años de tamizaje; mientras que el estudio PLCO (Prostate, Lung, Colon, Ovary, PLCO) no mostró ninguna reducción en la mortalidad, hecho que fue aludido a posibles errores en el manejo del grupo control y a los escasos eventos en el grupo de intervención. Además, el tamizaje con PSA condujo inevitablemente al sobre diagnóstico y sobre tratamiento, como se demostró en el estudio europeo, donde los 1.400 hombres que fueron tamizados con PSA, solo 48 hombres tuvieron que ser tratados para evitar una muerte relacionada con cáncer de próstata (42, 43).

Otros estudios, como los de Stamey y colegas en estados unidos (44), demostraron que PSA no es útil para el diagnóstico de cáncer de próstata, debido a que tumores de pequeño tamaño pueden ser detectados en individuos con niveles bajos de PSA (menor de 2,5 ng/ml); Stamey, también afirmó que los niveles de PSA no se correlacionaron con el volumen del tumor, como se había

encontrado en estudios previos (44). También se ha encontrado, que la probabilidad de detectar el cáncer, cuando la prueba se ubica en la zona gris, es decir, pacientes con niveles de PSA entre 4.0 a 10 ng/ml, es solo del 25% (45). Adicionalmente, se ha evidenciado que hombres con factores de riesgo para desarrollar CaP, presentaban niveles elevados de PSA muchos años o décadas antes del diagnóstico del tumor (46-48). En cuanto a las características operativas del PSA, son muchos los estudios llevados a cabo (15, 49, 50), y varios expresan que el área bajo la curva en los análisis ROC está cercana a los 0.678, lo cual no muestra claridad al momento de escoger los puntos de cortes; además, aunque la especificidad está por encima del 93%, la sensibilidad es muy baja ( 21%) (51). A pesar de todos los argumentos en contra del PSA, actualmente es el biomarcador más utilizado y no existe otro método que lo haya reemplazado. De cualquier forma, estas observaciones apoyan el argumento de seguir buscando biomarcadores más precisos para la enfermedad (46-48).

### **Uso alternativo de PSA en la detección del cáncer de próstata.**

Dada las limitaciones de PSA como una sola prueba, varios métodos alternativos han sido investigados, y todo con el fin de mejorar la precisión diagnóstica del PSA, entre ellos: Puntos de corte de PSA específicos de edad, densidad de PSA (PSAD), velocidad de PSA (PSAV), PSA libre y PSA complejo (14).

En el primer caso, los puntos de corte de PSA específicos de edad, se basan en el concepto de que la concentración de PSA normalmente se incrementa a medida

que los hombres envejecen. Por lo tanto, el PSA ajustado por la edad, podría mejorar la detección de cáncer en hombres más jóvenes (mayor sensibilidad) y disminuir el número de biopsias negativas en hombres mayores (mayor especificidad). Con este enfoque, el punto de corte para maximizar la sensibilidad y la especificidad del PSA teniendo en cuenta la expectativa de vida en países como los EE.UU es 2.0 ng/ml, para hombres con edad menor de 50 años; 3.0 ng/mL en hombres de 50 a 59 años; 4.0 ng/mL de 60-69 años y 7.0 ng/mL para mayores de 70 años (52). Sin embargo, estos valores de referencia actualmente adoptados, no son apropiados en la población asiática (53)..

En cuanto a la densidad de PSA (PSAD), esta se define como el cociente entre la concentración de PSA dividido por el volumen de la glándula prostática. Este cálculo tiene en cuenta el concepto de que los niveles séricos de PSA aumentan proporcionalmente con el volumen del epitelio prostático. Actualmente, varios estudios muestran que los hombres con cáncer de próstata tienen valores significativamente más altos de PSAD (entre 0.10 o 0.15), que los hombres con hiperplasia prostática benigna, mejorando de esta manera la especificidad del PSA (54, 55); y aunque otros estudios no han logrado evidenciar estos resultados, actualmente el PSAD, se considera un fuerte predictor de características patológicas adversas y recurrencia bioquímica después del tratamiento radical (56).

Otro aspecto de las pruebas basadas en PSA, se basan en el hecho de que el PSA que circula en la sangre, se puede medir teniendo en cuenta las dos formas

moleculares en que se presenta; una forma conocida con PSA libre (f-PSA, no unida a proteínas), y otra en forma de complejo que está unido a un inhibidor de proteasa ( $\alpha$ 2-macroglobulina o  $\alpha$ 1-antiquimotripsina). Para que se presente una forma o la otra, primero el PSA debe ser producido como una pre-pro-enzima en las células epiteliales de la próstata, luego, un péptido señal se elimina durante su síntesis y una pro-enzima (zimógeno) es secretada. El pro-PSA secretado, que contiene un péptido de activación de 7 aminoácidos es escindido por una proteasa (calicreina humana 2, hK-2), dando lugar a la forma activa del PSA, el cual puede ejercer su función biológica en el líquido seminal, donde es rápidamente inactivado (39). Estas dos formas de PSA, el pro-PSA y el PSA inactivado son las que se conocen como PSA libre, y cuya fracción oscila entre el 5 y 45% del total de PSA en sangre. El porcentaje restante de PSA que no es inactivado se une irreversiblemente al inhibidor de proteasa  $\alpha$ 1-antiquimotripsina (PSA-ACT) dando lugar a un complejo enzimático inactivo que puede ser medido en sangre como un complejo de PSA (39). De acuerdo con esto, La FDA aprobó el uso de la prueba porcentaje de PSA libre ( $fPSA / PSA_{total} \times 100$ ) como un complemento al PSA-total en hombres que presenten una concentración sérica de PSA total entre 4 y 10 ng/ml. La interpretación es como sigue a continuación: Un porcentaje elevado de PSA libre indica una menor probabilidad de encontrar CaP en la biopsia, y aumenta la probabilidad de que la elevación de PSA total se debe a la presencia de Hiperplasia (HPB) (57, 58). Una evaluación reciente del porcentaje de PSA libre en pacientes sometidos a biopsia, ha sugerido una eficiencia mayor en el diagnóstico (59).

En conclusión, las formas alternativas que se han desarrollado para medir este marcador del CaP, indica la versatilidad que puede llegar a tener un biomarcador al momento de mejorar la exactitud con que se hace el diagnóstico y el seguimiento de la enfermedad.

### **Biopsia de próstata.**

Como se mencionó al inicio de este estudio, la biopsia transrectal con aguja retráctil guiada por ecografía, actualmente es el último y definitivo recurso de la triada diagnóstica del cáncer de próstata. En general, la ecografía transrectal se debe realizar en hombres con un tacto rectal anormal, un PSA elevado ( $> 4.0$  ng/ml) o una velocidad de PSA  $> 0.4$  ng/ml/año. También está indicada en hombres que han sido diagnosticados con neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) y en aquellos con datos atípicos o negativos en una biopsia previa a de 12 meses (60).

Para llevar a cabo el procedimiento, el paciente se coloca ya sea en posición de decúbito lateral izquierdo o derecho, para que se puede insertar fácilmente la sonda rectal, a la cual se le ha aplicado previamente un anestésico tópico, luego, un transductor de 5.0 a 7.5 MHz es utilizado para la formación de las imágenes transrectales de la próstata (60). Básicamente, el procedimiento consiste en la obtención de cilindros o núcleos de tejido prostático de aproximadamente 10 mm de largo por 1 mm de ancho. Se obtiene como mínimo, un núcleo de cada región

del ápice medio y de la base, así como de los lóbulos derecho e izquierdo. Actualmente, muchos urólogos obtienen hasta doce núcleos. Como se trata de un procedimiento invasivo, las complicaciones pueden ir desde la presencia de sangre en la orina (hematuria) que es lo más común (70.8%); hasta una hospitalización por septicemia, la cual ocurre en el rango de 0.4% a 3.4% de los casos. Se ha observado que la hematuria puede llegar a ser persistente en el 47.1% de los pacientes y típicamente dura de 3 a 7 días después de la biopsia. Adicionalmente, complicaciones inmediatas de la ecografía transrectal incluyen un síncope vasovagal (sensación de desmayo) (5.3%) y sangrado rectal (8.3%) (61).

En cuanto al análisis propio de las biopsias, una vez obtenidos los cilindros, estos son enviados al laboratorio de patología clínica donde son utilizados para identificar y clasificar el grado de las lesiones tumorales a través de un análisis histopatológico por microscopia. Este análisis se basa en la puntuación de Gleason (GS), una herramienta histológica que evalúa la agresividad del tumor, y forma parte de la evaluación inicial y final en el manejo del cáncer de próstata (62). El GS se basa en la arquitectura glandular de la muestra o espécimen de la biopsia del tumoral y se divide en cinco diferentes patrones de crecimiento y diferenciación. El procedimiento consiste en seleccionar 2 zonas de la muestra (cilindros) y asignar a cada una de ellas un número del 1 al 5. El 1 corresponde a un tumor bien diferenciado y por lo tanto poco agresivo, mientras que el 5 a un tumor escasamente diferenciado y altamente agresivo. Los valores comprendidos entre el 2 y el 4 se asignan a grados de diferenciación intermedia.

En pocas palabras, la puntuación total se expresa como una ecuación:  $X + Y = Z$ . donde, **X** representa el patrón principal (más frecuente) y **Y** el patrón secundario (el más agresivo). Luego **X** y **Y** se suman para dar **Z**, y esta se toma como el grado Gleason (GS) del tumor, que puede ir desde GS = 2, hasta GS= 10. Por lo tanto, un GS entre 2 y 6 se reporta como un cáncer con escasa agresividad, crecimiento lento y por lo tanto de mejor pronóstico, mientras que un GS = 7 se reporta como agresividad intermedia, y finalmente para aquellas biopsias con GS entre 8 y 10 el cáncer es de alta agresividad y peor pronóstico para el paciente (62).

El principal problema en la aplicación de la puntuación de Gleason, radica en que las muestras de biopsia reflejan la patología de sólo un área específica de la glándula prostática y por lo tanto genera inexactitud al momento del diagnóstico. Además pequeñas áreas de tumor de alto grado pueden pasarse por alto fácilmente, con consecuencias obvias para el puntaje asignado (62, 63). También, las biopsias son frágiles y se rompen fácilmente ya sea durante el procedimiento o durante la preparación para el análisis lo que puede hacer difícil el examen histológico, además, no hay consistencia entre el número de núcleos extraídos en una sola sesión de biopsia. A pesar de estas limitaciones, el sistema de clasificación de Gleason proporciona uno de los métodos diagnósticos y pronósticos individuales más fuertes para analizar el comportamiento clínico del tumor y además es útil en el momento de instaurar el manejo terapéutico del paciente (62, 63).

## **Biomarcadores en Cáncer de próstata.**

Según el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los EE.UU, un marcador biológico es una molécula que al ser medida y evaluada objetivamente es un indicador de procesos biológicos normales o de procesos patogénicos, o indicador de respuestas farmacéuticas para una intervención terapéutica (64). El biomarcador ideal de cáncer, debe ser producido por la enfermedad, cuantificable en los fluidos corporales, sensible y específico para el proceso de la enfermedad, y al ser medido, se correlacione adecuadamente con la evolución de la enfermedad. También, debe ser fácil de ensayar, económico y mínimamente invasivo, reproducible, y que no sea afectado por el método de recolección o muestreo (65). Para que todas estas condiciones se cumplan, es necesario tener en cuenta que el desarrollo de nuevos biomarcadores es un proceso largo y dispendioso similar a la evaluación de fármacos terapéuticos. En este sentido, en el 2002 el Instituto Nacional de Cáncer de los estados unidos, desarrolló un enfoque de cinco fases de evaluación y validación sistemática de biomarcadores (Tabla 1). Este esquema es un proceso intelectual y riguroso, que proporciona una escala en la cual los investigadores, los pacientes y los financiadores juegan un papel fundamental en la evaluación y desarrollo del biomarcador (66, 67).

**TABLA 1. Fases para el desarrollo de biomarcadores en cáncer.** Se describen las 5 principales fases actualmente aceptadas para el diseño, evaluación y validación de un biomarcador (47, 66-68).

<b>FASE</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>EXPERIMENTACIÓN</b>	<b>MUESTRA</b>
I	Exploratorio, identificación y perfil del candidato	Prueba pre-clínica generación de hipótesis	Pequeña por conveniencia
II	Desarrollo de ensayo clínico, resultados reproducibles	Robusto y reproducible no invasivo	Pequeña por conveniencia
III	Prueba sobre muestras pequeñas determinar beneficio, validación interna	Establecer los puntos de corte de la prueba retrospectivo	Pacientes controles / cáncer previo diagnóstico estándar
IV	Validación externa	Prospectivo impacto sobre la decisión clínica	Multi céntrico a largo plazo
V	Medir si el biomarcador reduce la carga de la enfermedad	Post aprobación, ensayar si funciona para otros estados de la enfermedad	Población en general

Junto a las cinco fases de desarrollo de biomarcadores señaladas en la Tabla 1, se suma el hecho de que hay que tener en cuenta el tipo de biomarcador que se desea implementar. Para esto, se han definido de forma genérica, cuatro diferentes tipos de biomarcadores, de acuerdo con lo expresado por el doctor Shariat SF y colaboradores (47):

1. *Biomarcador de diagnóstico*: este biomarcador puede ayudar a evaluar las características histopatológicas clásicas que determina la presencia o ausencia de cáncer.
2. *Biomarcador de Pronóstico*: este biomarcador es usado para hacer un seguimiento al paciente en función del riesgo de recurrencia o progresión de la enfermedad, lo que permitiría un manejo individualizado.
3. *Biomarcador Predictivo*: este biomarcador es usado para predecir si el tratamiento (radioterapia u hormonal) será efectivo, y además supervisar la eficacia del tratamiento. Puede ayudar a identificar la mejor modalidad de tratamiento.
4. *Biomarcador terapéutico*: este biomarcador puede ayudar a identificar a los pacientes que se beneficiarán de un régimen de tratamiento particular. Identifica las dianas moleculares de nuevas terapias y se ve afectado por la terapia. Actualmente no existen este tipo de biomarcadores basados en sangre para el uso clínico de CaP.

## **Evaluación de nuevos biomarcadores para el CaP.**

El número de publicaciones sobre biomarcadores en CaP, ha aumentado de forma constante a lo largo de los últimos años (8, 11, 14, 15, 69); y a pesar de que prometen ser útiles en la clínica, todavía no están disponibles masivamente. Esto hace que el PSA sérico, siga siendo el único biomarcador utilizado por los urólogos en estos momentos. Hoy en día, existen notables barreras técnicas, analíticas y gubernamentales para la aplicación de nuevos biomarcadores en el CaP (68, 70). Estas barreras incluyen, la poca disponibilidad de material estándar para el ensayo (tejidos de biopsia, muestras de fluidos corporales), la complejidad del formato a probar (tecnologías “ómicas”), la implementación de un control de calidad adecuado para asegurar la reproducibilidad y precisión, la correcta fabricación entre laboratorios, y además, el control de calidad para todas las fases del desarrollo de biomarcadores, lo cual implica la estandarización del ensayo y la validación en pruebas metacéntricas con poblaciones independientes para lograr su aprobación final (47). Además, para determinar el valor de un nuevo biomarcador en CaP, no es suficiente demostrar que existe una relación estadísticamente significativa con el resultado de la enfermedad, sino que debe ser significativo en los modelos multivariados los cuales deben incluir el estándar clínico (PSA) y factores patológicos adicionales (71).

Cualquier nuevo biomarcador debe proporcionar un beneficio adicional, o al menos mejorar la precisión de la prueba estándar (PSA en sangre). Por ejemplo: los médicos necesitan un mejor método para distinguir entre condiciones benignas de próstata y el cáncer. Con un marcador más preciso para diagnosticar el cáncer, menos casos de cáncer de próstata se perderían, y los pacientes con patologías benignas o indeterminadas se evitarían el malestar y el riesgo que genera la biopsia transrectal guiada por ecografía (7). Los médicos también necesitan, mejores biomarcadores para detectar la invasión de las vesículas seminales, cuello de la vejiga, invasión peri neural, y determinar la extensión extracapsular hasta las metástasis ganglionares y óseas (72). Los biomarcadores que determinen la enfermedad localizada en el órgano frente a la enfermedad no limitada al órgano prostático son necesarios.

Finalmente, los marcadores biológicos que mejoren la precisión de la estratificación del tumor según su grado de agresividad, reducirían el número innecesario de prostatectomía radical en pacientes con CaP avanzados, también ayudarían al uso racional de la radioterapia y la terapia hormonal, y adicionalmente, proporcionarían a los pacientes que tienen enfermedad localizada en el órgano, otras opciones para el tratamiento curativo diferente a la prostatectomía radical (73).

## **Biomarcadores sanguíneos para el CaP.**

Existe una evidente necesidad de desarrollar nuevos biomarcadores que mejoren la detección del cáncer de próstata, y aún más importante, que puedan distinguir estadios indolentes de la enfermedad de aquellos clínicamente agresivos. Debido a que los biomarcadores clínicos más estudiados son aquellos que provienen de muestras de sangre, muchos han sido identificados y están actualmente bajo investigación (14, 15). Sin embargo, no todos han tenido el impacto que se esperaba en los ambientes clínicos. Entre ellos, calicreína glandular humana 2 (hK-2) (74), el antígeno precoz del cáncer de próstata (EPCA) (75), uroquinasa activadora de plasminógeno (uPA) (76), cromogranina A (77), la proteína secretada de próstata (PSP94) (78), entre otros.

Recientemente, biomarcadores potencialmente útiles para el diagnóstico precoz del cáncer de próstata han sido propuestos, destacándose los microRNAs (miRNAs), un tipo de ácidos nucleicos no codificantes con funciones importantes como reguladores de la expresión génica a nivel post-transcripcional (14). Tanto miRNAs circulantes como los de tejido, tienen el potencial de ser empleados como marcadores de diagnóstico y pronóstico para diversos tipos de cáncer incluyendo el de próstata (63). Por ejemplo: el grupo de Mahn *et al.* (79) estudiaron 37 pacientes sometidos a prostatectomía radical, 18 pacientes con hiperplasia prostática benigna tratados con adenomectomía retropúbica, 8 pacientes con CaP metastásico y 20 voluntarios sanos. En todos los grupos evaluaron cuatro miRNAs oncogénicos (miR-32, miR-26a, miR-let7i y miR-195), más el miR-16 como control.

Encontraron que el uso de miR-26a como marcador individual fue moderadamente preciso para el diagnóstico diferencial de la hiperplasia benigna en comparación con el cáncer de próstata (AUC de 0.703), pero que el uso combinado de los miRNAs oncogénicos se asoció con un área bajo de la curva (AUC) ligeramente mayor (AUC de 0.758). Los autores también destacan, que los niveles de expresión de miR-195 y miR- let7i se asoció con la puntuación de Gleason, indicando que los niveles séricos de estas moléculas tendrían utilidad en el pronóstico de la enfermedad (79).

En una muestra de 82 individuos clasificados con diferentes riesgos de CaP, Shen *et al.* (80), mostraron que los niveles elevados de miR-21 y miR-221 fueron capaces de diferenciar los pacientes con un bajo riesgo de aquellos con riesgo elevado (AUC=0.801;  $p = 0.002$ ). Estos resultados confirmaron que los miRNAs están asociados con diferentes niveles de agresividad en el cáncer de próstata (80).

### **Biomarcadores en orina.**

Concomitantemente con los esfuerzos hechos en biomarcadores sanguíneos, en las dos últimas décadas también se han hecho esfuerzos dirigidos a descubrir y validar nuevos marcadores biológicos de CaP en orina; entre los que tienen el mayor potencial diagnóstico se encuentra Sarcosin, el antígeno 3 del cáncer de próstata (PCA3) y el reordenamiento genómico TMPRSS2:ERG (14).

Por su parte, Sarcosin que es un metabolito derivado de N-metil glicina se ha encontrado significativamente elevado en pacientes con CaP respecto a individuos controles; también se ha encontrado asociado a la progresión del cáncer (81). Este marcador se puede medir tanto en la orina como en el suero, en este último los estudios indican que Sarcosin tiene un valor predictivo mayor que el PSA total y el PSA libre en pacientes con PSA total < 4.0 ng/ml (82); lo que sugiere que este biomarcador puede ser una herramienta adicional no sólo para el diagnóstico, sino también, para la selección de pacientes candidatos para una vigilancia activa. Además, niveles elevados de esta molécula se han encontrado en suero de pacientes con cáncer metastásico resistente a la castración en comparación con los pacientes con enfermedad no metastásica (14).

Otro ejemplo de tales marcadores urinarios es el producto del gen PCA3 (*Prostate CAncer gene 3*), un mRNA no codificante localizado en el cromosoma 9q21-22 que se encontró altamente expresado en tejidos de CaP comparado con los tejidos benignos (83). En los últimos años se ha mostrado su utilidad y viabilidad

gracias a un ensayo molecular que permite la detección del CaP a partir de las células colectadas en la orina (84, 85). Basado en estos hallazgos se ha desarrollado un ensayo cuantitativo para medir el PCA3 con el potencial de ser usado de forma masiva en la práctica clínica (86). Este ensayo que se denominó APTIMA PCA3 (PROGENSA PCA3 ASSAY) y se encuentra disponible comercialmente (86), utiliza los volúmenes totales de la orina eliminada tras un examen rectal digital (DRE) (86), el cual ayuda a liberar células prostáticas hasta el sistema ductal donde pueden ser recogidas en la primera orina. Luego, la orina es procesada con medio UTM, que lisa las células y estabiliza el RNA. Finalmente, los transcriptos de PCA3 y PSA se cuantifican y la valoración de PCA3 se determina por la relación de mRNA PCA3/PSA multiplicado por 1000, obteniéndose una puntuación de PCA3. Debido a que las células epiteliales de la próstata expresan PCA3 y que los porcentajes de RNA por microgramo de tejido pueden variar entre muestras, la prueba APTIMA PCA3 es normalizada con los niveles del mRNA de PSA, el cual es utilizado como gen de referencia (housekeeping). La prueba utiliza PSA como normalizador y también como validador de las cantidades de RNA específico de la próstata, lo cual es utilizado para generar un resultado válido (86). El uso de PSA como normalizador está fundamentado en el hecho de que su expresión suele ser relativamente constante en las células normales de la próstata y sólo una débil sub-regulación (1.5 veces) de su expresión en las células tumorales se ha encontrado (87). Por lo tanto, el transcrito de PSA se puede utilizar para corregir el número de células de la próstata presentes en el sedimento de la orina. De esta manera, la razón entre el

RNA del PCA3 y el PSA, es utilizado como la nueva herramienta de diagnóstico para la identificación precisa de células de cáncer de próstata después de un masaje de la próstata (88).

La utilidad clínica de este marcador se basa en su capacidad para predecir los resultados de una segunda biopsia en pacientes que previamente hayan sido diagnósticos con una neoplasia intraepitelial prostática de alto o bajo grado (PIN), o que además hayan presentado una proliferación acinar atípica pequeña en la primera biopsia (14). En otras palabras, cuando el Score de PCA3 está por encima de 20 existe mayor probabilidad de que la segunda biopsia sea positiva y cuando está por debajo, la probabilidad de que la biopsia sea positiva es muy baja, por lo tanto, no es necesario llevar a cabo una segunda biopsia para evitar el riesgo del procedimiento (86). El ensayo PROGENSA PCA3 es la primera prueba molecular de uso clínico basada en orina y aprobada por la FDA que detecta la sobreexpresión del gen PCA3. La información específica (puntuación de PCA3) proporcionada por la prueba, es decidir si es necesario una segunda biopsia o si esta puede retrasarse en hombres con una o más biopsias negativas anteriormente. Sin embargo, un valor bajo (puntuación de PCA3 menor de 20) no excluye al paciente de tener CaP, por lo cual es necesaria una biopsia para diagnosticar el cáncer.

Por último, la fusión TMPRSS2-ERG es el reordenamiento más frecuente en el CaP (15% en PIN y hasta 50% en CaP localizado) lo que sugiere que este reordenamiento o bien corresponde a un evento temprano que precede la aparición del cáncer (PIN) o se produce después del inicio del tumor (89, 90). Esto se da cuando se fusiona el gen de la proteasa de transmembrana serin 2 (TMPRSS2) y el protooncogén homólogo del virus de eritroblastosis aviar v-ets E26 (ERG). Se ha encontrado que TMPRSS2:ERG es altamente específico para la predicción de cáncer de próstata clínicamente significativo en la biopsia a pesar de la baja sensibilidad (14). Al igual que PCA3, La fusión TMPRSS2-ERG puede ser detectada en orina después de un masaje prostático y sus valores pueden ser normalizados con los niveles del mRNA de PSA, lo que permite calcular un puntaje de TMPRSS2-ERG. Dado que ambos marcadores pueden ser medidos en orina, Hessel y colaboradores (91), informaron por primera vez la combinación de PCA3 y TMPRSS2: ERG, y desde entonces varios estudios han mostrado que el uso combinado de los dos biomarcadores (TMPRSS2: ERG y PCA3) mejora la exactitud para detectar y predecir el comportamiento del cáncer (92, 93).

### **Líneas celulares de CaP como modelos de estudio.**

Las líneas celulares LNCaP y PC-3 representan modelos *in vitro* de CaP humano ampliamente utilizadas, las cuales tienen características similares al cáncer clínico, y derivan de diferentes sitios metastásicos, por lo que permiten estudiar los mecanismos de progresión y metástasis del CaP (94).

### **Línea celular LNCaP.**

El clon LNCaP FGC fue aislado en 1977 por Julius Horoszkiewicz, et al. (95), a partir de una biopsia en el ganglio linfático supraclavicular izquierdo de un hombre de 50 años, de raza caucásica y con diagnóstico confirmado de carcinoma de próstata metastásico. Estas células en cultivo no producen una mono-capa uniforme, sino que crecen en conglomerados que deben ser destruidos por pipeteos repetidos cuando se preparan sub cultivos. Se adhieren ligeramente al sustrato y su crecimiento es lento y rápidamente acidifican el medio de cultivo (95). Además, producen glicoproteínas prostáticas, tales como fosfatasa acida y antígeno prostático específico, también son sensibles a la 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT). La caracterización de esta línea celular demostró que su inyección en ratones desnudos atímicos, induce adenocarcinomas pobremente diferenciados en el lugar de la inyección, los cuales pueden ser palpables entre 14 y 56 días después de la inoculación, y al cado de las 6 semanas, la mayoría de los tumores alcanza 1 g de peso. Además, no se encontraron metástasis distales aparentes en el examen histológico de los órganos internos de estos ratones, por lo que es considerado un modelo de metástasis con baja agresividad (96).

### **Línea celular PC-3.**

La línea PC-3 fue aislada de una lesión metastásica en vertebra de un paciente caucásico de 62 años con un adenocarcinoma prostático hormono-independiente grado IV (97). Las células cultivadas en agar blando muestran crecimiento independiente de anclaje tanto en mono capas como en suspensión y producen tumores subcutáneos en ratones desnudos. PC-3 no depende en gran medida de suero para su crecimiento en comparación con las células epiteliales prostáticas normales, y no responde a los andrógenos, glucocorticoides, factor de crecimiento epidérmico o factor de crecimiento de fibroblastos; además, expresan bajos niveles de fosfatasa ácida así como de reductasa de DHT y PSA (97). Los estudios de microscopía electrónica revelaron muchas características comunes a las células neoplásicas de origen epitelial, incluyendo numerosas microvellosidades, complejos de unión, núcleos anormales y nucléolos, mitocondrias anormales, laminillas anilladas y cuerpos lipoides (97). En general, las características funcionales y morfológicas de PC-3 son las de un adenocarcinoma pobremente diferenciado (97). En conjunto, son consideradas un modelo útil en la investigación de cáncer de próstata avanzado de alta agresividad y en la evaluación de la respuesta a agentes quimioterapéuticos (94, 98).

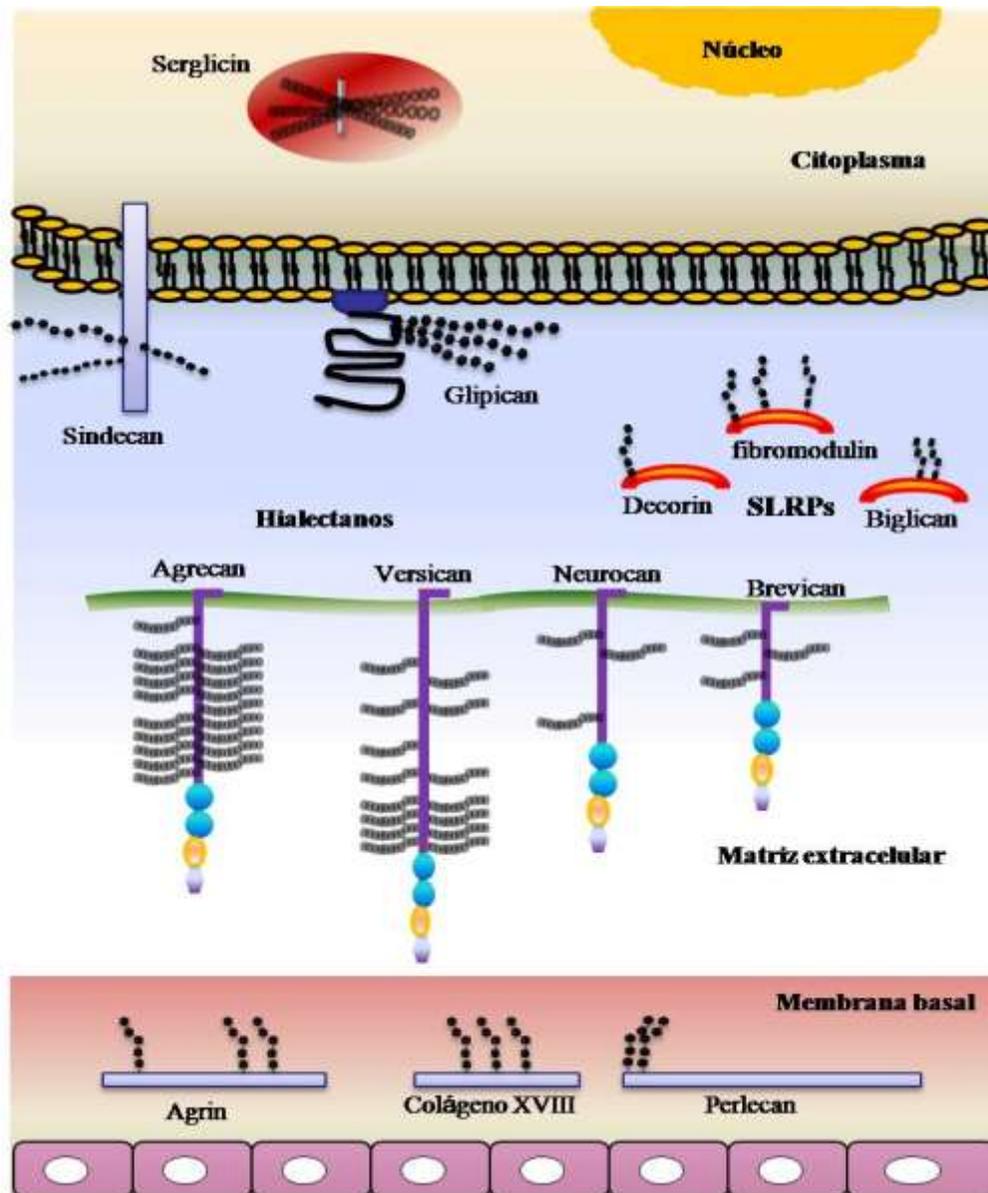
### **Línea celular PWR-1E.**

La línea celular PWR-1E fue establecida a partir de células primarias de epitelio prostático humano adulto no neoplásico, las cuales fueron inmortalizadas con un virus híbrido de adenovirus-12 y el virus del simio SV-40 (Ad12-SV40) (99). Se aislaron varios clones inmortalizados libres de efectos citopáticos, que dieron lugar a una línea celular PWR-1E, la cual expresa muchas características de las células epiteliales de la próstata normal, incluyendo la expresión del receptor del andrógeno y la inducción de la expresión de PSA en respuesta a los andrógenos. La inmunotinción mostró que las células expresan citoqueratina 8 y 18 normalmente encontradas en las células secretoras prostáticas epiteliales diferenciadas; Además, son positivas para el antígeno T de SV40 y muestran una fuerte tinción nuclear para p53. Crecen en mono capas en un medio definido libre de suero y responden al factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y TGF-beta (99). También se demostró que las células en los pasajes 23 y 40 no fueron tumorigénicas en ratones desnudos incluso cuando fueron co-inyectados con Matrigel. Y después de 5 meses, ninguno de los ratones inyectados con 10 millones de células había desarrollado tumores. Con base en esta caracterización, esta línea celular es considerada no tumorigénica y puede ser utilizada para estudiar la etiología de la carcinogénesis y la progresión del tumor; así como la fisiología normal de la próstata y la diferenciación; también puede ser útil en la evaluación de agentes quimiopreventivos del cáncer de próstata (99, 100).

### **Proteoglicanos: Definición y Clasificación.**

Los proteoglicanos (PG) son macromoléculas formadas por un núcleo proteico que se encuentra unido a varias cadenas de polisacáridos amino-acetilados no ramificados denominados glicosaminoglicanos (GAG) (101). Están distribuidos en la mayoría de los tejidos humanos de forma intracelular y a lo largo de la matriz extracelular (MEC). Su núcleo proteico se puede dividir en diversos dominios y una vez que están unidos a su respectivo GAG pueden interactuar con diversas moléculas de la matriz extracelular (e.g. fibromodulina unido a fibras de colágeno), mientras que otros poseen la habilidad de interactuar con receptores celulares específicos (e.g. biglicano unido a receptores tipo Toll) (102).

La biología de los PG se ha ampliado notablemente en los últimos años y nuevos miembros han sido descritos; en general, se agrupan en tres familias principales: la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucinas (SLRPs) donde se encuentra fibromodulina, decorina y biglicano; la familia de PGs modulares (distribuidos en la membrana basal) y los PGs de superficie celular como sindecano y glicano (ver Figura 2) (101). Debido a su variabilidad bioquímica, los PG pueden estar implicados en muchos procesos fisiológicos que pueden ir desde la morfogénesis, la reparación de tejidos, la inflamación, la vascularización e incluso la carcinogénesis (103).



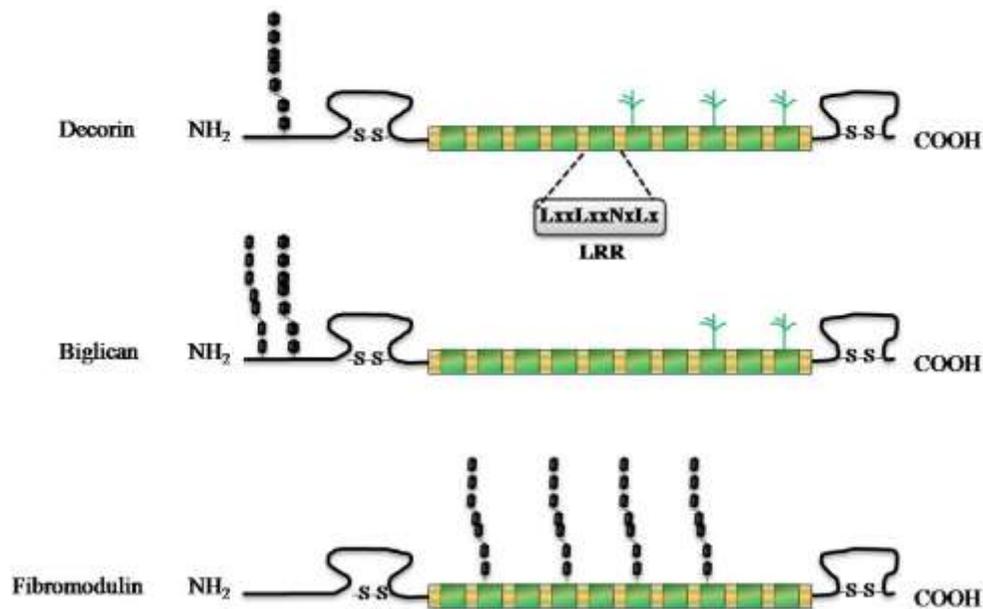
**Figura 2. Familia de proteoglicanos de acuerdo a su distribución tisular.** Serglicina es un proteoglicano intracelular distribuido en vesículas secretoras de las células hematopoyéticas y células endoteliales. Se observan los tres grupos de proteoglicanos extracelulares: **hialectanos** (agregcano, versicana, neurocano y brevicano) asociados con el ácido hialurónico en la matriz extracelular; **Los SLRPs** (fibromodulina, biglycanao, lumicano) y **los PGs de membrana basal**, perlecano, agrino y colágeno XVIII. Las dos familias más importantes de PGs asociados a la membrana celular son los sindecanos y los glipicanos glicosilfosfatidilinositol. Abreviatura: SLRP, proteoglicanos pequeños ricos en leucina. Adaptado de Schaefer L, 2010 (101).

Evidencia reciente, sugiere que los PG pueden secuestrar factores de crecimiento a través de la unión específica de sus núcleos proteicos con la molécula blanco, modulando de esta forma su eficacia para traducir señales a través de sus receptores (27, 103). Se ha evidenciado que algunos miembros de la familia SLRPs son claves en la regulación del crecimiento celular y en el inicio de la tumorigénesis (26-28, 104, 105). De hecho, nuestro grupo de investigación identificó en un modelo de rata del cáncer de próstata, un grupo de proteoglicanos de esta familia, los cuales estuvieron asociados al fenotipo metastásico (12). Entre los más destacados, se encontró decorina (DCN), biglicano (BGN) y fibromodulina (FMOD), siendo este último un PG que para nuestro conocimiento aún no ha sido reportado en el cáncer de próstata (28) y actualmente es el candidato para ser evaluado dentro del proceso tumorigénico del CaP.

### **Familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucinas (SLRPs).**

Los proteoglicanos SLRPs son una familia de proteínas de bajo peso molecular (40 a 80 KDa) distribuidas en la matriz extracelular, compuestas por un núcleo proteico que posee dominios ricos en leucina (LRR) al que se le une covalentemente una o varias cadenas de queratán, condroitina o dermatan sulfato (glicosaminoglicanos) (106). A nivel de estructura primaria, los dominios LRR constan de repeticiones de leucina en tándem y dentro de estos hay motivos que contienen 11 aminoácidos distribuidos como **LxxLxLxxNxL**, siendo **x** cualquier aminoácido; **L**, leucinas consenso que pueden ser sustituidas por isoleucina,

valina u otros aminoácidos hidrofóbicos y **N** es usualmente asparagina. Los dominios LRRs generalmente son de 20-29 aminoácidos de longitud, siendo 24 la longitud más común. Adicionalmente, los LRRs están flanqueadas por dominios terminales que forman enlaces disulfuro (S-S) (ver Figura 3). (106).



**Figura 3. Organización estructural de los SLRPs.** Estructuras comparativas de los proteoglicanos biglicano, decorina y fibromodulina. Estas tres proteínas de la matriz extracelular contienen de 10 a 14 dominios LRR ricos en leucina que abarcan aproximadamente el 80% de la proteína. Decorina y biglicano contienen condroitina sulfato o dermatan sulfato cercano al extremo N-terminal (círculos negros), mientras que Fibromodulina contiene 4 cadenas de queratán sulfato a lo largo de sus regiones ricas en repeticiones de leucina. Los dominios terminales que flanquean a los LRR, poseen motivos ricos en cisteína (Cx3CxCx6C). LRR: leucine-rich repeat. Adaptado de Schaefer, L (101); Iozzo, RV (106).

La familia de SLRP está formada por 17 miembros agrupados en cinco sub-familias basadas en las homologías a nivel de proteico, conservación de regiones ricas en cisteína y la organización cromosómica (101, 102). Los proteoglicanos biglicano y decorina son de clase I, conformados por 8 exones, mientras que fibromodulina, lumicano y chondroaderina son de clase II, y están conformados por tres exones, los cuales son estructuralmente similares entre sí. También se ha observado que los genes SLRP aparecen agrupados en los cromosomas, en donde los genes de los PGs de clase I tienen una ubicación centromérica respecto a los de clase II/III que es telomérica, indicando que posiblemente surgieron por duplicación de segmentos cromosómicos. La importancia de estas agrupaciones no está clara; sin embargo, debido a que varios de los genes SLRP se han mantenido agrupados durante la evolución, es probable que un grado de redundancia funcional también se haya mantenido (101, 102).

### **Biología de FMOD, organización genómica y proteómica.**

El gen FMOD se encuentra localizado en el cromosoma 1q32 y tiene 10.809 pares de bases (Entrez gene: 2331 / Ensembl: ENSG00000122176). Este gen posee tres exones y dos intrones. El exón 1 contiene la secuencia 5' UTR de 457 pb y no hace parte de la secuencia codificante; el intrón 1 abarca una región de 2755 pb y luego aparece el exón 2 con un tamaño de 986 pb, en este exón se encuentra el codón de inicio de la traducción y contiene el 86% de la secuencia traducida (Ensembl Genome Browser: ENST00000354955). Este exón está seguido del intrón 2 con 4.800 pb y finalmente aparece el exón 3 que tiene un tamaño de 1867

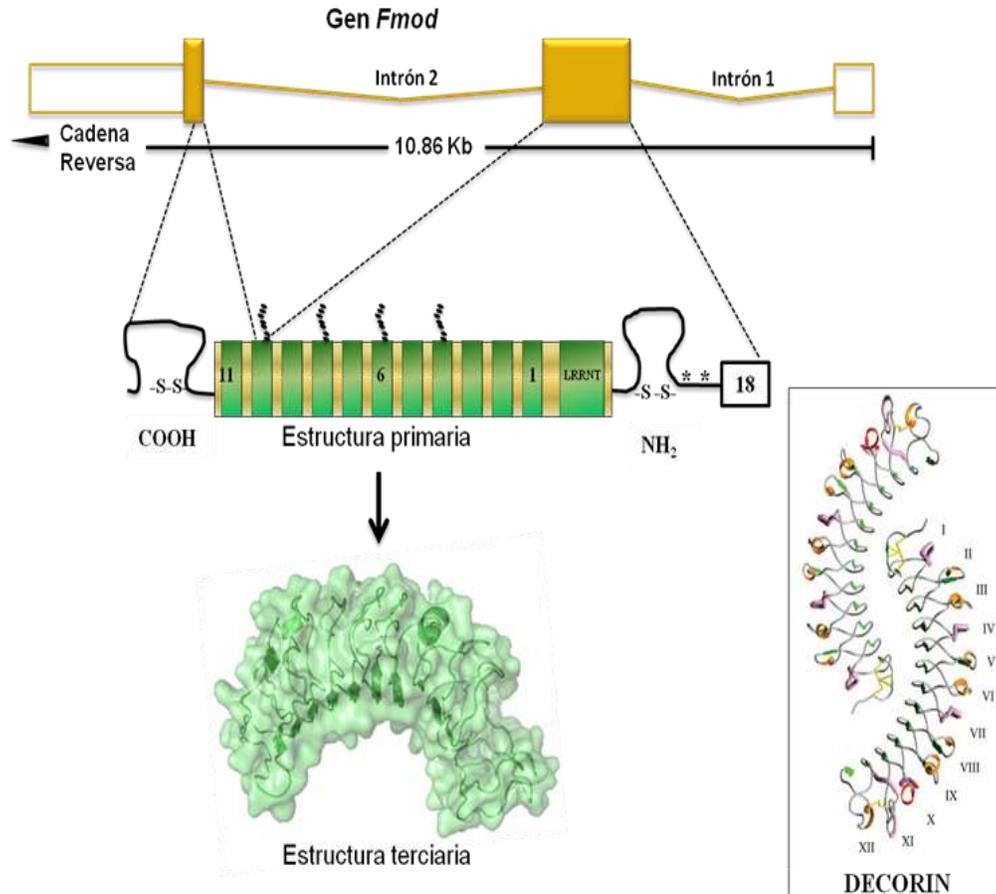
pb y posee los últimos 50 nucleótidos de la región traducida, así como la región 3'-UTR del gen (ver Figura 4) (107). A nivel de transcrito, este gen tiene 4 variantes descritas, las cuales surgen de eventos de corte y empalme (*splicing*) alternativo durante la transcripción; sin embargo, hasta ahora se ha identificado una única proteína (número de acceso en Emsembl: ENSP00000347041 / UniProt: Q06828), producto de la traducción del transcrito completo del gen (ver Tabla 2).

En cuanto a la proteína fibromodulina, esta posee una región central que contiene 11 repeticiones ricas en leucina (LRR) donde se encuentran los cuatro sitios potenciales donde ocurre la N-glicosilación con queratán sulfato (ver Figuras 3 y 4). A su vez, esta región central está flanqueada por los dominios N y C terminales, que contienen enlaces disulfuros. La estructura primaria está formada por un núcleo proteico de 376 aminoácidos (aa) el cual es procesado hasta la forma madura de 358 aa. Estos aminoácidos en la proteína se encuentran arreglados en las 11 repeticiones LRR cada una con un promedio de 22 residuos de aminoácidos (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q06828>) (108). El dominio de LRR N-terminal (LRRNT) contiene una región conservada de 17 cisteínas y nueve tirosinas cercanas al extremo N-terminal que sufren sulfataciones para la adición postraducciona de GAGs (109). No todos los sitios de N- glicosilados de la proteína contienen cadenas de longitud completa de queratán sulfato, y de hecho muchos permanecen como oligosacáridos cortos lo que sugiere que este tipo de sustitución al parecer no es esencial para las propiedades funcionales del proteoglicano (108).

**Tabla 2. Información de transcritos y proteínas para el gen FMOD.** Tomado originalmente de Archie Emsembl Home para FMOD t=ENST00000354955.

<b>Nombre</b>	<b>Transcrito ID</b>	<b>Longitud (bp)</b>	<b>Proteína ID</b>	<b>Longitud (aa)</b>	<b>Biotipo</b>
<b>FMOD-001</b>	<u>ENST00000354955</u>	3310	<u>ENSP00000347041</u>	376	Codifica proteína
<b>FMOD-002</b>	<u>ENST00000464898</u>	2714	No reporta proteína	-	Transcrito procesado
<b>FMOD-003</b>	<u>ENST00000493296</u>	717	No reporta proteína	-	Transcrito procesado
<b>FMOD-004</b>	<u>ENST00000461936</u>	366	No reporta proteína	-	Transcrito procesado

- No existe evidencia de proteína



**Figura 4. Organización genómica y estructural de FMOD.** Se muestra la dirección inversa de la transcripción del gen, donde el exón 2 abarca el 86% de la proteína. La estructura primaria contiene el 70 % de los aminoácidos distribuidos en los 11 dominios LRR (59 KDa). Tirosinas en el extremo N terminal están representadas por los asteriscos y los glicosaminoglicanos de queratán sulfato que se unen a las asparaginas 127,166, 201, 291 y 341 están representados por las barras negras. Los principales sitios de unión a colágeno tipo I se encuentran en la repetición rica en leucina 11 en el extremo C-terminal en las posiciones Glu-353 y Lys 355 (108). La estructura terciaria fue modelada con Protein Model Portal: *interactive modeling software* (110) usando como molde la estructura de decorina (111).

Hasta la fecha la estructura cristalina de la proteína fibromodulina no se ha definido; sin embargo, la estructura de otros miembros de la familia como decorina (111) y biglicano (112) ya ha sido determinada. Todos ellos adoptan un plegamiento curvado en forma de herradura de caballo, con láminas- $\beta$  paralelas que forman la cara cóncava interna y la cara convexa posee una estructura secundaria de diferentes topologías (ver Figura 4). Estas estructuras cristalinas han sugerido que la superficie cóncava puede contener los sitios de unión al ligando y se ha estimado que fibromodulina y otros SLRPs podrían interactuar con sus ligandos de la misma forma (111); Sin embargo, algunos análisis biofísicos de dispersión de rayos X demostraron que decorina dimeriza en solución, sugiriendo que las superficies cóncavas están implicadas en la dimerización haciéndolas potencialmente inapropiadas para unir el ligando específico (ver Figura 4) (111, 112).

### **Función celular de fibromodulina.**

Fibromodulina se aisló por primera vez como una proteína de 59 KDa en la MEC del cartílago articular de bovinos adultos (113). Desde entonces se ha demostrado que presenta una amplia distribución tisular, con mayor abundancia en el cartílago articular, tendones, ligamentos y otros tejidos conectivos en una concentración de 1-3 mg/gr de tejido (16). Su nombre se deriva de su capacidad para interactuar con fibras de colágeno tipo I y II, e influir *in vitro* tanto en la tasa de fibrogénesis como en la estructura de las fibras resultantes (17, 18, 108). Su papel biológico fue

demostrado en ratones knock-out (16), quienes a pesar de ser viables, fértiles y sin grandes defectos funcionales en el corazón, hígado, pulmón, piel y cartílago, presentaban desordenes histológicos en las secciones transversales de la cola y el tendón de Aquiles, en los cuales se observaba una organización anormal del tejido fibrilar (114). La microscopía electrónica de transmisión reveló que una fracción de las fibras de colágeno tenía contornos irregulares y presentaban una arquitectura anormal y el defecto aumentaba en la población de fibras de menor diámetro (114). Estos resultados en conjunto, apoyaron el papel de fibromodulina en la maduración de las fibras de colágeno y su posterior ensamblaje en la matriz extracelular; sin embargo, las consecuencias funcionales de estos cambios en las fibras de colágeno en estos roedores no se investigaron (114).

La evidencia de la última década ha permitido comprender que fibromodulina también puede cumplir otras funciones, como regular la traducción de señales al interactuar con proteínas que circulan en la matriz extracelular. Se ha observado que la interacción con el TGF- $\beta$  puede regular su actividad mediante su secuestro en la MEC (19). Estudios en ratones (20) y humanos (115) han mostrado que en los procesos de cicatrización de heridas cuando existe una sobre expresión de TGF- $\beta$  y una disminución de fibromodulina, se genera una cicatrización hipertrófica debido a la inducción masiva de síntesis de colágeno en la herida. No obstante, cuando se aumenta su expresión, las heridas se reparan sin cicatrización hipertrófica, sugiriendo un papel modulador de este proteoglicano frente a TGF- $\beta$  durante la formación de cicatriz (20, 115).

Otro estudio, realizado por Adini y colaboradores en la Universidad de Harvard (21), investigo la etiología de enfermedades dependiente de angiogénesis, como la degeneración macular asociada a la edad y el hemangioma infantil, y encontró que los melanocitos del microambiente contribuyen a la regulación local de la neovascularización observada en estas dos patologías. Mediante sus experimentos, definieron un nuevo mecanismo en el que los melanocitos no pigmentados secretan grandes cantidades de fibromodulina, el cual sirve como un factor angiogénico en los tejidos tales como, el iris, los coroides y la piel. Al parecer es un potente estimulador de múltiples pasos en el proceso angiogénico, incluido el crecimiento de células endoteliales, la migración y la formación de redes capilares (21). El mecanismo exacto por el cual fibromodulina realiza esta función, es activando en células endoteliales la secreción de TGF- $\beta$ 1. Este a su vez estimula al receptor TGFRII, el cual inicia la vía SMAD y en última, esto conlleva a la activación del factor de transcripción SMAD, lo que resulta en una elevada proliferación y migración de las células endoteliales (21).

Interesantemente, nuevos datos indican que fibromodulina puede apagar la vía de señalización del factor de transcripción NF $\kappa$ B mediante el retraso de la degradación del inhibidor del NF $\kappa$ B (IKB $\alpha$ ), lo que a su vez depende de la señalización de quinasas C-Jun (JNK) (116). En este estudio se evidencio una nueva forma de FMOD para potenciar significativamente la estabilidad de las proteínas IKB $\alpha$  y el efecto neto de estos eventos, fue la regulación negativa de la actividad del NF $\kappa$ B y la muerte celular. Los autores sugieren que estudios

posteriores deberán abordar cómo los proteoglicanos podrían regular la supervivencia de los fibroblastos impactando la homeostasis del estroma y su posterior efecto sobre las células epiteliales vecinas (116). Otros estudios, también han propuesto que fibromodulina y otros SLRPs protegen al colágeno de la degradación de colagenasas en los tejidos conectivos, formando una capa sobre la superficie de las fibrillas impidiendo el acceso a proteasas colagenolíticas (117).

Otra función, en la que podría estar involucrado este proteoglicano es en la respuesta inflamatoria del cartílago mediante la activación de la vía clásica del sistema de complemento (22). Estos estudios indicaron que fibromodulina se une directamente a las cabezas globulares de C1q y conduce a la activación de la proteasa C1; sin embargo, el ensamblaje del complejo de ataque a la membrana y la liberación C5a (pasos finales en el mecanismo efector del complemento) mediada por FMOD es baja, en comparación con la IgG, el activador clásico de esta vía (22). Otras Observaciones realizadas por Bevilacqua A y colaboradores (118, 119) han mostrado que los fibroblastos humanos cuando se encuentran en senescencia replicativa manifiestan un patrón alterado en la expresión de genes que participan en el remodelado de la MEC, entre ellos FMOD. Estos Investigadores encontraron que el promotor de FMOD tenía un elemento *cis* que forma un complejo ADN-proteína con el factor DDB-1 (DNA damage-binding protein 1), y la supresión endógena de DDB-1 mediante el uso de un siRNA indujo una disminución del 50% de la concentración de FMOD.

Con estos análisis se demostró que DDB-1 era un factor clave en su activación. También se observó que los fibroblastos expuestos a luz UV aumentaban la expresión de FMOD dependiente de DDB-1 y este hecho promovía el ensamblaje de nuevas fibras de colágeno en el tejido conectivo (119).

### **Relación de FMOD con el cáncer.**

Los primeros hallazgos que relacionaron a FMOD con el cáncer, vinieron de los estudios de perfiles de expresión génica (microarrays) en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica de células B (CLL-B), donde se encontró significativamente sobre-expresado (23, 24). Mikaelsson y colaboradores en 2005 (120), utilizando PCR en tiempo real, encontró niveles elevados de FMOD en 75 pacientes con CLL-B y en 5 de 7 pacientes con linfoma de células del manto (MCL); los análisis proteicos a través de Western blot, lo detectaron en el citoplasma de las células BCLL y en el sobrenadante de células cultivadas, pero no en la superficie celular de las células CLL-B (120). Además, no lo encontraron en pacientes con otras leucemias y tampoco se detectó en linfocitos T/B normales, monocitos o granulocitos. Mikaelsson llegó a la conclusión de que FMOD podría estar involucrado en la fisiopatología de CLL-B y MCL actuando como una molécula única que se expresaba selectivamente tanto a nivel de transcrito como de proteína; no obstante, la razón por la cual FMOD, se expresaba en estas células era desconocida. A partir de estos hallazgos, ellos plantearon que la sobre expresión de otros genes ubicados en el mismo cromosoma de FMOD pudieran

estar orquestando señales génicas regulatorias involucradas en la carcinogénesis de esas células (120).

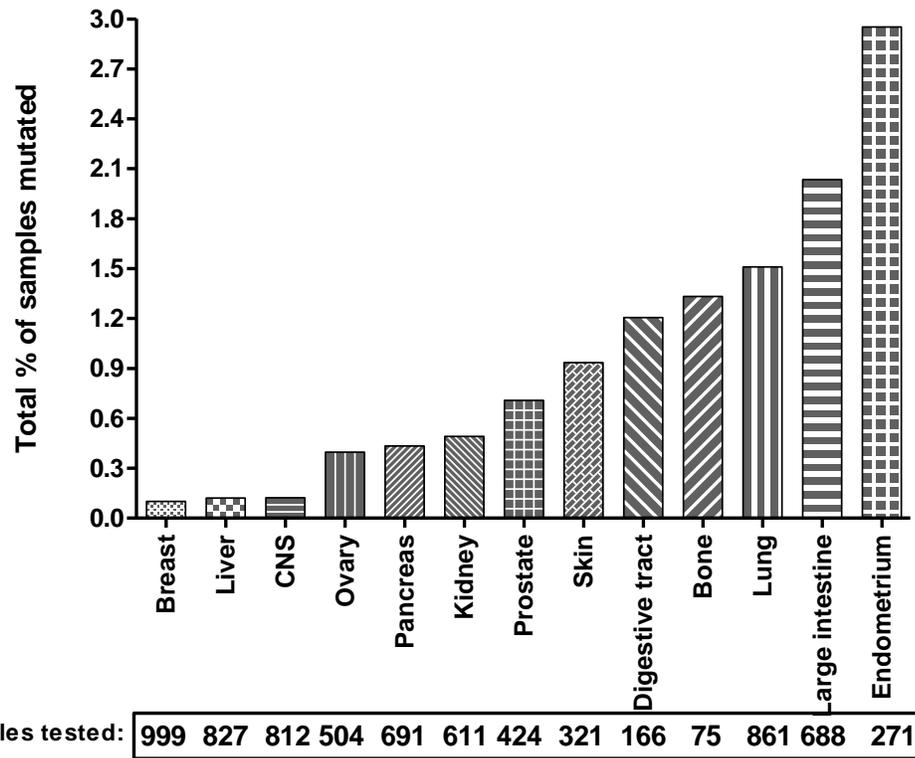
Además, el hecho de no observar aberraciones genéticas en el locus de FMOD, los hizo pensar, que los niveles de expresión podrían estar mediados por mecanismos epigenéticos aún no revelados (120). En otro estudio sobre leucemia linfocítica crónica de células B (25), fibromodulina fue caracterizado como un antígeno asociado a tumor (TAA), debido a su potencial para generar una respuesta antitumoral específica, ya que la producción exclusiva de este proteoglicano por las células leucémicas generaba una serie de péptidos antigénicos que procesados y presentados vía HLA-A2 permitían seleccionar linfocitos T CD8+ específicos del tumor. Los autores, lo calificaron como un buen candidato para la inmunoterapia de la enfermedad (25). Por otro lado, también se observó que su silenciamiento inducía apoptosis en las células CLL-B cultivadas, lo que sugería que el proteoglicano era necesario para la supervivencia de esas células neoplásicas (121). Al parecer, fibromodulina mantiene la supervivencia de células tumorales por un lado y por otro promueve su muerte indirectamente cuando este no está presente. Los autores de este estudio, también notaron que esos efectos biológicos (supervivencia/muerte) parecen ser llevados a cabo intracelularmente, debido a que las cantidades secretadas fueron bajas (121).

Por otro lado, durante muchos años se ha observado que las alteraciones genéticas en ciertos genes pueden conducir (*drivers genes*) la iniciación y progresión del cáncer (3). En el caso de FMOD, se han reportado 55 mutaciones, las cuales están descritas en el catálogo de mutaciones somáticas en cáncer, una base de datos de acceso público en internet (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>, consultado en diciembre de 2015). Estas mutaciones fueron detectadas en 13 tipos de tejidos tumorales, provenientes de diferente número de muestras y a partir de las cuales se calculó la frecuencia de mutaciones (ver Figura 5). El tipo de mutación más frecuente en FMOD, independientemente del tejido tumoral donde fue hallada, son las sustituciones no sinónimas de cambio de sentido (Substitution missense) que abarcan cerca del 71% (39 de 55 en total); seguido de las mutaciones sinónimas en un 23%, y las deleciones, que alteran el marco de lectura, solo están presentes en un 3.64% (2 de 55 en total).

En el caso específico del cáncer de próstata, el porcentaje de mutaciones para FMOD fue del 0.71 %, para un total de 424 muestras (ver Figura 5). Con estos datos se observó que el porcentaje de mutaciones en FMOD es muy bajo, particularmente se encontraron dos sustituciones no sinónimas y una sinónima, que ocurrieron en la posición de los aminoácidos 265 (p.R265L), 331 (p.S331R) y 203 (p.T203T). El significado biológico que tengan estas mutaciones en el cáncer de próstata es completamente desconocido. Aparentemente, las sustituciones no

sinónimas reportadas en COSMIC, ocurrieron en los sitios donde los glicosaminoglicanos de queratán sulfato no se unen (asparaginas 127,166, 201, 291 y 341), ni en los principales sitios de unión a colágeno tipo I, lo cual ocurre en las posiciones Glu-353 y Lys 355, que se encuentran en la LRR número 11 en el extremo C-terminal de fibromodulina. Por ahora, solo podemos ver que existe una baja tasa de mutaciones en fibromodulina relacionadas con cánceres sólidos y en particular con el de próstata (ver Figura 5). Además, cabe resaltar, que en FMOD existen otras variaciones genéticas que no están relacionadas con cánceres y que si tienen un efecto biológico sobre los individuos a los que se les han encontrado [49, 50]. Un ejemplo de esto, son algunos polimorfismos de único nucleótido (SNPs) ubicados en el promotor del gen, los cuales han sido asociados con miopía alta, una de las causas más comunes de ceguera secundaria debido al desprendimiento de la córnea y la neo vascularización coroidea e individuos de edad adulta [49, 50].

Lo que pudimos observar con los estudios mencionados anteriormente, es que las funciones biológicas que puede desempeñar la proteína fibromodulina son diversas; sin embargo, evaluar su expresión dentro de procesos carcinogénicos en la próstata no ha sido determinado, por lo que este estudio, para nuestro conocimiento es el primero que se ha encaminado a evaluar su potencial como nuevo biomarcador del cáncer de próstata, y para esto se propuso una serie de objetivos, los cuales son descritos en la siguiente sección.



**Figura 5. Frecuencia de mutaciones en FMOD basado en muestras tumorales provenientes de 13 tejidos diferentes depositados en COSMIC.** Se escribe el porcentaje total de muestras mutadas respecto al número de muestras analizadas ubicadas en el eje de las abscisas. Fuente: Datos obtenidos de la base de datos COSMIC y analizados en este estudio. <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/>.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general.**

Evaluar el potencial del proteoglicano fibromodulina (FMOD) como nuevo biomarcador del cáncer de próstata en un modelo *in vitro* de líneas celulares y en diferentes muestras de pacientes diagnosticados con cáncer y otros desordenes prostáticos.

### **Objetivos específicos.**

- Evaluar la expresión del transcrito FMOD en líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas con diferentes fenotipos metastásicos.
- Determinar la expresión del transcrito FMOD en paneles comerciales de cáncer de próstata y de tejido prostático benigno.
- Evaluar la expresión de FMOD como transcrito en biopsias de pacientes con cáncer y otros desordenes prostáticos benignos.
- Determinar la expresión proteica de FMOD en biopsias de pacientes con cáncer y con desordenes prostáticos benignos.
- Determinar los niveles proteicos de FMOD en suero de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata y otros desordenes prostáticos.
- Determinar los niveles proteicos de FMOD en orina de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata y otros desordenes prostáticos.
- Evaluar las características operativas de FMOD como nuevo biomarcador de potencial utilidad en cáncer de próstata.

## **METODOLOGÍA.**

### **Diseño.**

El estudio comprendió dos etapas: en la primera, se validó el perfil de expresión del transcrito FMOD en líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas con diferentes fenotipos metastásicos y en paneles comerciales de cáncer de próstata y tejido prostático benigno. De igual forma se determinó la expresión de FMOD como transcrito y proteína en biopsias de pacientes con cáncer y otros desordenes prostáticos. En la segunda etapa, se midieron los niveles proteicos de fibromodulina en el suero y la orina de individuos sanos y pacientes clínicamente diagnosticados con cáncer de próstata y otros desordenes prostáticos no tumorigénicos mediante inmunoensayo enzimático específico, con el fin de valorar sus características operativas como nuevo biomarcador de cáncer de próstata. Este proyecto fue aprobado por el Comité de Ética, de la Universidad de Cartagena.

### **Cultivo de líneas celulares epiteliales de cáncer de próstata humana.**

Las líneas celulares humanas de CaP fueron obtenidas de la compañía ATCC (American Type Culture Collection); estas incluyeron la línea LNCaP clon FGC (ATCC: CRL-1740) la cual posee un fenotipo pobremente metastásico con sensibilidad a andrógenos y la línea PC-3 (ATCC: CRL-1435) derivada de una

metástasis ósea con fenotipo altamente metastásico. Adicionalmente, como control normal, se usó la línea PWR-1E (CRL-11611).

Los cultivos celulares de LNCaP fueron mantenidos en medio de crecimiento completo RPMI-1640 suplementado con 1% de L-glutamina (Gibco - Invitrogen), 10% de suero fetal bovino (FBS) (Gibco - Invitrogen) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco - Invitrogen); mientras que Los cultivos de PC-3, fueron mantenidos en medio modificado F12K (ATCC) suplementado con 10% de suero fetal bovino (Gibco - Invitrogen) y 1% de penicilina-estreptomicina (Gibco - Invitrogen), siguiendo las recomendaciones de la ATCC. Los cultivos de PWR-1E se hicieron en medio de cultivo para queratinocitos libre de suero (Life Technologies) suplementado con 50 ug/mL de extracto de pituitaria bovina, 5% de L-glutamina y 5 ng/mL del factor de crecimiento epidérmico (Life Technologies). Las células LNCaP, PC-3 y PWR-1E fueron cultivadas en mono capas hasta obtener confluencias de 70 a 80% en frascos de cultivo T-25 (Corning), a una temperatura de 37 °C en una atmósfera humidificada que contenía un 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire. Los cultivos eran pasados una o dos veces por semana con el fin de evitar inestabilidad de los cultivos. Las células LNCaP fueron utilizadas entre los pasajes 23 a 26; las células PC-3 se utilizaron en los pasajes 28 a 31, y la línea PWR-1E entre los pasajes 19 a 23.

### **Extracción de RNA total a partir de líneas celulares.**

Las líneas celulares LNCaP, PC-3 y PWR-1E fueron cultivadas a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> hasta obtener una confluencia del 70 al 80%. Una vez en la confluencia deseada, las células eran tripsinizadas (Life Technologies) durante 1 a 3 minutos, hasta obtener una suspensión completa de las células, luego centrifugadas a 1500 xg durante 5 minutos y una vez contadas en hemocitometro, eran sometidas a extracción de RNA total usando el método de Trizol (TRIReagent - Ambion) de acuerdo al siguiente protocolo:

A un precipitado de células de aproximadamente  $5 - 10 \times 10^6$  se le adicionaba 1 mL de Tri Reagent (TM), el cual permitía un lisado rápido y completo del cúmulo celular. Luego, para asegurar la completa disociación de los complejos de nucleoproteínas, el precipitado celular se dejaba en reposo por 5 minutos (min) a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se le agregaban 200  $\mu$ L de cloroformo por cada mililitro de Tri Reagent(TM) utilizado. Se agitaba vigorosamente por 15 segundos para luego dejar en reposo por 2-15 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante era centrifugada a 12.000xg por 15 minutos a 4.0 °C. La centrifugación separó la mezcla en 3 fases: una fase orgánica roja (conteniendo las proteínas), una interfase (conteniendo el DNA), y una fase acuosa superior incolora (conteniendo el RNA). La fase acuosa fue transferida a un tubo limpio de 1.5 mL, para luego adicionarle 500  $\mu$ L de isopropanol por cada 1000  $\mu$ L de Tri Reagent utilizado en la preparación de la muestra. Se dejaba en

reposo por 5-10 min a temperatura ambiente, y luego se Centrifugo a 12.000 xg por 10 min a 4.0 °C. El RNA precipitado en el fondo del tubo se dejaba al aire libre sobre un papel absorbente por 5-10 min. Finalmente, el RNA total fue re-suspendido en solución de Acetato de Sodio (0.3 M pH = 5.0), o con agua libre de RNasa (Qiagen) y llevado a calentamiento en baño serológico por 5 min a 65 °C y luego almacenado a - 80 °C, hasta su utilización. La concentración y pureza del RNA total fue medido por espectrofotometría, calculando el cociente entre las absorbancias de 260/280 (Nanodrop, Thermo scientific, USA). Una muestra con cociente de 260/280 entre 1,8 y 2,0 fue considerada de alta pureza para el contenido de RNA. La integridad del RNA fue monitoreada a través de electroforesis en geles de agarosa (Bio-Rad, USA).

### **Síntesis de cDNA a partir de RNA de líneas celulares.**

Para obtener la primera hebra del DNA complementario (cDNA), se utilizó el estuche *QuantiTect Reverse Transcription* de la casa comercial QIAGEN. La reacción se llevó a cabo en dos etapas: la eliminación del DNA genómico y la posterior reacción de transcripción reversa. En la primera etapa, 1 ug de RNA total de las líneas celulares LNCaP, PC-3 y PWR-1E fue incubado con el buffer "*gDNA Wipeout*" durante 2 min a 42°C. Después de este tiempo, la muestra de RNA fue adicionada a una pre-mezcla que contenía la enzima transcriptasa reversa Quantiscript, el buffer de reacción (Quantiscript RT Buffer), más la solución de cebadores tipo oligo-dT. El volumen total de la reacción (20 µL) fue incubado a

42°C por 30 min, seguido de un ciclo de 95°C por 3 min para inactivar la enzima. Los respectivos cDNA fueron almacenados a -80 °C hasta el momento de su uso en PCR en tiempo real.

### **PCR cuantitativa en tiempo real (qPCR) a partir de cDNA de líneas celulares.**

Para el análisis de la expresión génica de FMOD mediante PCR cuantitativa en tiempo real, se diseñaron “cebadores” específicos para el gen FMOD, para el gen de PSA (gen para comparación), y adicionalmente se diseñaron *cebadores* para los genes de referencia beta-actina (ACTB) y fosforibosil-transferasa de hipoxantina (HPRT), como normalizadores de la expresión génica. Los cebadores se diseñaron usando el software Primer3 desarrollado por el *White head Institute for Biomedical Research* disponible en internet. Los *cebadores* utilizados son listados en la Tabla 3. Las reacciones de qRT-PCR se llevaron a cabo en el equipo *StepOne Real-Time PCR System* de la casa comercial *Applied Biosystems*, usando la química del SYBR Green I (QIAGEN). Para cada ensayo, las reacciones fueron preparadas sobre hielo, mezclando 1.5 µL del producto de la transcripción reversa, 10 µL del kit QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2X (QIAGEN) y 1 µL de cada cebador (ver Tabla 3) a una concentración de 250 nM. Finalmente, se adiciono H<sub>2</sub>O libre de RNAsas hasta un volumen final de 20 µL, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones de reacción incluyeron una etapa inicial a 95 °C durante 15 min para activar la DNA polimerasa HotStarTaq, seguido de 45 ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg. Cada muestra se analizó por triplicado en la reacción de PCR, para estimar la

reproducibilidad de los datos. Los productos resultantes del PCR se sometieron a análisis de curva de fusión (melting curve) en el mismo equipo para verificar la ausencia de amplificación de productos no-específicos.

Los valores de expresión génica se cuantificaron como el promedio de las tres réplicas y en cada caso los valores fueron normalizados a los niveles de expresión de los genes de referencia (*housekeeping*, por su expresión en inglés) beta-actina (ACTB) y HPRT. En todos los experimentos, los cálculos de la expresión génica de FMOD y PSA, se realizó a través del método comparativo delta-delta  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Se compararon las diferencias entre las líneas celulares de cáncer de próstata LNCaP y PC-3 frente a la línea no tumorigénica PWR-1E. Se utilizó el estadístico t de student para el cálculo de los valores p, y un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

**Tabla 3. Lista de cebadores utilizados en el estudio.**

<b>Símbolo oficial del gen</b>	<b>Oligonucleótido</b>	<b>Tamaño del producto (Pb)</b>	<b>Número de accesoion (GeneBank)</b>	<b><i>tm</i> (°C)</b>
HPRT1	GACCAGTCAACAGGGGACAT	132	NM_000194.2	59.82
	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG			59.85
ACTB	AGAAAATCTGGCACCACACC	142	NM_001101.3	59.97
	GGGGTGTGAAGGTCTCAA			59.94
FMOD	ACCGTCCCCGATAGCTACTT	145	NM_002023.3	59.98
	GCAGCTGGTTGTAGGAGAGG			60.01
PSA	GGAGAGTGACATGTGCTGGA	140	NM_001030047.1	59.08
	CTTGGCTCACAGCCTTCTCT			60.00

### **Paneles de cDNA de muestras clínicas de próstata humana.**

Para validar la expresión del transcrito FMOD, cDNA disponible comercialmente extraído de muestras clínicas de CaP y de tejido normal de próstata humana se obtuvo de la compañía Origene (TissueScan™; Origene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA). Para propósitos de este estudio, se adquirió el panel TissueScan HPRT-01 de CaP humano (# cat. HPRT-01, Origene Technologies), que contenía cDNA de 48 pacientes clasificados en diversos estadios tumorales (n=10), hiperplasia prostática benigna (n=27), prostatitis (n= 4) y tejido normal de próstata (n=7). De acuerdo con la casa comercial, estos cDNA son de alta calidad, preparados a partir de biopsias de tejido tumoral humano, normalizados bajo la expresión de beta-actina (ACTB), y montados en un formato de 48 pozos listos para usar en qRT-PCR. La empresa proveedora, certificó que cada muestra incluida en el panel había sido obtenida con el consentimiento informado del paciente y estaba acompañada del reporte patológico detallado, haciendo posible analizar los resultados en un contexto clínico. La principal ventaja de esta metodología, es que se pudo detectar la expresión de nuestro gen de interés en un número significativo de muestras de tejido muy bien caracterizados y con un esfuerzo menor.

### **PCR cuantitativo en tiempo real a partir de cDNA de paneles comerciales.**

Las reacciones de qPCR para FMOD y PSA (gen de referencia), se llevaron a cabo en el equipo *StepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*, usando la química del SYBR Green I. Primero, la placa del TissueScan HPRT-01 se descongeló a temperatura ambiente, luego, se preparó la pre mezcla de PCR, utilizando 750  $\mu\text{L}$  de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2X (QIAGEN) más 50  $\mu\text{L}$  de cada cebador a una concentración de 250 nM, y se adicionó H<sub>2</sub>O libre de RNAsas hasta completar un volumen final de 1500  $\mu\text{L}$ , siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Luego se adicionaron a la placa, alícuotas de 30  $\mu\text{L}$  de la pre-mezcla de PCR por cada pocillo hasta completar los 48 pozos, evitando la contaminación cruzada durante el pipeteado. Este procedimiento se logró utilizando una pipeta multicanal. Al finalizar este paso, la placa se incubó en hielo durante 15 min para permitir que el cDNA liofilizado se reconstituyera completamente, y luego se agitó suavemente para facilitar la re suspensión del ADN, evitando en todos los casos, la formación de burbujas de aire.

Las condiciones de reacción incluyeron una etapa inicial a 95 °C durante 15 min para activar la DNA polimerasa HotStarTaq, seguido de 45 ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg. Cada pozo representaba una única muestra (CaP en estadios II y III (n=10), hiperplasia prostática benigna (n=27), prostatitis (n= 4) y tejido normal de próstata (n=7)). Para estimar la reproducibilidad de los datos, se llevaron a cabo tres experimentos independientes, tanto para el gen FMOD, como para el gen de referencia, PSA.

Los productos resultantes del PCR se sometieron a análisis de curva de fusión (melting curve) en el mismo equipo para verificar la ausencia de amplificación de productos no-específicos.

Los valores de expresión genética se cuantificaron como el promedio de los tres experimentos y en cada caso los valores fueron normalizados a los niveles de expresión del gen de referencia beta-actina (ACTB). En todos los experimentos, los cálculos de la expresión génica de FMOD y PSA, se realizó a través del método comparativo delta-delta  $C_T (2^{-\Delta\Delta C_T})$ . Se compararon las diferencias de expresión entre las muestras de cáncer e hiperplasia prostática benigna frente a muestras de tejido normal. Adicionalmente, se describieron los patrones de expresión de FMOD, frente a la edad de los pacientes y frente a variables clínico-patológicas como, estadio del tumor y grado de lesión del tumor (gleason score). Se utilizó el estadístico t de Student para el cálculo de los valores p, y un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

## **Biopsias de pacientes con CaP y HPB.**

### **Muestras clínicas.**

La población estudiada fueron hombres que asistieron a consulta urológica y ecográfica para realización de biopsia transrectal de próstata, por sospecha de adenocarcinoma (niveles de PSA mayores a 4 ng/mL y Examen rectal anormal), en el período comprendido de Diciembre de 2011 a diciembre de 2013 en el Hospital Universitario del Caribe (HUC), Cartagena, quienes fueron invitados a

donar un cilindro de tejido prostático para el estudio, y para esto, firmaron un consentimiento informado. Un radiólogo capacitado, realizó la ecografía transrectal de próstata con un transductor retráctil (Avotech®) acoplado a una aguja calibre 18 (Tru-Cut®, Carefusion, UK), con la cual tomó hasta 12 cilindros de 1.0 cm de longitud. Las biopsias se tomaron en las zonas periféricas, parasagittales derechas e izquierdas, en base, tercio medio y vértice prostático, así como en nódulos sospechosos. Los fragmentos de tejido fueron fijados en formalina al 10% y procesados en forma rutinaria por el laboratorio de patología. El cilindro de tejido que se tomó para los análisis moleculares, fue depositado inmediatamente en 500 µL de solución de RNAlater® (Life Technologies) con el fin de preservar la integridad del RNA, posteriormente trasladado al laboratorio de Biología Molecular de la facultad de medicina, de la Universidad de Cartagena, donde fue almacenado a -80°C, hasta su posterior análisis. Cada cilindro estaba acompañado del respectivo reporte radiológico e historia clínica del paciente. Adicionalmente, también se le anexaba el reporte histopatológico entregado por el laboratorio de patología del Hospital Universitario del Caribe, con el cual se clasificó la muestra como cáncer de próstata de acuerdo al Score de Gleason (CaP) o como hiperplasia prostática benigna (HPB) según los criterios del patólogo experto.

#### **Extracción de RNA total a partir de biopsias.**

Cada biopsia de próstata debidamente marcada y rotulada era descongelada a temperatura ambiente durante 5 min, y el volumen de solución de RNAlater® (life

Technologies) era descartado. Luego de esto, cada tejido era depositado en 700  $\mu$ L de solución de lisis Tri Reagent™ (Ambion) y homogenizado con la ayuda del TissueRuptor (QIAGEN) a máxima velocidad durante 1.30 min. Al finalizar este tiempo se adicionaban 300  $\mu$ L Tri Reagent y se homogenizaba suavemente por 30 segundos. Luego, con el tejido completamente homogenizado, se procedía a centrifugar la suspensión a 12.000 xg durante 1 min a 4°C. Finalmente, todo el sobrenadante era transferido a un nuevo tubo (1.5 ml) y se dejaba en reposo por 5 min a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se le agregaban 200  $\mu$ L de cloroformo y se agitaba vigorosamente por 15 segundos para luego dejarlo en reposo, por 2-15 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante era centrifugada a 12.000 xg por 15 minutos a 4.0 °C y con la centrifugación, se obtenía la fase acuosa superior incolora (conteniendo el RNA), la cual era transferida a un tubo de 1.5 mL, para luego adicionarle 500  $\mu$ L de isopropanol, se dejaba en reposo por 5-10 min a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugaba a 12.000 xg por 10 min a 4.0 °C. El RNA precipitado en el fondo del tubo se secaba al aire sobre un papel absorbente por 5-10 min, y, finalmente, el RNA total era re-suspendido con 50  $\mu$ L de agua libre de RNasa y llevado a calentamiento en baño serológico por 5 min a 65 °C y luego almacenado a -80 °C, hasta su posterior utilización. La concentración y pureza del RNA total fue medida por espectrofotometría calculando el cociente entre las absorbancias de 260/280 (Nanodrop, Thermo scientific, USA). Una muestra con cociente de 260/280 entre 1,8 y 2,0 fue considerada de alta pureza para RNA.

### **Síntesis de cDNA a partir de RNA de biopsias.**

La reacción se llevó a cabo en dos etapas: primero la eliminación del DNA genómico y luego la reacción de transcripción reversa. En la primera etapa, 1  $\mu$ g de RNA total fue incubado con el buffer “*gDNA Wipeout*” durante 2 min a 42°C. Después de este tiempo, la muestra de RNA fue adicionada a una pre-mezcla que contenía la enzima transcriptasa reversa Quantiscript del estuche comercial *QuantiTect Reverse Transcription* (QIAGEN), el buffer de reacción (Quantiscript RT Buffer), más la solución de cebadores tipo oligo-dT. El volumen total de la reacción (20  $\mu$ L) fue incubado a 42°C por 30 min, seguido de un ciclo de 95°C por 3 min para inactivar la enzima. Los respectivos cDNA fueron almacenados a -80 °C hasta el momento de su uso en PCR en tiempo real.

### **PCR cuantitativo en tiempo real a partir de biopsias.**

Para el análisis de la expresión génica de FMOD en biopsias de pacientes diagnosticados con CaP y HPB, se utilizaron los oligonucleótidos que están listados en la Tabla 1. Las reacciones de qRT- PCR se llevaron a cabo en el equipo *StepOne Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), usando la química de SYBR Green I. Para cada ensayo, las reacciones fueron preparadas sobre hielo, mezclando 1.0  $\mu$ L del producto de la transcripción reversa, 7.5  $\mu$ L del kit QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2X (QIAGEN) y 1  $\mu$ L de cada oligonucleótido a una concentración de 200 nM hasta completar un volumen final de reacción de 15  $\mu$ L. Las condiciones de reacción incluyeron: una etapa inicial de 95 °C durante 15 min (activación de la polimerasa HotStarTaq), seguido de 45

ciclos de 94°C durante 15 seg, 60°C durante 30 seg y 72°C durante 30 seg. Cada muestra se analizó por triplicado, para estimar reproducibilidad en los datos. Los productos resultantes del PCR se sometieron a análisis de curva de fusión (melting curve) en el mismo equipo para verificar la ausencia de amplificación de productos no-específicos.

Los valores de expresión génica se cuantificaron como el promedio de las tres réplicas y normalizados a los niveles de expresión de los genes constitutivos (*housekeeping*) beta-actina (ACTB) y HPRT. En todos los experimentos, los cálculos de la expresión para FMOD y PSA se realizó a través del método comparativo delta-delta  $C_T$  ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ). Las diferencias estadísticas entre las muestras de CaP y HPB se calcularon con el estadístico t de Student para muestras no pareadas, con el programa GraphPad Prism5 (Graph Pad, SanDiego, CA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

### **Inmunohistoquímica (IHQ) de fibromodulina a partir de biopsias.**

Todos los pacientes que firmaron el consentimiento informado, también aceptaron que su material de biopsia podía ser utilizado en diferentes propósitos del estudio. De esta manera, el laboratorio de patología del HUC, facilitó secciones de los tejidos embebidos en parafina y fijados con formalina (FFPE), los cuales fueron utilizados para determinar la expresión proteica de FMOD a través de IHQ. Se incluyó biopsias de pacientes con cáncer e hiperplasia prostática benigna (HPB). De acuerdo con procedimientos estándares del laboratorio de IHQ de la facultad

de Medicina de Universidad de Cartagena, secciones de parafina de 4 micras de los tejidos fueron colocados en horno a 60°C por 30 minutos, desparafinados con xileno por 5 min y deshidratados en alcohol al 96%, 80% y 70% durante 3 minutos cada uno. Se realizó la recuperación antigénica durante 30 minutos en tampón citrato 10 mM (pH 6.0). Luego, las láminas fueron incubadas con 100 µL del anticuerpo primario, una IgG policlonal de conejo anti- fibromodulin humano (PA5-26250 de ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, EE.UU.) diluido 1:100 con UltraClean Diluent (Thermo Scientific, Fremont, CA, USA) durante 3 horas a temperatura ambiente. Después de cuatro lavados con buffer PBS, se le adicionó el anticuerpo secundario acoplado a la enzima HRP (Ultravision ONE HRP polímer®), y se incubó durante 30 minutos a temperatura ambiente. Para el revelado, se le adicionaron 40 µL del cromógeno 3,3'-diamino-bencidina (DAB Plus Chromogen® de Ultravision ONE Detection System® Kit, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA).

Todas las láminas de tejido se contrastaron (contra-tinción) con hematoxilina durante 3 min y se deshidrataron en alcohol al 70%, 80% y 96%, durante 2 minutos cada uno. Los controles negativos correspondieron a láminas incubadas en ausencia del anticuerpo primario. Finalmente, el montaje de las láminas y la captura de las imágenes se realizó con el microscopio Eclipse 400 conectado a la cámara DS-Fil (Nikon - Japón) con los objetivos de 10X y 40X. La intensidad de la expresión de fibromodulina en los tejidos con CaP y HPB, fue calculada por un patólogo entrenado, el cual asignó una escala cualitativa para la detección de la

expresión, en la cual el grado de tinción sobre el tejido fue definido como tinción marrón ausente y tinción marrón positiva dentro de una escala de 1 a 3, siendo el 1 una tinción débil, 2 moderada y 3 tinción fuerte. Igualmente se describió si la tinción estuvo presente en citoplasma o núcleo o en ambos. En el caso de que la puntuación diferencial de un espécimen no pudiera ser establecida inmediatamente, al menos dos patólogos revisaron y llegaron a un consenso para determinar el marcador final. Las diferencias estadísticas entre los dos grupos se calcularon con el estadístico Chi-cuadrado para muestras no pareadas, utilizando el programa GraphPad Prism5 (Graph Pad, SanDiego, CA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

### **Inmunoensayos enzimáticos (ELISAs) para fibromodulina y PSA en pacientes con CaP y HPB.**

En esta fase del estudio, a los pacientes clasificados en subgrupos de acuerdo al estado/grado de la enfermedad diagnosticada con base en el estudio histopatológico de biopsia y los parámetros clínicos, se les determinó la concentración de la proteína fibromodulina en suero y orina mediante ensayo ELISA específico. A las mismas muestras de suero y orina de cada paciente se les determinó también, bajo las mismas condiciones, la concentración de PSA total en suero mediante un ensayo ELISA comercial. Adicionalmente se obtuvo una muestra de sangre periférica y una de orina de donantes voluntarios (controles)

que carecían de historia personal y familiar de enfermedades prostáticas, tales como prostatitis, HPB o cáncer de próstata.

### **Recolección de las muestras de sangre y orina.**

Se obtuvo una muestra de sangre periférica y una de orina de los pacientes que asistieron a la consulta urológica y ecográfica para realización de la biopsia transrectal de próstata. Ambas muestras se tomaron justo antes de la toma de la biopsia, siempre y cuando los pacientes no estuvieran recibiendo previamente terapias anticancerosas. Las muestras de sangre y de orina fueron transportadas hasta el laboratorio de biología molecular del grupo, para su posterior procesamiento dentro de las 24 horas de su obtención.

### **Muestras de suero.**

Las muestras de sangre periférica de pacientes y de controles se colectaron en tubos sin aditivo (tubos vacutainer® de 10 ml, BD), los cuales fueron centrifugados por 15 min a 1000 xg en centrifuga refrigerada. El suero recolectado fue almacenado en alícuotas de 100 µL a – 80°C hasta su posterior análisis mediante ensayos de ELISA específicos para PSA y fibromodulina. Las muestras fueron mantenidas a 4.0°C durante su manipulación y las muestras donde se observó hemolisis de glóbulos rojos a simple vista se descartaron.

### **Muestras de orina.**

Las muestras de orina de pacientes y controles se colectaron en tubos cónicos de 50 mL (tubos Falcon, BD), las cuales fueron centrifugadas por 20 min a 1000 xg en centrifuga refrigerada. El sobrenadante recuperado fue pasado por filtros de 0,45 µm, con el fin de eliminar impurezas y detritos celulares que pudieran interferir con los análisis ulteriores; finalmente un volumen de orina entre 20 y 30 mL fueron almacenados a – 80°C hasta su análisis mediante ensayos ELISA específicos para PSA y fibromodulina. Las muestras fueron mantenidas a 4.0°C durante su manipulación y en aquellas donde se observó una turbidez indicativa de contaminación microbiana a simple vista, fueron descartadas.

### **Grupo control.**

como se mencionó al inicio de esta sección, para propósitos de comparación, el estudio incluyo muestras de sangre y orina obtenidas de individuos controles, con características demográficas comparables a la población estudio pero que carecían de antecedentes personales o familiares de enfermedades prostáticas. Todos los individuos firmaron un consentimiento informado y llenaron una ficha epidemiológica de ingreso al estudio. Con el fin de establecer los valores de referencia de fibromodulina en sangre y en orina, los controles se asignaron a tres grupos etarios, siguiendo las recomendaciones de la sociedad americana de urología. Los rangos de edades de los grupos fueron: 40-54, 55-69 y mayor de 70 años. Adicionalmente, a cada individuo control se le determinó el nivel de PSA

total en suero. Como controles negativos se utilizarón muestras de orina y sangre de mujeres.

### **Ensayo ELISA para fibromodulina.**

Para la cuantificación de la proteína en muestras de suero y de orina se adquirió el inmunoensayo enzimático tipo sándwich, ELISA Kit for Fibromodulin SEB494Hu 96 Tests, de la casa comercial Wuhan USCN Business Co, Ltd. (Houston, USA). La placa de micro-titulación proporcionada en este kit venia pre-cagada con un anticuerpo monoclonal específico para fibromodulina humana, además, incluye una solución stock de 20 ng/ml de fibromodulina recombinante, a partir de la cual se prepararon las diluciones seriadas de seis estándares. La detección se hizo a través de un segundo anticuerpo específico conjugado con biotina, el cual interacciona con la avidina conjugada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP).

### **Estándares de fibromodulina.**

Una vez reconstituido el estándar de 20 ng/mL con solución diluyente (*Standard Diluent*), se prepararon diluciones seriadas con concentraciones de 20ng/mL, 10ng/mL, 5ng/mL, 2.5ng/mL, 1.25ng/mL, 0.625ng/mL y 0.312ng/mL. Como blanco se utilizó solución diluyente (0ng/ml).

### **Procedimiento del Ensayo:**

100  $\mu$ L de estándares, muestras de suero y de orina (a las diluciones apropiadas) en triplicado se agregaron a los respectivos pozos de la placa de micro-titulación y se incubaron a 37°C por 2 horas. Al finalizar este tiempo, se descartó el líquido de cada pozo y sin lavar la placa se agregó 100  $\mu$ L del anticuerpo policlonal secundario conjugado con biotina a todos los pozos, incubando por 1h a 37°C. El exceso de anticuerpo secundario se descartó por inversión y se lavó con 350  $\mu$ L de buffer de lavado por 4 veces y cada lavado se hizo por 30 - 60 segundos. El exceso de líquido fue eliminado colocando el plato sobre papel absorbente y se adiciono a cada pozo 100  $\mu$ L de solución de Avidina conjugada con Peroxidasa de Rábano Picante (HRP), incubando por 30 min a 37°C. Seguidamente se realizaron tres lavados consecutivos y se agregaron 100  $\mu$ L de sustrato cromogénico TMB (Tetrametilbenzidina) incubando por 15-20 min a 37°C protegido de la luz. Finalmente se terminó la reacción, agregando 50  $\mu$ L de solución de ácido sulfúrico a cada pozo, mezclando suavemente e inmediatamente se midieron las densidades ópticas (O.D) en lector de micro placas a 450nm (Multiskan™, Thermo Scientific).

### **Cuantificación de fibromodulina.**

Se promediaron las lecturas espectrofotométricas (O.D) de las réplicas de los estándares y de las muestras sustrayendo previamente la lectura del blanco. Se construyó una curva estándar de la proteína mediante análisis de regresión lineal, y con base en esta se calcularon las concentraciones del proteoglicano en las

muestras. Los pacientes fueron clasificados en varios grupos dependiendo del diagnóstico que tuviesen: HPB, Prostatitis, CaP en etapa temprana (T1/T2), CaP en etapa avanzada (T3/T4). El grupo control, se utilizó para las comparaciones. Las diferencias de los niveles de fibromodulina tanto en suero como en orina entre dos grupos se calcularon con el test de Mann-Whitney para muestras no pareadas que no tienen distribución normal. Las comparaciones múltiples entre más de dos grupos se realizaron con ANOVA o prueba de Kruskal-Wallis, dependiendo el comportamiento de los datos. Todos los análisis se hicieron utilizando el programa GraphPad Prism5 (Graph Pad, SanDiego, CA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

### **Ensayo ELISA para PSA.**

La concentración del antígeno prostático específico (PSA) en suero y orina de pacientes y controles se determinó mediante un inmunoensayo enzimático cuantitativo comercial tipo sándwich Total Prostate Specific Antigen (tPSA) Test System (Monobind Inc, USA), el cual incluye un microplato de 96 pozos los cuales han sido recubiertos con un anticuerpo monoclonal específico para PSA, incluye además seis estándares de PSA de concentración conocida (0, 2, 5, 10, 25, 50 - ng/ml).

### **Procedimiento del ensayo PSA.**

Se adicionaron 25  $\mu\text{L}$  de cada estándar de PSA y muestras de orina y suero de pacientes y controles a los pozos respectivos por duplicado. Seguidamente se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de conjugado enzimático a todos los pozos y se incubó por 30 min a temperatura ambiente. Luego se eliminó el contenido de la microplaca por decantación y se lavó tres veces consecutivas con 350  $\mu\text{L}$  de buffer de lavado y se agregaron 100  $\mu\text{L}$  de sustrato TMB (Tetrametilbenzidina) a cada pozo y se incubó por 15 min a temperatura ambiente, al cabo de los cuales se agregaron 50  $\mu\text{L}$  de solución de parada a todos los pozos e inmediatamente se midieron las densidades ópticas (O.D) en lector de microplacas a 450nm (Multiskan™, Thermo Scientific).

### **Cuantificación de PSA.**

Mediante análisis de regresión lineal se construyó una curva estándar para PSA con base en las concentraciones (ng/ml) y sus respectivas lecturas de absorbancia. Con base en la curva estándar se determinaron las concentraciones de las muestras desconocidas, promediando previamente las lecturas espectrofotométricas de las réplicas y sustrayendo la lectura del blanco. Las diferencias estadísticas entre dos grupos se calcularon con el test de Mann-Whitney, y las comparaciones múltiples entre más de dos grupos se realizaron con la prueba Kruskal-Wallis, utilizando el programa GraphPad Prism5 (Graph Pad, SanDiego, CA). Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

### **Características operativas de fibromodulina.**

Una vez validado el perfil de expresión del transcrito FMOD en líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas, en paneles comerciales de cáncer de próstata y en biopsias de pacientes con cáncer y otros desordenes prostáticos, se buscó determinar el potencial diagnóstico de este proteoglicano para discriminar correctamente a pacientes con cáncer de individuos sin cáncer (HPB, controles) en muestras de suero y orina. Para este propósito, se llevó a cabo un análisis de curvas ROC, calculando el estadístico de área bajo la curva (AUC >0.5) con un intervalo de confianza del 95%. La curva ROC fue usada para graficar 1-especificidad vs sensibilidad para todos los puntos de corte (cut-off) en el rango de los niveles de fibromodulina observados. La sensibilidad fue definida como la proporción de casos con un valor de fibromodulina por encima del punto de corte escogido, mientras que la especificidad fue definida como la proporción de no casos (HPB, controles) con un valor de FMOD por debajo del punto de corte escogido. Se realizaron pruebas individuales y en comparación y combinación con PSA. Los análisis estadísticos se llevaron a cabo en el programa *GraphPad Prism5* (Graph Pad, SanDiego, CA). Las curvas ROC se generaron utilizando el modelo matemático DeLong (122) y se compararon en una prueba de 2 colas. Adicionalmente, se realizó una regresión logística univariada para los valores séricos y las variables clínico-patológicas en los pacientes con cáncer, tales como, edad, puntuación de Gleason, volumen prostático y niveles de PSA.

## RESULTADOS.

### **Expresión del transcrito FMOD en líneas celulares de cáncer de próstata.**

Con base en los hallazgos de nuestro trabajo previo (12), este estudio inició validando el perfil de expresión de FMOD a nivel de transcrito en dos líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas, las cuales fueron: LNCaP, que posee un fenotipo pobremente metastásico y PC-3, la cual tiene un fenotipo metastásico agresivo; adicionalmente, se utilizó la línea celular PWR-1E la cual es no tumorigénica y fue utilizada como línea control de referencia.

En cuanto a los resultados, estos indicaron una correlación inversa entre los niveles de expresión del transcrito FMOD y la agresividad del fenotipo canceroso, de tal manera que la línea LNCaP tuvo una expresión de FMOD significativamente mayor que la línea PC-3 que posee un fenotipo de alta agresividad ( $p=0.0001$ ), comparados con los niveles basales de la línea no tumorigénica; esto indicó claramente una expresión diferencial de FMOD entre las dos líneas celulares, tal como se ilustra a continuación en la Tabla 4 y Figura 6. Otra forma de validar que la expresión de FMOD en las líneas celulares se debía a las diferencias fenotípicas de las líneas, fue determinando la expresión del transcrito de PSA (ver Tabla 4), que en este caso fue utilizado como normalizador de la expresión. Se encontró que PSA estuvo significativamente sobre-expresado en LNCaP (un valor de expresión "Fold change" de PSA > 20,  $P=0.0001$ ), mientras que sus niveles en la línea PC-3 fueron bajos o no fueron detectados. Estos resultados de PSA,

fueron consistentes con los datos y características descritas en la literatura para estos dos tipos celulares (revisado en la sección de métodos).

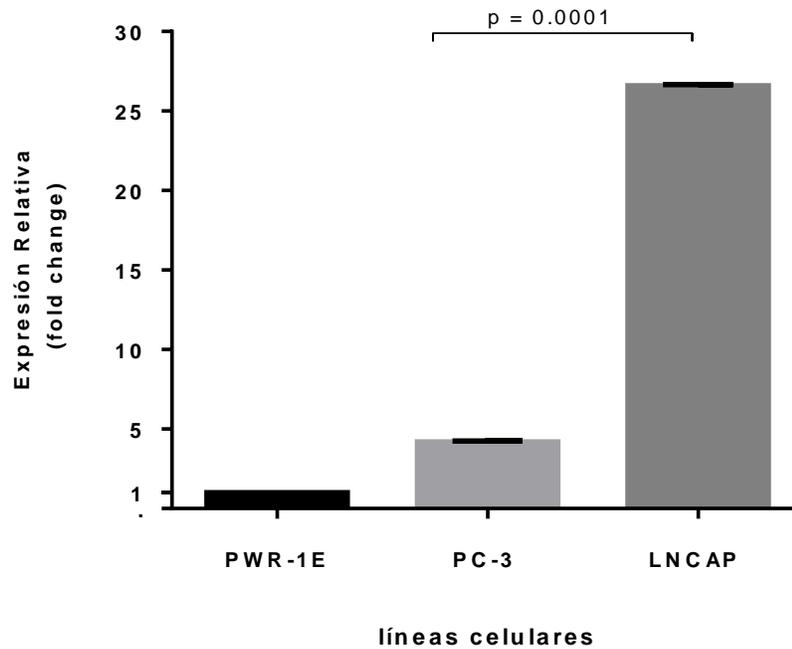
Por otro lado, la eficiencia de las reacciones de qRT-PCR para detectar tanto la expresión de FMOD como la de los genes constitutivos  $\beta$ -actina y HPRT fue del 100%, tal como lo indican los análisis de curva de fusión (melting curve) que se encuentran representados a continuación en la Figura 7.

**Tabla 4. Perfiles de expresión de FMOD y PSA en las líneas celulares de próstata humana.** Los valores de “*Fold Change*” indican la sobre expresión del transcrito en PC-3 y LNCaP comparados con PWR-1E.

Línea celular	Valor medio del $C_T$ ( $\pm$ DE) y genes de referencia.				Cambios en la expresión (Fold Change)		
	FMOD	$\beta$ -actina	HPRT	PSA	FMOD	PSA	$p^*$
PWR-1E	36,0 ( $\pm$ 1,0)	16,6 ( $\pm$ 0,01)	22,5 ( $\pm$ 0,03)	34,6 ( $\pm$ 0,13)	1,0	1,0	-
PC-3	34,5 ( $\pm$ 0,38)	18,3 ( $\pm$ 0,08)	23,7 ( $\pm$ 1,38)	36,9 ( $\pm$ 0,28)	4,2	ND	0,002
LNCaP	29,8 ( $\pm$ 0,16)	16,0 ( $\pm$ 0,08)	22,9 ( $\pm$ 0,05)	15,6 ( $\pm$ 0,04)	26,6	55,9	0,0001

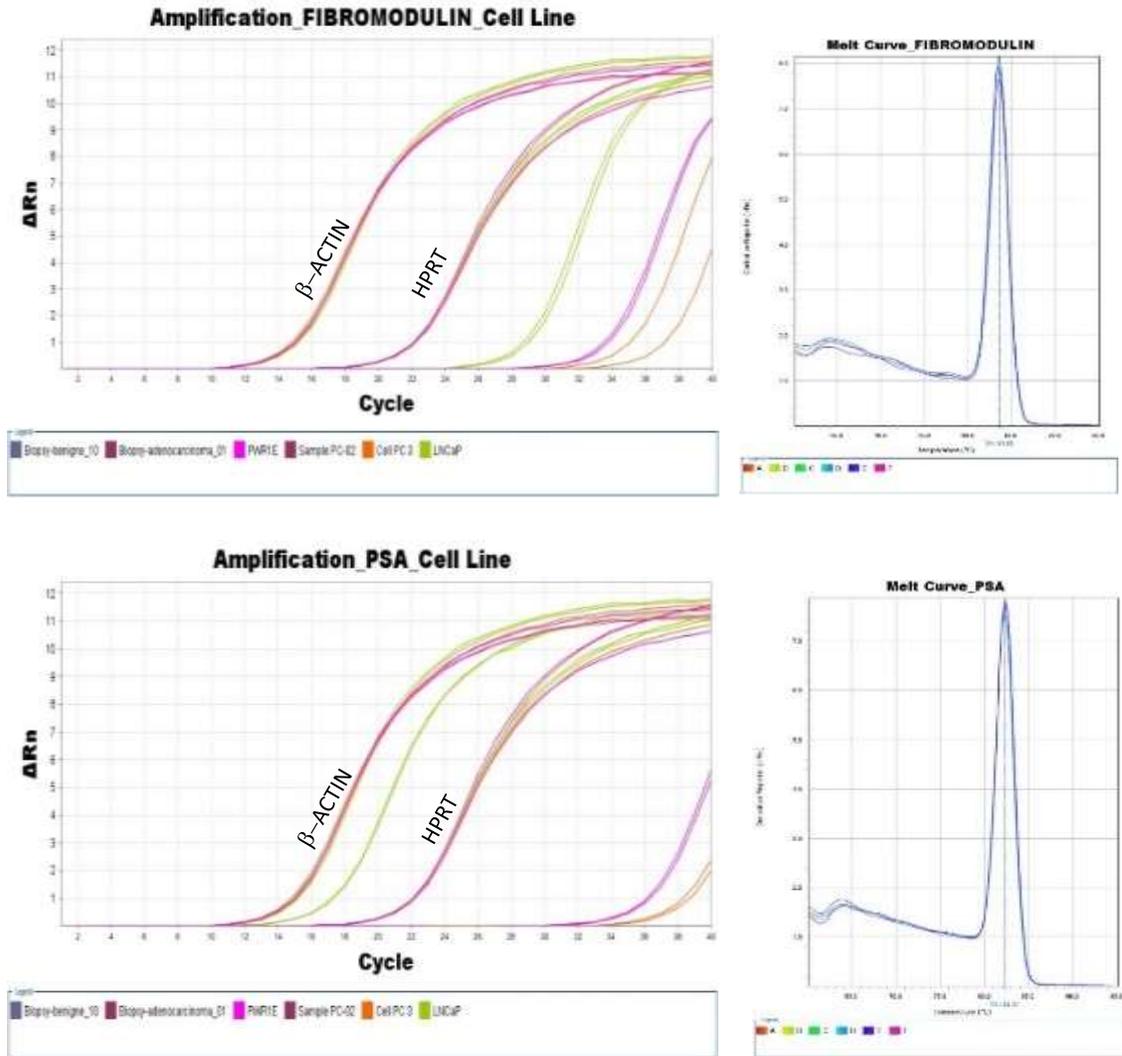
$C_T$  (Cycle threshold): indica el ciclo en el cual la fluorescencia detectada en la reacción de RT-PCR supera el umbral de detección, lo cual es considerado como una amplificación positiva del transcrito evaluado (umbral de ciclo). El  $C_T$  es inversamente proporcional a la cantidad o nivel inicial de expresión del gen de interés.

\* valores de  $p$  a partir de una prueba t de dos colas. ND: no detectado.



**Figura 6. Niveles de expresión del transcrito FMOD en las líneas celulares.** los niveles de expresión se presentan de acuerdo la línea de referencia PWR-1E. se observa que los niveles en la LNCaP fueron significativamente mayores que en la línea PC-3. Todos los experimentos fueron llevados a cabo en triplicado y las diferencias fueron calculadas con una prueba-t a partir del programa estadístico GraphPad Prism V6.02.

---



**Figura 7. Curvas de amplificación para FMOD y PSA en líneas celulares.** En el eje de las Y se observa la tasa de fluorescencia detectada en la amplificación, mientras que el eje de las X el número de ciclos de qRT-PCR. La curva de amplificación de color verde en el gráfico superior indica la expresión de FMOD en la línea LNCaP, seguido de las curvas de color violeta para la línea PC-3 y por último la curva roja para PWR-1E. Las curvas del grafico inferior son para el PSA. Los genes  $\beta$ -actina y HPRT están marcados sobre la curva de amplificación. Las curvas melting (derecha de la figura) muestran un único pico, lo que indica la ausencia de amplificación de productos no-específicos y una eficiencia de los cebadores del 100%.

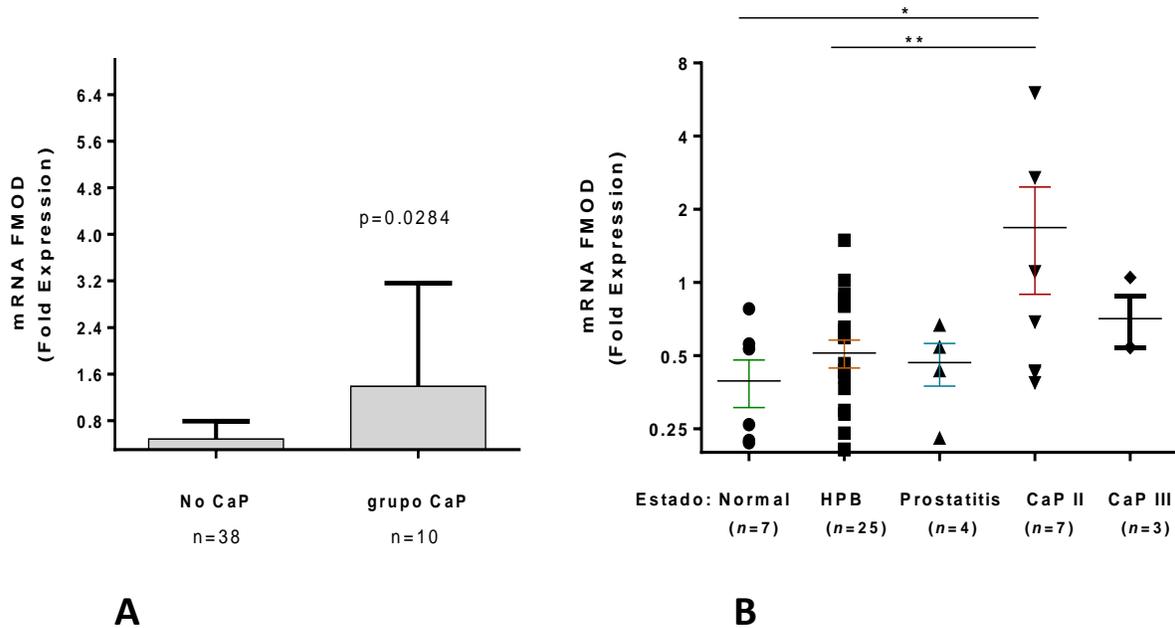
## **Expresión del transcrito FMOD en paneles comerciales de cáncer de próstata.**

La siguiente etapa de validación del transcrito FMOD se realizó en los paneles comerciales de TissueScan Prostate Cancer cDNA Array I de CaP humano (# cat. HPRT-01, Origene Technologies), que contenían cDNA de 48 pacientes clasificados como CaP (n=10; estadios II/III), hiperplasia prostática benigna (HPB) (n=27), prostatitis (n=4) y tejido normal de próstata (n=7).

Inicialmente, nuestro análisis permitió identificar de forma general una diferencia significativa entre el nivel de expresión de FMOD en individuos con diagnóstico de cáncer (n=10) respecto aquellos sin cáncer (grupo normal, HPB y prostatitis (n=38)) ( $p = 0.0284$ ) (ver Figura 8 A). Estos resultados preliminares nos permiten concluir que FMOD tiene el potencial de discriminar entre cáncer y no cáncer, sin embargo, un análisis detallado por grupos entre las muestras de cáncer frente a la hiperplasia prostática benigna y frente a muestras de tejido normal y prostatitis por separado, permitió observar una correlación entre HPB y el cáncer (individuos en etapa II de la enfermedad), de tal manera que hubo una expresión significativamente mayor en el grupo con cáncer en etapa II que en el grupo de HPB ( $p=0.002$ ) (ver Figura 8 B).

Igualmente se observó expresión diferencial entre el grupo con cáncer en etapa II respecto al grupo normal ( $p=0.031$ ). Contrario a esto, FMOD no mostró capacidad para discriminar entre tejido normal ( $n=7$ ) y tejido en etapa avanzada del cáncer ( $n=3$ ), ni entre etapas tempranas ( $n=7$ ) y etapas avanzadas del cáncer de próstata.

Adicionalmente, no se encontró correlación significativa entre los perfiles de expresión de FMOD y la edad de los pacientes, así como tampoco con variables clínico-patológicas como el grado de lesión del tumor (Gleason score), lo que pudiera indicar alguna relación con la progresión de la enfermedad.



**Figura 8. Niveles del transcrito FMOD en muestras clínicas comerciales de CaP humano.** (A) diferencias significativas entre individuos con diagnóstico de cáncer (n=10) respecto a aquellos con diagnóstico de no cáncer (n=38). Se aplicó el estadístico t de Student para muestras no pareadas. (B) expresión diferencial de FMOD entre los diferentes grupos de muestras: HPB: grupo de hiperplasia prostática benigna; CaP II y III: grupo de individuos diagnosticados con cáncer en etapa temprana (II) y avanzada (III). Las diferencias se determinaron por ANOVA. Para estimar la reproducibilidad de los datos se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo. \*  $P < 0.05$ ; \*\*  $P < 0.001$ .

## **Expresión del transcrito FMOD en biopsias de pacientes con cáncer y otros desordenes prostáticos benignos.**

La tercera etapa de validación del transcrito FMOD se realizó a nivel de biopsias transrectales de próstata de pacientes atendidos en el Hospital Universitario del Caribe. La población estudiada fueron hombres que asistieron a la consulta urológica y ecográfica por sospecha de adenocarcinoma. El estudio incluyó 90 pacientes que fueron remitidos debido a que presentaban un nivel de PSA >4.0 ng/mL (rango de PSA: de 4.17 a 128,2 media de 119.4 ng/ml), un examen rectal anormal y adicionalmente presentaba síntomas de obstrucción urológica. La edad promedio fue de 68.5 ( $\pm 8.86$  años) y solo dos pacientes informaron de una historia familiar de cáncer de próstata. Con base en los resultados del laboratorio de patología, 48.9% de los pacientes (n=44) recibieron un diagnóstico de cáncer y el 51.1% (n = 46) fueron diagnosticados con otras patologías, principalmente hiperplasia prostática benigna. La tabla 5 describe las características generales de los pacientes incluidos en el estudio.

En cuanto a la edad, entre el grupo de pacientes con cáncer y el grupo sin cáncer hubo una diferencia significativa, el promedio de edad en el grupo de cáncer fue de 71.4 años mientras que en el grupo sin cáncer el promedio fue de 65.9 años en ( $p = 0,003$ ). Otra variable que se describió en la población de estudio fue el volumen prostático al momento de la biopsia. En general, el valor medio en ambos grupos de pacientes fue de 49.4 cm<sup>3</sup> (rango de 17 a 162 cm<sup>3</sup>). Además, no se encontró asociación significativa entre el volumen prostático y/o la presencia de

nódulos hipoeicoicos en los individuos con cáncer (ver Tabla 5). Además, no hubo evidencia de compromiso de las vesículas seminales en ninguno de los pacientes y los valores de la densidad de PSA (PSAD) fueron significativamente mayores en el grupo con cáncer (media: 4.75 ng/ml/cm<sup>3</sup>) en comparación con el grupo sin cáncer (media: 0.41ng/ml/cm<sup>3</sup>).

También, se observó que en el 77.7% de los pacientes con cáncer, el porcentaje de tumor reportado por el patólogo en la biopsia abarco más del 50% del tejido evaluado, es decir, el tumor estuvo presente en por lo menos 8 de los 10 cilindros recolectados y evaluados en el laboratorio de patología. Además, ninguna de las biopsias con diagnóstico de adenocarcinoma tenía evidencia de invasión vascular o capsular que indicara estados avanzados de la enfermedad, y la infiltración peri neural se observó solo en 18 de los pacientes con carcinoma. En conjunto, estos resultados patológicos clasificaron a los pacientes en un estadio clínico temprano del cáncer (T2). Estos resultados se tomaron como criterio para seleccionar las biopsias con tumor que fueron sometidas a análisis de expresión génica de FMOD (n=28), comparadas con aquellas donde el diagnostico patológico fue HPB (n=20).

**Tabla 5. Características generales de los pacientes.** Las categorías de pacientes con o sin cáncer se hizo de acuerdo al reporte patológico. Los parámetros evaluados fueron tomados de los reportes urológicos y ecográficos.

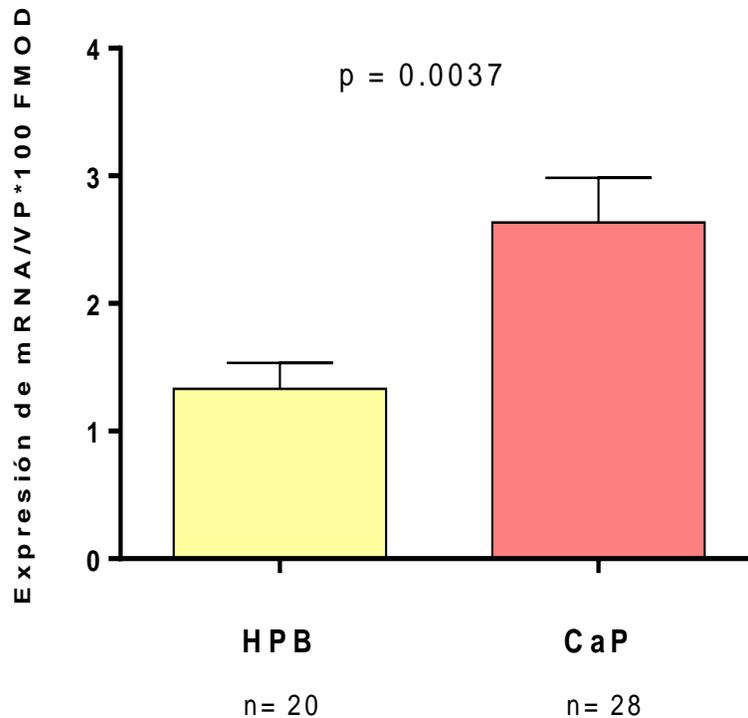
<b>Parámetros</b>	<b>Pacientes con cáncer (n= 44; 48.9%)</b>	<b>Pacientes sin cáncer (n= 46; 51.1%)</b>	<b>p valor</b>
<b>EDAD</b>			
Media (±SD)	71.4 (1.28)	65.9 (1.24)	0.003
Rango	52 – 84	53 – 87	
<b>Niveles de PSA (ng/mL)</b>			
Media	58.45	16.7	< 0.001*
Rango	11.8– 128.2	4.17 – 100	
<b>Categorías de PSA (ng/mL)</b>			
	<b>n (%)</b>	<b>n (%)</b>	
4,01 – 10	5 (11.3)	25 (54.3)	
> 10,01	35 (79.5)	12 (26.0)	< 0.001†
desconocido	4 (4.4)	9 (21.7)	
<b>Volumen prostático (cc)</b>			
Media	49.3	49.7	0.521*
Rango	19 – 162	17 – 140	
<b>Rango del Volumen (cc)</b>			
< 40	24 (54.5)	18 (39.1)	0.204†
> 40	20 (45.5)	28 (60.9)	
<b>PSAD ng/mL/cm<sup>3</sup></b>			
Media	4.75	0.41	< 0.001*
Rango	0.15 - 33.89	0.07 - 2.63	
<b>Rango de PSAD</b>			
< 0.15	1 (2.2)	11 (23.9)	
> 0.15	39 (88.6)	26 (56.5)	0.0011†
desconocido	4 (9.0)	9 (19.5)	
<b>Nódulos Hipoeicoicos</b>			
SI	20	22	0.835†
NO	24	24	

\* Mann-Whitney U test. † Fisher exact test. PSAD: densidad de PSA

Para efectos del análisis de expresión génica, el nivel de cada transcrito de FMOD encontrado en cada biopsia se normalizó con el volumen prostático (VP) del paciente respectivo. Esta normalización nos permitió encontrar que los niveles de FMOD fueron significativamente mayores en los pacientes con adenocarcinomas que en los pacientes con hiperplasia prostática benigna ( $p=0.003$ ; Mann-Whitney U-test), de tal manera que FMOD discrimino el grupo de adenocarcinomas del grupo de hiperplasia prostática benigna (ver Tabla 6 y Figura 9). Estos hallazgos fueron coherentes con los encontrados en el panel de muestras comerciales y nos permitió seguir avanzando en la evaluación de FMOD como nuevo biomarcador del CaP a nivel proteico en las mismas biopsias.

**Tabla 6. Perfil de expresión de FMOD en biopsias de tejido prostático.** Los valores de “*Fold Change*” indican la sobre expresión del transcrito en cada grupo de pacientes (HPB y CaP) normalizado frente a los genes de referencia.

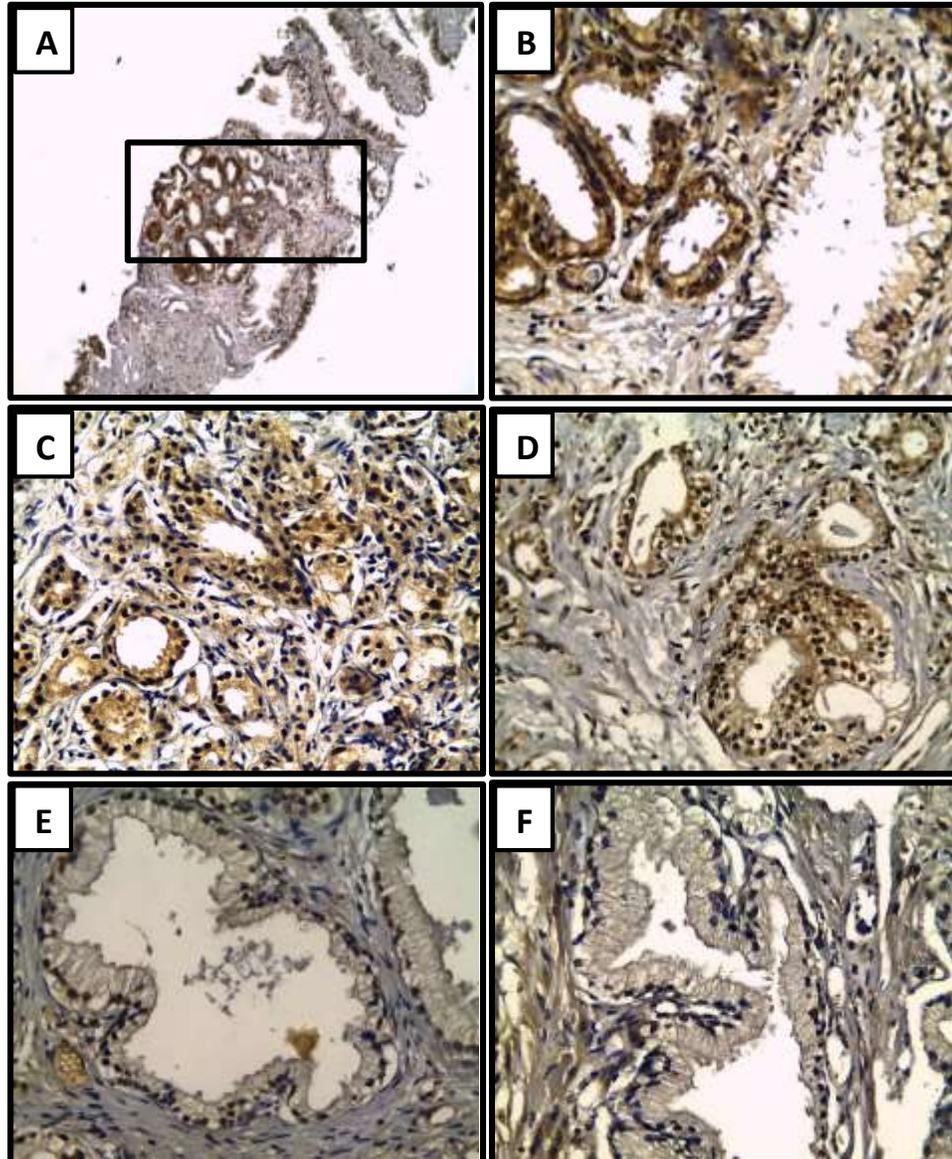
Grupo de pacientes	C <sub>T</sub> promedio para FMOD y genes de referencia.			Cambios en la expresión (Fold Change)	
	FMOD	β-actina	HPRT	FMOD	p
HPB (n=20)	28,7 (±2,3)	24,6 (±2,9)	35,3 (±3,1)	2,90	
CaP (n=28)	25,9 (±2,5)	22,3 (±2,1)	32,6 (±2,2)	5,09	
					0,0282



**Figura 9. Niveles del transcrito FMOD en pacientes diagnosticados con HPB y cáncer de próstata a partir de biopsia.** Los niveles de mRNA fueron cuantificados por PCR en tiempo real y normalizados con  $\beta$ -actina y HPRT. Los valores se expresan como el cociente entre el número de copias de FMOD sobre el volumen prostático (VP) de cada paciente. Las diferencias se determinaron por Mann-Whitney U-test. Para estimar la reproducibilidad de los datos se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo.

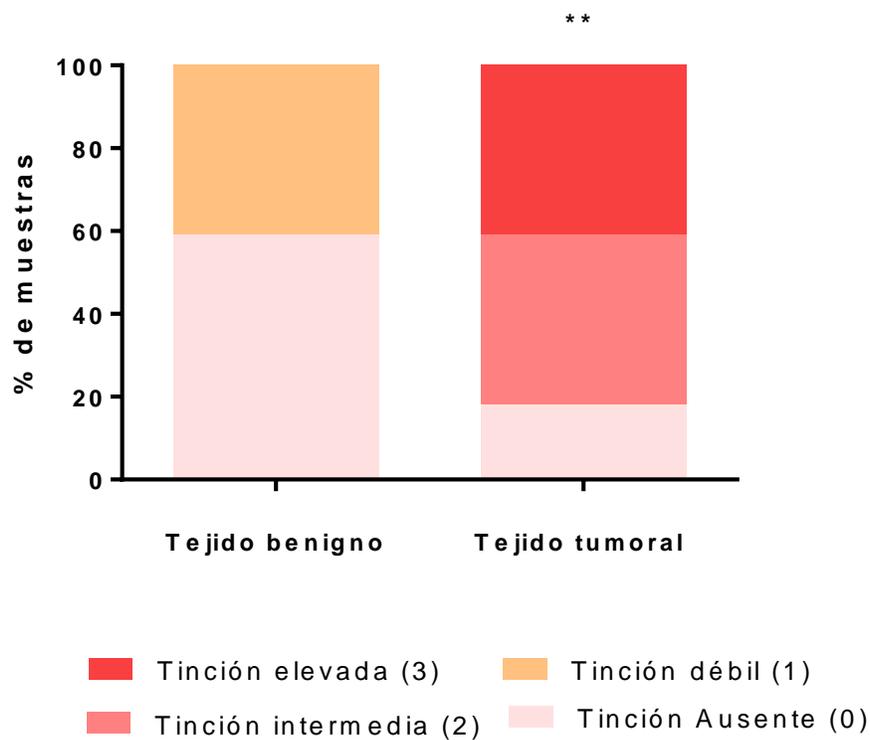
### **Inmunohistoquímica en biopsias de tejido prostático.**

Para analizar la expresión y localización de la proteína fibromodulina *in situ*, un total de 44 secciones de tejidos prostáticos entre cancerosos (n=17) y benignos (n=27) se sometieron a inmunotinción con un anticuerpo primario específico para fibromodulin, tal como se describió en la sección de métodos (ver Figuras 10 y 11). De manera significativa se observó que, dentro de la misma muestra de tejido la tinción de fibromodulin fue más intensa en los acinos glandulares malignos que en los acinos benignos adyacentes (Figuras 10 A-B). Además, la tinción positiva para fibromodulina en el tejido canceroso fue tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células epiteliales (Figuras 10 C-D). También se observó que dentro de la misma muestra de un paciente, la proteína se expresó a niveles mucho más altos en las células epiteliales cancerosas que en el estroma prostático circundante (Figura 10 C-D). Contrario a estos hallazgos, en el tejido benigno, la tinción de fibromodulina fue negativa en las células epiteliales y débil en el estroma (Figura 10 E-F).



**Figura 10. Expresión proteica de fibromodulina en secciones de tejido prostático.** Acinos prostáticos malignos (A) con una tinción fuerte al lado de un acino benigno con tinción débil, en la misma muestra de tejido de un paciente diagnosticado con cáncer de próstata y Gleason 6 (100x). (B) Aumento hasta 400x de la sección marcada en la gráfica A. Tinción positiva a nivel citoplasmática (C) y nuclear (D) en células epiteliales cancerosas en una muestra de tejido de un paciente diagnosticado con CaP un Score de Gleason 6 (400x). Tinción citoplasmática (E) negativa en células epiteliales y tinción estromal débil (F) en una muestra de tejido de un paciente diagnosticado de hiperplasia prostática benigna.

Para cuantificar el nivel de expresión de fibromodulina en los tejidos con CaP y HPB, el patólogo experto, asignó una escala cualitativa para la detección de la proteína, de tal manera que la intensidad de la tinción fue clasificada en cuatro categorías dentro de una escala de 0 a 3, siendo 0 una tinción ausente, 1 tinción débil, 2 tinción intermedia y 3 una tinción elevada. De acuerdo con esto, el análisis reveló que en el 59.0 % de las secciones de tejido benigno, la expresión de fibromodulina estuvo ausente, y en el 41% se observó una tinción débil (ver Figura 11). Por el contrario, en las secciones de tejido tumoral el porcentaje de tinción fue del 82 % para las categorías 2 y 3, y en ningún caso hubo tinciones débiles, sin embargo, en el 18 % de las muestras tumorales no se observó tinción (ver Figura 11). La comparación de la distribución de las muestras en diferentes categorías entre el tejido benigno y maligno, reveló una correlación positiva y significativa (test de Chi cuadrado,  $P < 0,001$ ). Por lo tanto, la expresión de fibromodulina fue significativamente mayor en el cáncer de próstata que en las hiperplasias prostáticas benignas analizadas en esta población; sin embargo, el incremento de la expresión proteica de FMOD no se correlacionó con el puntaje de Gleason en ninguno de los adenocarcinomas analizados y tampoco hubo correlación con el estadio del tumor.



**Figura 11. Distribución de la intensidad de la señal de fibromodulina en tejido prostático.** La distribución de la intensidad de la tinción en los tejidos tumorales (n=17) respecto a los tejidos benignos (n=27) fue mucho mayor, siendo las categorías de tinción 2 y 3 las más predominante en tumor. \*\*  $P < 0.001$  test Chi- cuadrado.

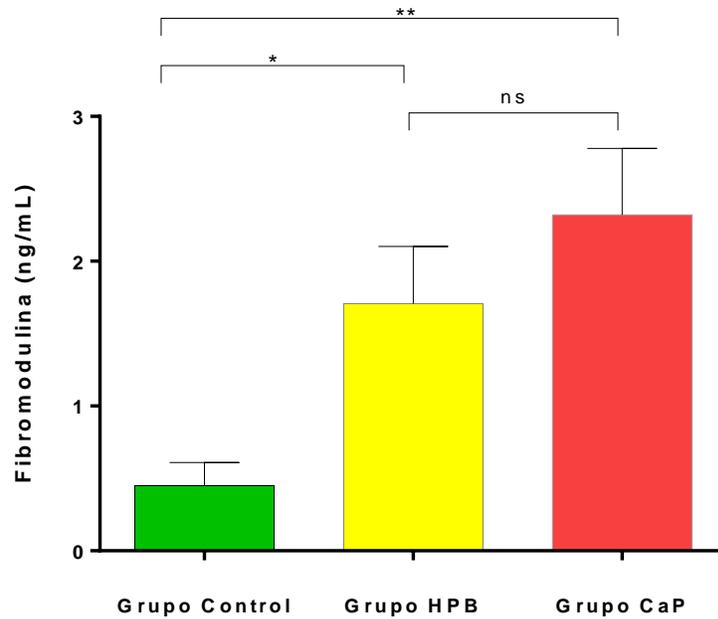
### **Niveles proteicos de fibromodulina en suero de pacientes con HPB y CaP.**

En conjunto, los resultados hallados a nivel de transcrito y proteína en tejidos justificaron la necesidad de continuar con la validación de FMOD a nivel de proteína en suero y orina de los mismos pacientes para definir su utilidad real como biomarcador de diagnóstico temprano del CaP. Para esto, los pacientes diagnosticados con HPB (n=46) y CaP (n=44) con base en el reporte histopatológico de biopsia, se les determinó la concentración de FMOD en suero mediante ensayo ELISA específico. Además, también a las mismas muestras de suero, se les determinó la concentración de PSA total. Adicionalmente se obtuvo una muestra de sangre periférica de donantes voluntarios sanos (n=40) (controles) que carecían de historia personal y familiar de enfermedades prostáticas, tales como prostatitis, HPB o cáncer de próstata.

En general, se encontró que los niveles sanguíneos fueron significativamente mayores en el grupo de HPB y cáncer respecto al grupo control, y no se encontró diferencia entre los niveles de HPB y cáncer (ver Figura 12). Específicamente para el grupo control los niveles séricos oscilaron entre 0.0 ng/mL – 4.75 ng/mL (media: 0.45 ng/mL; IC: 0.129 – 0.771 ng/mL); para el grupo de HPB los niveles estuvieron entre 0.0 ng/mL – 13.8 ng/mL (media: 1.78 ng/mL; IC: 0.916 – 2.499 ng/mL) y para el grupo de CaP los niveles estuvieron entre 0.0 – 14.6 ng/mL (media: 2.32 ng/mL; IC: 1.402 – 3.239 ng/mL). Cuando el nivel sérico de cada paciente en el grupo de HPB y de cáncer fue normalizado con su respectivo volumen prostático (VP) (ng/mL dividido por su VP) se encontró que los valores fueron significativamente

mayores en los pacientes con adenocarcinomas (media: 12.09 ng/mL/VP; IC:7.414 – 16.77) que en los pacientes con hiperplasia prostática benigna (media: 5.705 ng/mL/VP; IC: 3.586 – 7.825) ( $p=0.031$ ; Mann-Whitney U-test), de tal manera que fibromodulina discrimino el grupo de adenocarcinomas del grupo de HPB. Este hallazgo fue similar al encontrado a nivel de transcrito en biopsias, en las cuales una normalización con el respectivo volumen prostático fue significativa.

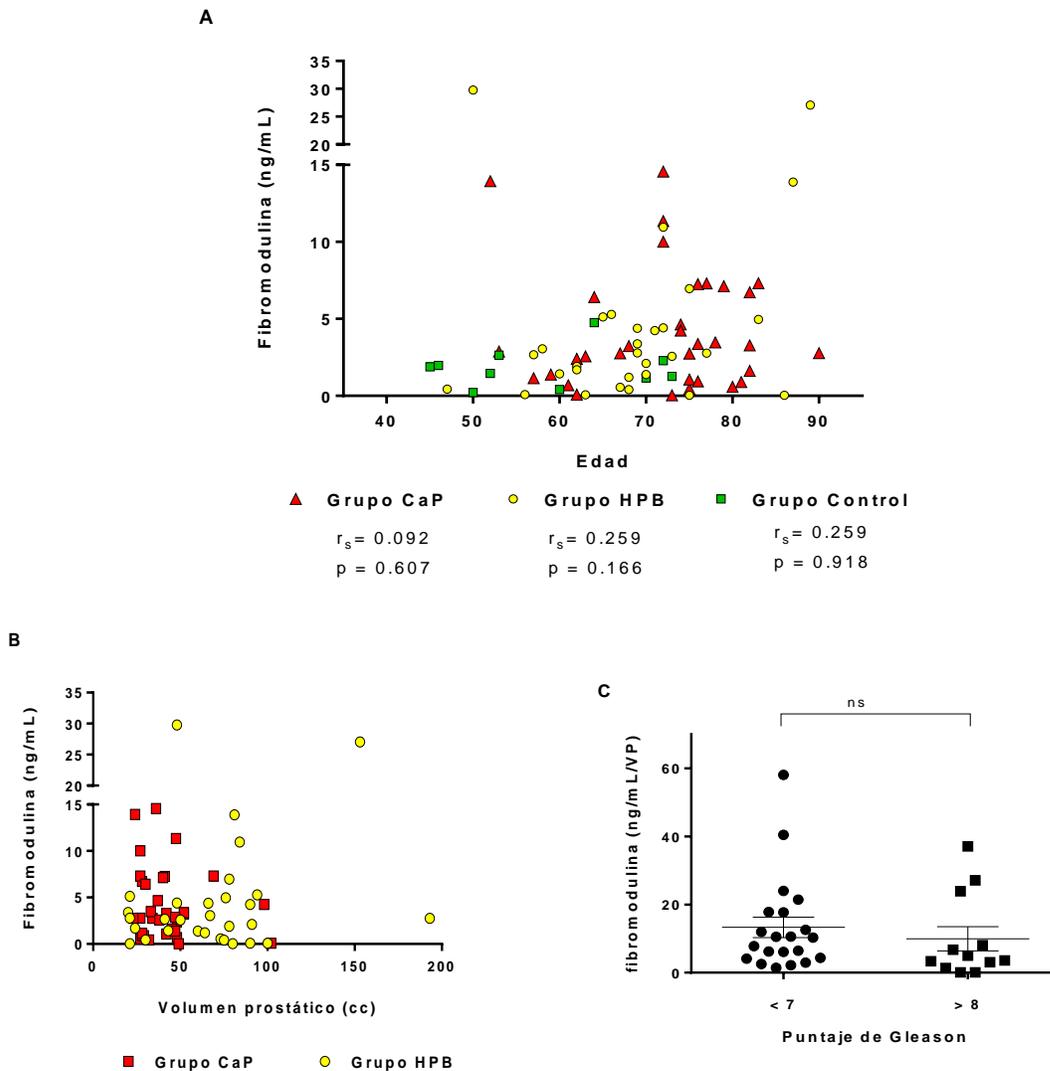
En cuanto a los niveles de PSA en la población de estudio, se observó que en el grupo de cáncer (media: 58.45 ng/mL, rango de 11.8 a 128.2 ng/mL) los niveles fueron significativamente diferentes a los del grupo sin cáncer (media: 16.7 ng/mL, rango de 4.1 a 100 ng/mL),  $p < 0,01$  (ver Tabla 5). Además, la significancia se mantuvo después de que los pacientes fueron clasificados en dos grupos de acuerdo a sus niveles de PSA, de manera que la frecuencia general del cáncer fue del 11,3% en el grupo de pacientes con PSA entre 4 y 10 ng/mL y del 79.5% en los pacientes con PSA  $>10$  ng/mL (ver Tabla 5). Para el grupo control los niveles de PSA estuvieron entre 0.21 y 2.72 ng/mL (promedio: 0.75 ng/mL). En conclusión, los rangos de PSA entre los diferentes grupos analizados fue comparable al reportado en otros estudios para este grupo poblacional (PSA CaP  $>$  PSA HPB  $>$  Controles).



**Figura 12. Niveles proteicos de fibromodulina en muestras de suero.** Pacientes diagnosticados con cáncer de próstata, con hiperplasia prostática benigna (HPB) y en el grupo control. Kruskal-Wallis test ( $p= 0.0023$ ). Dunn's multiple comparisons test: \*  $p < 0.05$ . \*\*  $p < 0.01$ . Media ( $\pm$ SEM).

---

Por otra parte, también se determinó la asociación entre los valores séricos de fibromodulina y la edad, así como con variables clínico-patológicas como la etapa del tumor (T2/T3), la puntuación de Gleason (Gleason Score) y el volumen prostático. Para la variable edad, no hubo correlación significativa con los niveles séricos, ni para el grupo de pacientes (cáncer y HPB) ni para el grupo de controles (Figura 13 A). En el caso del puntaje de Gleason y el volumen prostático tampoco se observó asociación con los niveles de fibromodulina en ninguno de los grupos (Figura 13 B y C). Este mismo hallazgo fue observado en la expresión proteica a nivel de tejido, donde no se correlacionó con el puntaje de Gleason en ninguno de los adenocarcinomas analizados y tampoco hubo correlación con el estadio del tumor. Lo que nos indica que, en la población analizada los niveles proteicos de este proteoglicano no tuvieron relación directa con la progresión de la enfermedad.

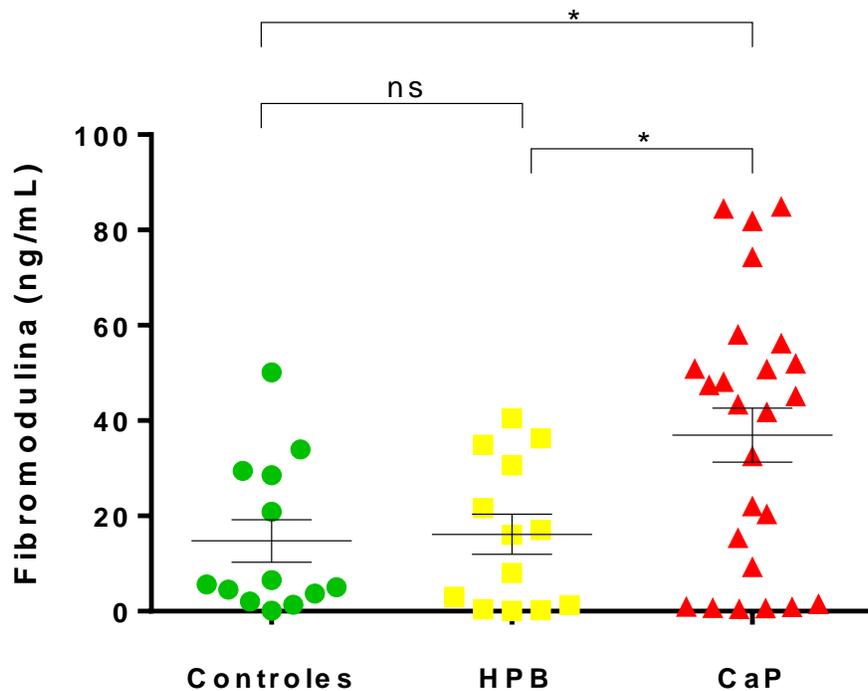


**Figura 13. Distribución de las concentraciones séricas de acuerdo a la edad, el volumen prostático y el puntaje de Gleason.** En (A), los niveles de fibromodulina no se correlacionaron con la edad en el grupo control, grupo de HPB y de cáncer ( $r_s$ :  $r$  de Spearman). (B) Distribución de los niveles séricos en el grupo HPB y el grupo de cáncer de acuerdo al volumen prostático ( $r_s$  HPB: 0,1142 IC: -0,2671 a 0,4646) ( $r_s$  CaP: -0,1466 IC: -0,4747 to 0,2173) ( $p > 0.05$ ). (C) En los pacientes con cáncer, la concentración sérica ajustada por el VP, no se asoció con los puntajes de Gleason más altos, es decir, la concentración en pacientes con Gleason < 7 fue mayor que en los pacientes con Gleason > 8, sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Mann–Whitney U tests,  $p > 0.05$ ). Todos los datos están representados como los valores medios más o menos el error estándar de la media ( $\pm$ SEM).

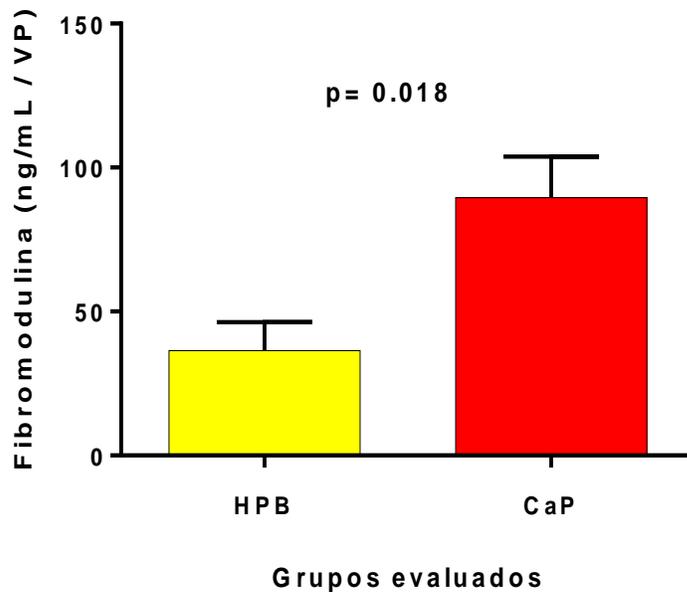
### **Niveles proteicos de fibromodulina en orina de pacientes con HPB y CaP.**

El análisis a nivel urinario reveló que en el grupo de cáncer los niveles fueron significativamente mayores a los del grupo HPB y el grupo control (ANOVA,  $p=0.0064$ ) (ver Figura 14). Entre HPB y controles no hubo diferencias significativas, caso contrario a lo observado en sangre, donde los niveles de HPB fueron más altos que los encontrados en los controles (ver Figura 12). Específicamente para el grupo control los niveles en orina oscilaron entre 0.12 y 50.15 ng/mL con un valor medio de 14.77 ng/mL (IC: 5.076 – 24.47ng/mL); para el grupo de HPB los niveles estuvieron entre 0.16 y 32.79 ng/mL con una media de 16.16 ng/mL (IC: 6.95 – 25.41 ng/mL) y para el grupo de CaP, los niveles estuvieron entre 0.46 y 84.91ng/mL con una media de 36.96 ng/mL (IC: 25.25 – 48.68 ng/mL).

En sangre, los niveles séricos de fibromodulina en el grupo de CaP respecto al grupo HPB fueron significativamente mayores solo cuando los valores de cada paciente fueron normalizados con el volumen prostático, indicando al parecer un efecto del volumen sobre dichos niveles. En cambio, en orina no se observó esta particularidad, ya que los niveles en los pacientes con CaP fueron significativamente diferentes a los del grupo HPB, sin necesidad de ser normalizarlos con el volumen (ver Figura 14). Ahora bien, la normalización de los niveles en orina (fibromodulina ng/mL/VP) mantuvo la significancia entre estos dos grupos (Mann–Whitney U tests;  $p=0.018$ ). (ver Figura 15).



**Figura 14. Niveles proteicos de fibromodulina en muestras de orina.** En pacientes diagnosticados con cáncer de próstata (CaP), los niveles fueron mayores que en el grupo de pacientes con hiperplasia prostática benigna (HPB) y en el grupo control. Resumen de ANOVA,  $p= 0.0064$ . test de normalidad de D'Agostino-Person. Prueba de comparación múltiple de Holm-Sidak. \*  $p < 0.05$ . ns: no significativo.

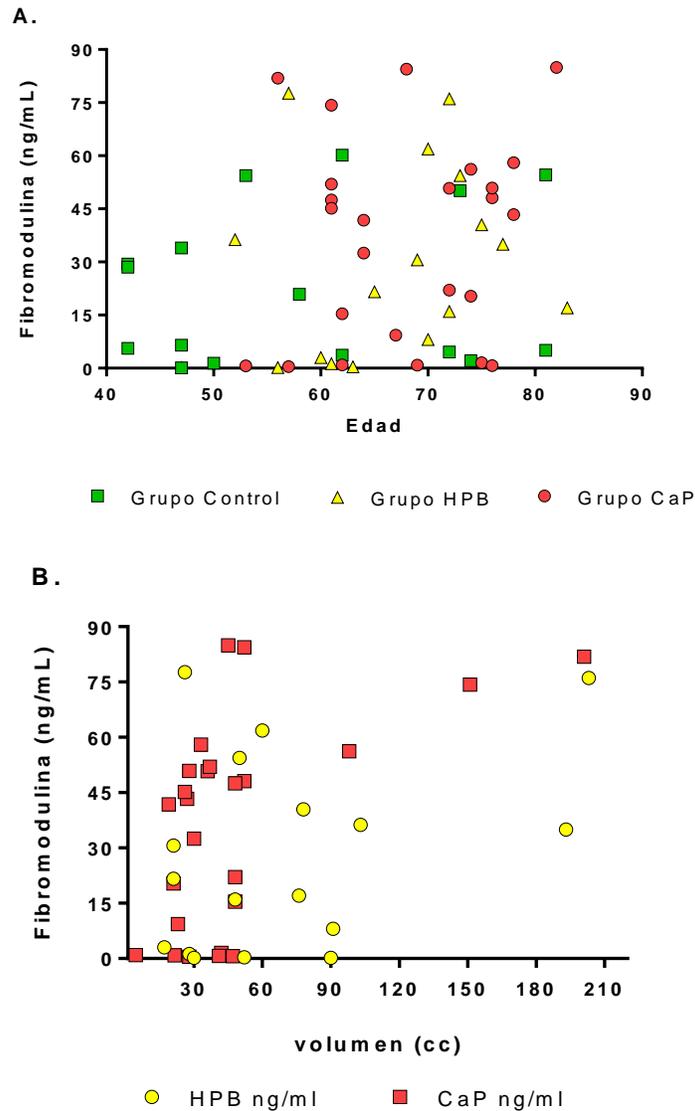


HPB: media 36.39 ng/mL/VP (IC: 0.22 - 108.8)  
 CaP: media 89.59 ng/mL/VP (IC: 1.30 - 219.9)

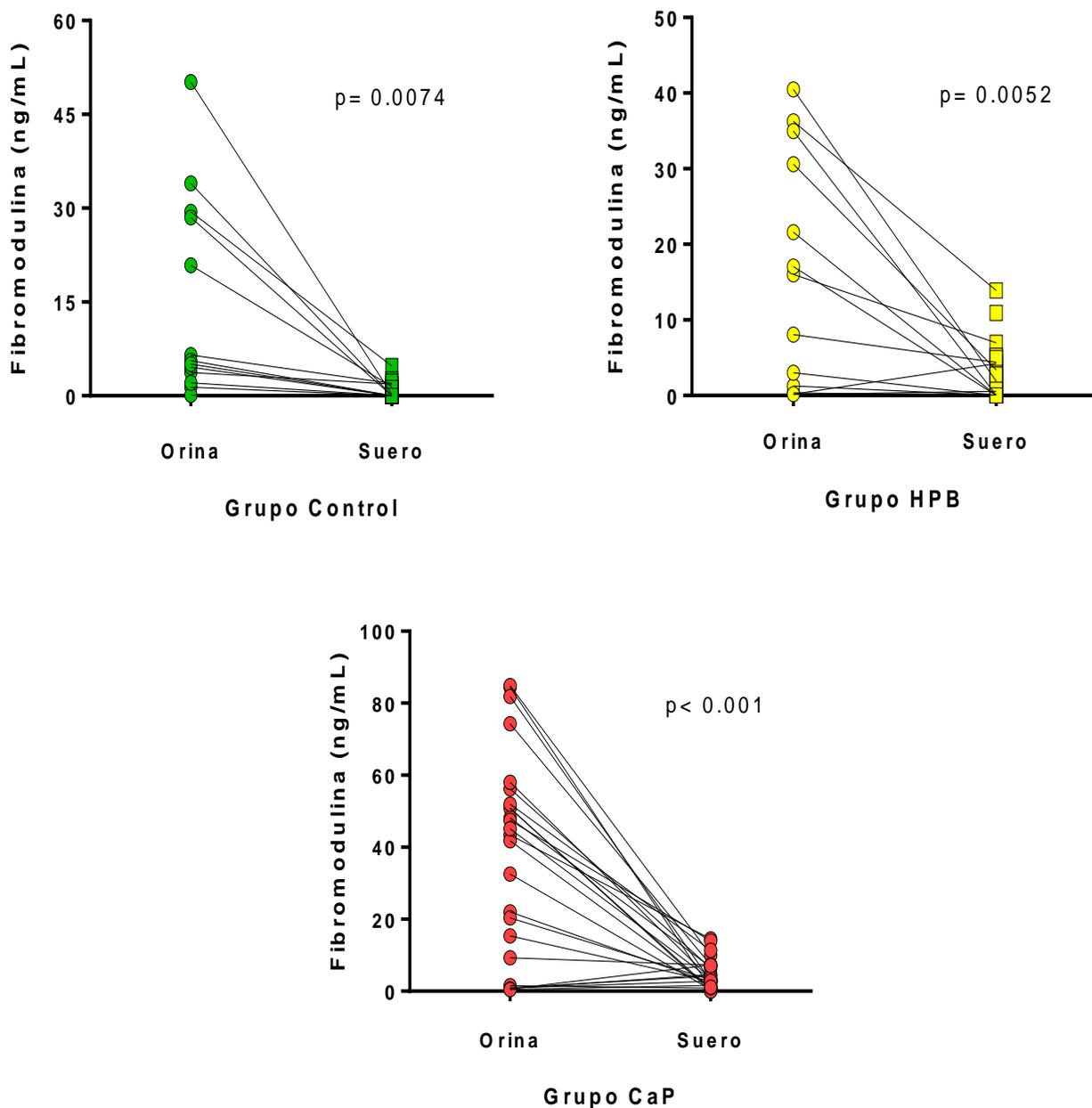
**Figura 15. Fibromodulina en orina normalizado frente a los volúmenes prostáticos.** Los valores se expresan como el cociente entre el nivel en orina sobre el volumen prostático (VP) de cada paciente. En este caso para un grupo representativo de HPB y un grupo de cáncer (CaP). Los niveles proteicos fueron cuantificados por ELISA. Las diferencias se determinaron por una prueba Mann–Whitney U tests. Para estimar la reproducibilidad de los datos, se llevaron a cabo tres experimentos independientes. Un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como significativo. Datos expresados como la Media ( $\pm$ SEM).

Por otra parte, también se determinó la asociación entre los valores en orina y la edad, así como con el volumen prostático. Para la variable edad, los niveles en orina no se correlacionaron significativamente, ni con el grupo de pacientes (cáncer y HPB) ni con los controles (ver Figura 16 A). En el caso del volumen, tampoco se observó asociación con los niveles en ninguno de los grupos (ver Figura 16 B). Estos resultados fueron muy similares a los observados a nivel de tejidos y sangre, donde fibromodulina no se correlacionó significativamente con la edad, el puntaje de Gleason y el volumen en ninguno de los adenocarcinomas analizados. En conjunto estos resultados, nos indican que por lo menos en esta población analizada, los niveles proteicos (sangre / orina) de FMOD tienen el potencial de servir en el diagnóstico diferencial de patologías prostáticas tempranas, mas no en estadios clínicos avanzados.

Por último, cabe resaltar que existieron diferencias significativas entre los niveles de expresión de la proteína en muestras de sangre respecto a los de orina, tanto en el grupo de pacientes diagnosticados con CaP y HPB, como en el grupo de individuos controles (ver Figura 17).



**Figura 16. Distribución de las concentraciones en orina de acuerdo a la edad y el volumen prostático.** En (A) los niveles no se correlacionaron con la edad en el grupo control, el grupo de HPB o el grupo de cáncer ( $R^2$  de Pearson,  $p > 0.05$ ). En (B) la distribución de los niveles en el grupo HPB y el grupo de cáncer de acuerdo al volumen prostático tampoco fueron significativos ( $p > 0.05$ ). Los datos están representados como los valores medios más o menos el error estándar de la media ( $\pm$ SEM).



**Figura 17. Comparación entre los niveles séricos y urinarios en cada grupo estudiado.** El mismo inmunoensayo ELISA aplicado a las muestras de sangre y orina, reveló que los niveles proteicos de fibromodulina estuvieron significativamente más elevados en la orina. Las diferencias se determinaron por una prueba t-student con corrección de Welch.

### **Características operativas de FMOD como nuevo biomarcador del CaP.**

Los valores de expresión en las muestras clínicas se representaron a través de una curva de características operativas (ROC; receiver operator characteristic), con el fin de analizar el grado en que la expresión y los niveles de fibromodulina diferenciaran correctamente el cáncer de una enfermedad prostática benigna. Se calculó un área bajo la curva (AUC) y una tabla de coordenadas se utilizó para seleccionar un punto de intersección favorable donde existiera un equilibrio entre la sensibilidad (eje de ordenadas) y la especificidad (eje de abscisas), que correspondiera con un punto de corte para todos los tipos de muestras analizadas.

Se establecieron tres categorías para el análisis ROC: la primera (A) estuvo conformada por pacientes diagnosticados con CaP, HPB y los sujetos controles; la segunda (B) por pacientes con CaP y el grupo control; y la tercera (C) estuvo conformada por pacientes con CaP y HPB y ambos grupos normalizados con el volumen prostático (VP). Cabe resaltar que en las tres categorías se analizaron por separado los niveles del transcrito en biopsias, y de la proteína en sangre y orina.

Inicialmente, se realizó un análisis de curva ROC para los valores relativos de expresión de FMOD en biopsias y en el panel de cDNA, y lo que se determinó fue una especificidad moderada (54.84%), pero una sensibilidad más alta (75.67%) en un punto de corte fijado en 1.937 de expresión relativa. El área bajo la curva fue de 0.753 (SE = 0.065; IC<sub>95%</sub>: 0.625 – 0.882), y el valor predictivo positivo (VPP) fue

del 80 % (24/30 pacientes), mientras que el valor predictivo negativo (VPN) fue del 54.8 % (17/31 pacientes).

En cuanto al desempeño de fibromodulina en las muestras de suero, el análisis ROC se encuentre descrito en la Tabla 7. Se observó que el área bajo la curva de las categorías A y B no fueron significativas, a diferencia de la categoría C la cual tuvo un AUC= 0.70 ( $p=0.01$ ) y con un comportamiento muy similar a la misma categoría de PSA (AUC=0.70;  $p=0.003$ ). La sensibilidad (75.76%; IC<sub>95%</sub>: 57.74 – 88.91) y especificidad (52.1%; IC<sub>95%</sub>: 31.31 – 72.20) alcanzada para esta prueba fueron discretas con un punto de corte de 3.340 ng/mL/VP lo que se denominó densidad de fibromodulina (DFMOD) (ver Tabla 7 y Figura 18). El VPP para esta categoría C fue de 67.5 % y el VPN solo alcanzo el 40.0 %. Estos resultados permiten concluir que la normalización de los niveles sanguíneos de fibromodulina con el volumen prostático (categoría C) discriminan moderadamente entre cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna; mientras que las categorías A y B no expresan características significativas, además en estos grupos no fue posible normalizar con el VP ya que no se contó con este valor en el grupo control.

Respecto al desempeño diagnóstico de fibromodulina en orina, se observó que su capacidad para diferenciar un individuo con cáncer de un individuo sano o con una enfermedad benigna de la próstata, fue significativa en las tres categorías analizadas (ver Tabla 8). En el caso de la categoría C el área bajo la curva (AUC=0.76) fue mayor a la de las categorías B (AUC=0.73) y A (AUC=0.71),

indicando una vez más que el volumen prostático puede influir en el resultado. Las diferencias entre la sensibilidad y especificidad, valores de VPP y VPN en las respectivas categorías se encuentran descritas en la Tabla 8.

**Tabla 7. Niveles séricos y curvas ROC para tres categorías de acuerdo al grupo analizado.**

Categoría	Descripción	Niveles séricos		Curvas ROC		
		medios de fibromodulina		AUC	IC95%	p
		(ng/mL)	p			
A	CaP vs NoCaP*	2.32 - 1.16	0.033	0.61	0.48 - 0.75	0.10
B	CaP vs Controles	2.32 - 0.45	0.001	0.69	0.54 - 0.86	0.06
C†	CaP vs HPB	12.09 - 4.80	0.001	0.70	0.58 - 0.84	0.007

\* NoCaP: contiene al grupo control y HPB

† Normalizado con el volumen prostático (densidad de fibromodulina: DFMOD)

**Tabla 8. Características operativas de los niveles de fibromodulina en orina (ng/mL).**

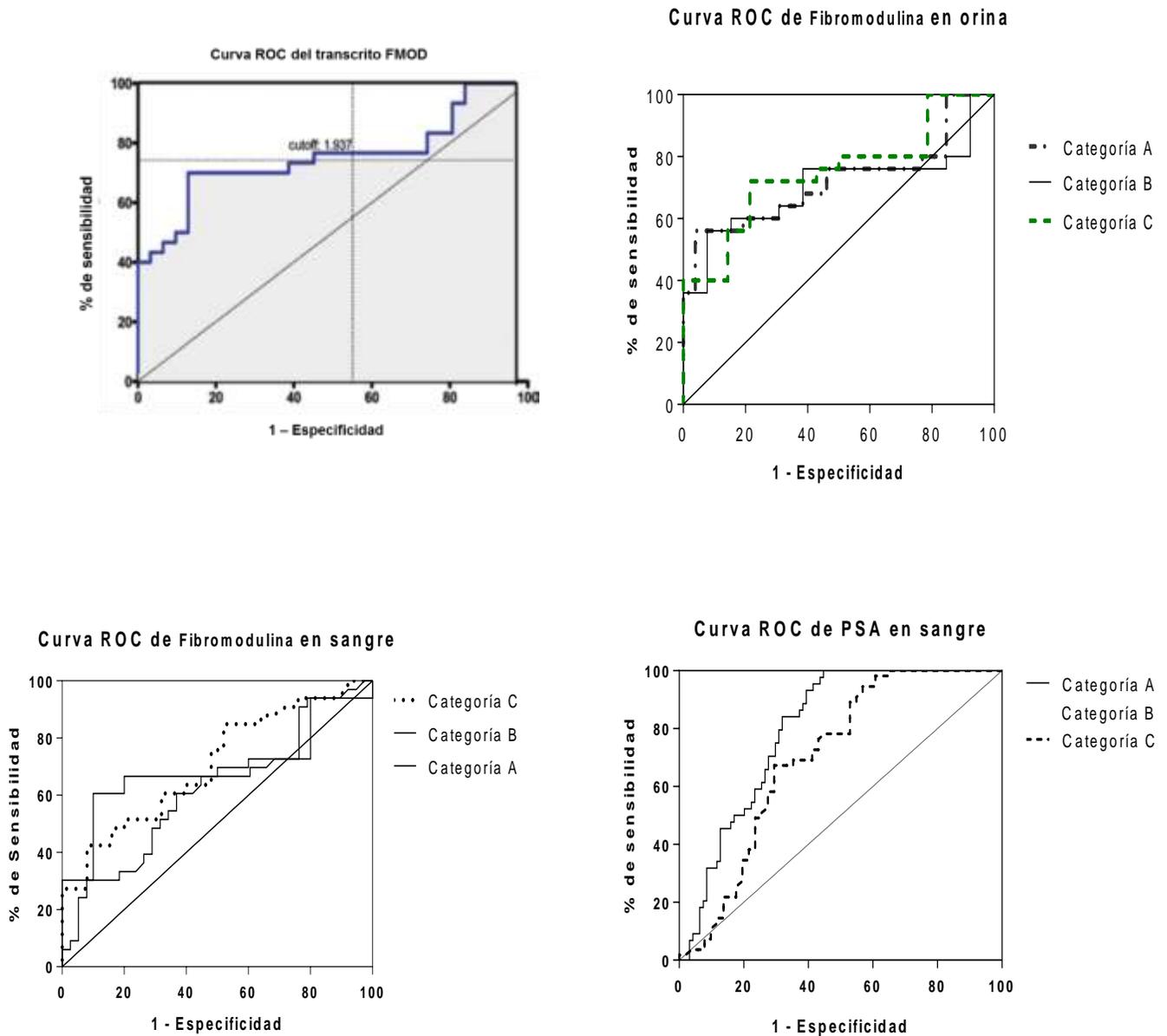
<b>Categoría</b>	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C†</b>	
<b>Descripción</b>	<b>CaP vs NoCaP*</b>	<b>CaP vs controles</b>	<b>CaP vs HPB</b>	
<b>AUC</b>	0.72	0.70	0.75	
<b>Curvas ROC</b>	<b>IC<sub>95%</sub></b>	0.58 - 0.86	0.54 - 0.86	0.60 - 0.91
	<b>p</b>	0.007	0.043	0.010
<b>Punto de corte</b>	8.690	7.925	38.99	
<b>S</b>	76	76	72	
<b>IC<sub>95%</sub> S</b>	54.87 - 90.64	54.87 - 90.64	50.61 - 87.93	
<b>E</b>	53.85	61.54	78.57	
<b>IC<sub>95%</sub> E</b>	33.37 - 73.41	31.58 - 86.14	49.20 - 95.34	
<b>VPP</b>	61.3	79.2	85.7	
<b>VPN</b>	30.0	42.3	61.1	
<b>RVP</b>	1.647	1.976	3.360	

\* NoCaP: contiene al grupo control y HPB

† normalizado con el volumen prostático.

E: especificidad; S: sensibilidad; VPP: valor predictivo positivo; VPN: valor predictivo negativo; RVP: razón de verosimilitud positiva.  $p < 0.05$  significativa.

La impresión gráfica de la relación entre la sensibilidad y la especificidad en cada una de las categorías y tipos de muestras estudiadas, fueron representadas en las curvas tipo ROC, las cuales facilitaron la elección de los puntos de corte con el fin de valorar todo el espectro de valores que la fibromodulina alcanzó dependiendo del tipo de muestra (ver Figura 18).



**Figura 18. Curvas ROC por tipo de muestra y de acuerdo la categoría analizada.** Categoría A: confirmada por pacientes diagnosticados con CaP, HPB y los sujetos controles. Categoría B: pacientes con CaP y el grupo control. Categoría C: confirmada por pacientes con CaP y HPB y ambos grupos normalizados con el volumen prostático (VP).

## DISCUSIÓN.

El cáncer de próstata es una enfermedad única y heterogénea, y por tal razón, actualmente existe una gran necesidad clínica no satisfecha de desarrollar biomarcadores que permitan distinguir entre la enfermedad indolente, que no es letal, de la enfermedad agresiva, que progresa rápidamente a enfermedad metastásica (123); por lo tanto, el objetivo principal de las actuales investigaciones sobre biomarcadores en urología se centra en el descubrimiento de nuevas moléculas que puedan ser traducidas a la práctica clínica donde puedan mejorar tanto la detección temprana del cáncer como la predicción de riesgo para los pacientes (124). En este sentido, este estudio propuso evaluar de forma sistemática el potencial del proteoglicano fibromodulina como nuevo biomarcador de diagnóstico del CaP. Inicialmente, el gen FMOD, se identificó como un transcrito asociado a diferentes fenotipos o etapas de progresión de la enfermedad en un modelo murino *in vitro* desarrollado por nuestro grupo de investigación (12). Con base en estos hallazgos, se seleccionó como modelo de estudio para ser validado en humanos, para lo cual se analizó su perfil de expresión en líneas celulares epiteliales de cáncer de próstata humanas con diferentes fenotipos metastásicos, así como en muestras clínicas comerciales de cáncer de próstata y tejido prostático benigno. Adicionalmente, se determinó su expresión como transcrito y proteína en biopsias de pacientes con cáncer y otros desordenes prostáticos, y también se evaluaron sus niveles proteicos en sangre y orina en la misma población. Finalmente se determinaron sus características operativas como nuevo biomarcador de cáncer de próstata.

La fibromodulina pertenece a la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs) (101), los cuales son importantes componentes de la matriz extracelular especialmente necesarios para el mantenimiento de los tejidos y su función principal está relacionada con la maduración y ensamblaje de las fibras de colágeno en la matriz extracelular (16-18). En general, los proteoglicanos pueden actuar como efectores moleculares en la superficie celular y en el microambiente pericelular, y también pueden tener un papel en el inicio y progresión del cáncer debido a su capacidad para interactuar con diversos ligandos y receptores, y por lo tanto mediar una amplia gama de efectos. Los datos de una serie de estudios sugieren que las alteraciones en la composición y la función de proteoglicanos, pueden promover tanto la supervivencia de las células del cáncer de próstata como su metástasis (26, 27, 125, 126).

El papel de varios proteoglicanos en el desarrollo del cáncer de próstata se ha investigado e incluye el de los proteoglicanos SLRPs decorina (104, 127-130), perlecano (131) y versicano (132-134), así como el del proteoglicano de superficie celular syndecano-1 (135-138). En el caso de fibromodulina, su relación con el cáncer en general es limitada y su papel en el cáncer de próstata se desconoce. Los estudios en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica de células B (CLL-B) lo encontraron significativamente sobre-expresado comparado con las líneas no tumorales (23, 24); además, ha sido caracterizado como antígeno tumoral, debido a su potencial para generar una respuesta antitumoral específica, permitiendo seleccionar linfocitos T CD8+ específicos (25). Recientemente, Mondal B, *et al.*, a

través de un análisis genómico funcional, identificaron a FMOD como un gen sobre regulado en glioblastoma, debido a la pérdida de la metilación de su promotor; además, demostraron que la forma secretada de fibromodulina promueve la migración de las células de glioma a través de su capacidad para inducir la formación de nuevas fibras de actina generando re arreglos en el cito esqueleto de las células tumorales (139).

Varios miembros de la familia SLRPs relacionados estructural y funcionalmente con fibromodulina también han sido relacionados con la regulación del crecimiento celular y el inicio de la tumorigénesis (26, 27), sugiriéndolos como relevantes para el diagnóstico y/o pronóstico de diversos cánceres (125). Por ejemplo, de los mencionados anteriormente, se encuentra decorina, uno de los miembros de la familia de la fibromodulina mejor estudiados. Este proteoglicano ha sido reconocido como una molécula con función proliferativa y antiproliferativa (104, 128). En el primer caso, se ha observado que su deficiencia provoca un aumento significativo en los niveles del receptor IGF-IR en comparación con los controles, originando un desbalance en el crecimiento celular (104, 127). En el segundo caso, su papel como molécula anti proliferativa se ha observado en células tumorales de próstata en las cuales induce muerte celular (104, 127-130).

En medio de estas evidencias en la que se involucran miembros de la familia de proteoglicanos SLRPs con el cáncer de próstata, y la necesidad de contar con nuevas moléculas que ayuden a mejorar el diagnóstico y pronóstico de esta enfermedad, nació nuestro interés sobre fibromodulina y nos hizo pensar en el racional de que su patrón de expresión puede ser potencialmente evaluado como nuevo biomarcador del cáncer de próstata, una enfermedad que ha sido de interés en nuestro grupo durante varios años atrás (12).

Las líneas celulares de cáncer de próstata potencialmente proporcionan un modelo valioso para el descubrimiento y evaluación de nuevos biomarcadores, y a pesar de que hay muchas líneas celulares de cáncer de próstata disponibles y generadas a partir de tumores metastásicos, las más comúnmente utilizadas incluyen LNCaP (metástasis ganglionares), PC-3 (metástasis ósea), DU145 (metástasis cerebral), VCAP (metástasis ósea) y MDA PCa 2b (metástasis ósea) (140).

La ventaja potencial para los sistemas de cultivo de células, es que proporcionan una fuente de células cancerosas que pueden propagarse de forma estable *in vitro* y pueden ser validados independientemente. Además, son más fáciles de mantener y crecer en comparación con los modelos animales, y como resultado, son menos costosos. Estos sistemas pueden ser fácilmente manipulados genéticamente, y también ser tratados en cultivo para evaluar los efectos de diversos estímulos. Por ejemplo, se han reportado estudios en los cuales la

utilización de plataformas de análisis genómicos globales como micro arreglos (microarrays) y secuenciación (RNAseq) permitieron analizar los perfiles de expresión en LNCaP (141-144), PC-3 (145-147) y PWR-1E (148) cuando éstas células estuvieron sometidas a diferentes concentraciones de andrógenos, ácido araquidónico, vitamina D, fármacos antineoplásicos entre otros (141-148).

En cuanto a los estudios de biomarcadores utilizando líneas celulares de cáncer de próstata, ha habido dos enfoques principales: el primero que se encarga de estudiar los perfiles del marcador en un número limitado de líneas celulares (149-151), y el segundo que estudia perfiles en múltiples líneas tumorigénicas e incluyen líneas celulares no malignas como control (152-154). La principal desventaja del primer enfoque es que las líneas celulares de próstata individuales podrían afectar la eficacia de los nuevos biomarcadores; ya que estos marcadores candidatos pueden no ser expresados comúnmente en otras líneas células o no tienen la capacidad de discriminar entre el cáncer y las células no malignas. En cambio, en el segundo enfoque el uso de múltiples líneas celulares con fenotipos variados de cáncer permite relacionar el perfil del marcador no solo con la cantidad de transcrito, si no con el crecimiento y la capacidad invasiva, así como también con los tipos de mutaciones en cada línea celular, lo que conlleva a un abordaje sistemático que ayuda a mejorar el potencial del marcador y de esa manera direccionar la forma más apropiada de cómo debe ser validado posteriormente en el paciente (152-154). Recientemente, Bitá NickKholgh, *et al.* (155), reportaron como un panel de biomarcadores a los que se les ha demostrado

un papel en la progresión del CaP presenta diferencias de expresión en líneas celulares de hombres caucásicos (LNCaP y DU145) respecto a líneas de población afroamericana (E006AA y MDA PCa 2b), demostrando la utilidad de las líneas celulares en el estudio de las diferencias biológicas del fenotipo maligno entre dos poblaciones diferentes (155). En otro estudio, Ian Johnson, *et al.* (153), analizaron en cuatro líneas de próstata tumorales (22RV1, CaHPV10, DU-145, LNCaP) y tres no malignas (PWR-1E, PNT1a, PNT2) el potencial de dos biomarcadores conocidos (PSA y ACMRA), así como la búsqueda de nuevos biomarcadores en una serie de proteínas lisosomales y endosomales. Estos investigadores demostraron que los biomarcadores de CaP existentes y las proteínas lisosomales no fueron capaces de diferenciar específicamente entre el panel de líneas celulares no malignas y el panel de las tumorales, sin embargo, las proteínas endosomales estudiadas mostraron cierta capacidad discriminatoria (153).

En conjunto, estos estudios proponen que el primer paso de los procesos de descubrimiento de biomarcadores *in vitro* para el cáncer de próstata debe implicar el uso de múltiples líneas celulares, con el fin de establecer una buena reproducibilidad y aumentar el potencial de discriminación. En nuestro caso, cabe resaltar, que las líneas utilizadas son los modelos más estudiados en el CaP (141-144, 156, 157), además representan estadios tempranos (LNCaP) y avanzados de la enfermedad (PC-3), lo que las hace propicias para estudiar patrones de expresión variables entre estas células, particularmente cuando los niveles de un

transcrito específico se mide con técnicas genómicas diferentes; en nuestro caso particular los datos fueron analizados por PCR cuantitativa en tiempo real. Específicamente, nuestros resultados indicaron que la línea LNCaP que posee un fenotipo pobremente metastásico, tuvo una expresión de FMOD significativamente mayor que la línea PC-3 que posee un fenotipo de alta agresividad ( $p=0.0001$ ), comparado con los niveles basales de la línea no tumorigénica.

Una desventaja importante de los sistemas de cultivo celular *in vitro* es que las condiciones técnicas del cultivo pueden alterar de forma independiente la expresión de los biomarcadores, y además, no permiten capturar todas las condiciones fisiológicas y de microambiente del tejido encontradas *in vivo* (153). Por lo que es importante tener en cuenta estas limitaciones en el análisis de biomarcadores cuando se utilizan líneas celulares. Sin embargo, para controlar estas dificultades se tienen que llevar a cabo estudios de validación y seguimiento que establezcan la validez *in vivo* del potencial biomarcador con el fin de demostrar específicamente que no se trata de artefactos del cultivo *in vitro*.

En este orden de ideas, para validar los datos encontrados en las líneas celulares, se analizó la expresión del transcrito FMOD en una variedad de muestras clínicas de cáncer de próstata y tejido benigno obtenidas comercialmente (Figura 8B). El uso de este tipo de muestras clínicas para la búsqueda de potenciales biomarcadores está suficientemente documentado (158-160), por lo que su utilización es muy valiosa a la hora de validar datos que provienen de análisis *in vitro* de líneas celulares. Por ejemplo, en los estudios de Saraon P *et al.* (158),

demonstraron que muchas de las proteínas alteradas durante la progresión del cáncer de próstata andrógeno independiente pueden ser validadas mediante este tipo de muestras clínicas; particularmente encontraron que los transcritos de enzimas de la ruta cetónica (ACAT1) estaban en exceso en cánceres de próstata de alto grado, así como altamente elevados en los cánceres metastásicos. También, recientemente, en el estudio de Thiele *et al.*, se validó la expresión elevada del gen WNT5A en un panel comercial de cDNA que contenía muestras de tejido de tumores primarios, de forma muy similar al utilizado en este estudio para fibromodulina (159). En nuestro caso, interesantemente, encontramos que la expresión del transcrito FMOD fue significativamente más alta en las muestras de cáncer en estadios tempranos que en los individuos sin evidencia de tumor; este hallazgo válido lo encontrado en las líneas celulares donde predominó la expresión de FMOD en la línea con fenotipo menos agresivo. También, encontramos que los niveles del transcrito en los cDNA controles fueron bajos, correspondiendo con lo encontrado en la línea no tumorigénica PWR-1E.

Teniendo en cuenta que los niveles de FMOD fueron mayores en tumores primarios respecto a los individuos sin evidencia de tumor, se procedió con una tercera etapa de validación. En esta ocasión la estrategia utilizada fue la de medir el transcrito directamente a partir de tejidos obtenidos de biopsias transrectales de próstata en una cohorte de pacientes con características demográficas propias de individuos nativos de la región caribe colombiana. Encontramos que los niveles de FMOD fueron significativamente mayores en los pacientes con adenocarcinomas

que en los pacientes con hiperplasia prostática benigna ( $p=0.003$ ; Mann-Whitney U-test), aun cuando la diferencia de volúmenes prostáticos entre estos dos grupos no fue significativa (ver Tabla 6 y Figura 9). Estos resultados fueron coherentes con lo encontrado en las muestras clínicas comerciales.

Este tipo de estrategia para evaluar transcritos directamente de biopsias utilizando dos o más tipos de poblaciones diferentes ha sido reportado para otros genes que previamente han sido asociados con el CaP (161, 162). El estudio del grupo de Dimitrios K, *et al.*, determinó que el transcrito KLK-5 (calicreína humana tipo 5) en biopsias de pacientes con hiperplasia prostática benigna mostró niveles de expresión más altos que los niveles en pacientes con CaP (163). Estos investigadores encontraron que los tumores en estadios tempranos tenían mayor expresión de KLK-5 que aquellos en etapas avanzadas y además, la expresión KLK-5 se correlacionaba negativamente con la puntuación de Gleason (163).

En otro estudio reciente (164), utilizando secuenciación de RNA a partir de tejidos tumorales que fueron diseccionados de piezas de prostatectomía radical congeladas, se encontró que el gen ZIC5 tiene el potencial de indicar cuando una biopsia va a ser clasificada en una puntuación de Gleason mayor a seis, indicando que la opción terapéutica en esos casos debe ser la prostatectomía (164).

Por su parte Serafin A, *et al.*, sugieren que los niveles de PAI-1 (inhibidor del activador de plasminógeno tipo-1) en biopsias de pacientes de edad avanzada, pueden ser potencialmente útiles como marcador predictivo de la enfermedad, sin embargo, faltó ser evaluado en cohortes de pacientes con diferentes grupos de edad para aclarar aún más el papel de la edad en la expresión de PAI-1. Además, sus datos sugieren que una sola biopsia de próstata de aproximadamente 5 mg puede ser suficiente para evaluar los niveles de PAI-1 (165). Un aspecto a tener en cuenta ya que en este tipo de análisis los volúmenes de tejido son muy imitados.

Por otra parte, para efectos del análisis en esta cohorte, el nivel de cada transcrito individual (FMOD y PSA) encontrado en cada biopsia se normalizó con el volumen prostático (VP) del paciente respectivo; esta normalización nos permitió encontrar las diferencias anteriormente descritas. La normalización de los niveles de FMOD con el volumen de la próstata se hizo de acuerdo al modelo que se sigue para la normalización de los niveles de PSA con el VP, parámetro que se conoce como densidad de PSA (PSAD), el cual se define como el cociente entre la concentración de PSA dividido por el volumen de la glándula prostática y se utiliza clínicamente como recurso para confirmar la necesidad de hacer o repetir una biopsia (166). Ya que los niveles séricos de PSA aumentan proporcionalmente con el volumen del epitelio prostático, el volumen total de la glándula prostática debe ser tenido en cuenta cuando se pretende entender el significado de un nivel de

PSA concreto (167, 168). Este mismo racional fue aplicado para analizar los datos de expresión del transcrito FMOD en nuestra población, y pudimos evidenciar que al ajustar con el volumen, se obtuvieron diferencias significativas entre los dos grupos evaluados (CaP vs No CaP); a pesar de que la correlación entre el volumen prostático y el nivel de FMOD no fue significativa en ningún grupo. Estos resultados nos permitieron concluir que FMOD tenía el potencial de discriminar entre HPB y etapa temprana del cáncer, a diferencia del PSA que no pudo discriminar entre estas dos condiciones.

La siguiente etapa de validación de FMOD fue a nivel de proteína mediante la inmunohistoquímica (IHQ) de tejidos embebidos en parafina de los mismos pacientes a los que le fue cuantificado el nivel del transcrito FMOD. En estas muestras de tejido prostático se demostró que la proteína fibromodulina estuvo localizada principalmente en las células epiteliales y en menor proporción en el estroma del tejido (Figura 9). Además, la expresión fue significativamente más fuerte en las células epiteliales de los acinos cancerosos que en los acinos benignos adyacentes del mismo paciente con cáncer de próstata. Del mismo modo, la expresión de fibromodulina fue significativamente más fuerte en las células epiteliales de los acinos cancerosos que en los acinos benignos de los tejidos con hiperplasia prostática benigna (Figura 10). Esta expresión intracelular muy particular de fibromodulina, es consistente con lo observado en algunos tumores de próstata, donde cambios complejos en la expresión de proteoglicanos

se ha evidenciado, particularmente con una tendencia hacia el aumento en la expresión desde el estroma tumoral hasta las células epiteliales (29). La IHQ como técnica de validación para análisis de expresión génica en células epiteliales y estromales intersticiales de cáncer de próstata, ha sido ampliamente reportada (169, 170), y además es de gran utilidad para determinar la localización del marcador estudiado dentro del tejido (171), sin embargo, presenta ciertas limitaciones debido a que se necesita de métodos invasivos para ser desarrollada. En muchos estudios, se ha observado que el nivel de expresión relativa de ciertas moléculas es más alto en pacientes con cáncer que en aquellos que presentan hiperplasia prostática. Esto ha sido atribuible al hecho de que estas dos entidades patológicas surgen en dos áreas diferentes de la glándula prostática (172). Mientras que aproximadamente el 80.0 % de los cánceres de próstata se encuentra en la zona periférica, lo que se denomina la zona de transición, la hiperplasia prostática casi siempre se produce en la región peri uretral. Esto indica como la heterogeneidad de los eventos moleculares de la próstata inducen la aparición de una u otra patología.

En conjunto, todos los resultados descritos mostraron la necesidad de continuar con la validación de la proteína fibromodulina en el suero y la orina de los pacientes de la cohorte en estudio, con el fin de determinar su utilidad como potencial biomarcador de diagnóstico temprano del CaP. El hecho de evaluar este marcador en este tipo de muestras clínicas es de mucho interés actualmente en

urología, ya que lo que se pretende es introducir nuevos biomarcadores para el CaP de una forma mínimamente invasiva y costo efectiva. Para este análisis se utilizó el único inmunoensayo enzimático disponible comercialmente (Wuhan USCN Business Co, Ltd. Houston, USA). Interesantemente encontramos que el desempeño diagnóstico de fibromodulina en sangre y orina fueron muy diferentes; mientras que en suero el mejor desempeño estuvo en la categoría C (CaP vs HPB normalizada por VP), en orina el comportamiento fue positivo para las tres categorías (Tabla 8), de manera que fibromodulina fue capaz de diferenciar entre cáncer y grupo control, así como entre el grupo de cáncer y el grupo de HPB, independientemente de que hubiese sido normalizado con el VP. Además, en orina, la categoría C fue la que mejor desempeño diagnóstico mostró (AUC= 0.76). Ahora bien, lo más significativo que se observó entre las tres categorías fue el hecho que el volumen prostático aumentó el desempeño de la prueba tanto en sangre como en orina, indicando que este parámetro influye positivamente en la sensibilidad y especificidad de la prueba (Tabla 8).

Otro aspecto que vale la pena resaltar, es que se observaron diferencias significativas entre los niveles de fibromodulina en las muestras de sangre respecto a los de orina, tanto en el grupo de pacientes con CaP y HPB, como en el grupo de individuos controles (ver Figura 16). Este hallazgo fue considerado consistente entre los grupos, ya que el análisis de todas las muestras se hizo con el mismo inmunoensayo de ELISA. Una posible explicación a estos resultados podría estar relacionado con el hecho de que hayamos encontrado niveles altos

de esta proteína en los acinos epiteliales prostáticos de los tejidos con cáncer analizados, y de esta manera pudieran estar liberando la proteína directamente al lumen de la próstata, haciendo que las concentraciones en orina aumentasen y que al momento de la micción se detecte en mayores cantidades que lo observado en sangre. Además, es posible que el núcleo proteico de fibromodulina sea filtrado rápidamente por vía renal y también este contribuyendo a aumentar sus niveles en orina. Ahora bien, se necesitan de estudios funcionales para intentar explicar estas hipótesis; de hecho, en nuestro grupo de investigación se están llevando a cabo diversos abordajes experimentales encaminados a elucidar el papel biológico de FMOD en este tipo de canceres.

En conjunto, estos resultados, indican que fibromodulina podría ser un biomarcador mínimamente invasivo y de fácil detección, sin embargo, debe ser comparado con otros biomarcadores disponibles en estudios posteriores (173, 174). Actualmente, los biomarcadores de diagnóstico y predictivos, son los que están mayormente desarrollados y su potencial está siendo aprovechado desde múltiples enfoques (175). Dentro de estos biomarcadores, encontramos un grupo que esta comercialmente disponible, tienen uso clínico y están aprobados por la agencia administradora de alimentos y fármacos de Estados Unidos (FDA); dentro de estos se encuentra el RNA no codificante PCA3 (Prostate cancer antigen 3) (176) y el índice de salud de la próstata (prueba de índice PHI) que incluye tres marcadores y se calcula como  $([-2] \text{ proPSA} / \text{fPSA}) \times \text{PSA}^{1/2}$  (177).

También están los marcadores que se encuentran disponibles como pruebas de laboratorio basados en modificaciones clínicas pero que no cuentan con aprobación de la FDA; dentro de estos se destacan con mayor grado de evidencia la prueba para detectar la fusión Tmprss2-ERG (178, 179), el ensayo múltiple Oncotype DX® (93) y la prueba ProMark que evalúa la agresividad de tumor (180).

Por último, se encuentran los nuevos biomarcadores emergentes que aún se encuentran en sus etapas iniciales, los que incluyen la detección de células tumorales circulantes (181), cuantificación de microRNAs (182, 183), vesículas extracelulares tipo exosomas (184-187) y muchos otros de los cuales un volumen considerable de reportes emergen cada día (175).

Ahora bien, independientemente del estado en que se encuentren estos biomarcadores todos apuntan a ser medidos en sangre o en orina (14, 188-190); por esta razón, en nuestro estudio fue de suma importancia poder evaluar este proteoglicano en ambos tipos de muestra para definir desde un inicio en donde la proteína fibromodulina tenía mejor desempeño diagnóstico. Por ahora, se demostró que este proteoglicano tiene un discreto desempeño diagnóstico cuando se mide en suero y aumenta cuando se mide en orina, incluso mejor que el del PSA, el principal biomarcador de diagnóstico del CaP.

Aunque fibromodulina en este primer estudio haya tenido un valor significativo para clasificar correctamente aquellos individuos con cáncer de próstata de aquellos que no lo tenían en la población analizada, hay que tener en cuenta que este tipo de investigaciones tienen limitaciones por varias razones, por ejemplo: se trató de un estudio retrospectivo, restringiendo así las mediciones en las muestras de suero y orina, las cuales fueron recogidas en su mayoría en pacientes con diagnóstico temprano. El tamaño de la población estudiada no fue lo suficientemente grande (CaP = 44; HPB = 46; controles = 40), y además se trató de una población proveniente de una única región del país con características socio-demográficas muy similares; por lo tanto, los resultados no podrían ser extrapolados a poblaciones de otros orígenes étnicos o a la población en general. Además, es posible que el desempeño de la prueba aumente o disminuya dependiendo del tipo de población donde sea utilizado (191). También, los parámetros clínicos, como el diagnóstico patológico, pueden variar entre las instituciones y/o médicos individuales, por lo tanto, los resultados con esta pequeña cohorte pueden reflejar sesgos inherentes a la adquisición de estos datos clínicos. Este tipo de limitaciones son inherentes al estudio de biomarcadores en cáncer en general, y así son reportadas por otros autores (13, 172, 192-194).

Finalmente, la validación de estos resultados requerirá estudios prospectivos que utilicen una cohorte mayor de pacientes, así como del diseño de ensayos clínicos multicéntricos para definir el valor real de FMOD como un biomarcador para el cáncer de próstata. Sabemos que este camino es largo y actualmente estamos trabajando hacia este fin.

## CONCLUSIONES.

El desarrollo exitoso de biomarcadores para una determinada enfermedad es un largo proceso, que puede iniciar con la identificación de genes candidatos asociados a los diferentes fenotipos o etapas de progresión de la enfermedad, estos genes candidatos deben ser posteriormente validados en muestras obtenidas de pacientes y clasificadas de acuerdo a los diferentes fenotipos o estadios de la enfermedad y teniendo como referencia un grupo de muestras control obtenidas de individuos con similares características demográficas pero que carezcan de antecedentes personales o familiares de la enfermedad en estudio (195). Para confirmar la utilidad real del biomarcador en el manejo de la enfermedad, este debe ser validado en ensayos clínicos controlados multicéntricos que abarquen mayor grupo de pacientes y controles (195-197).

Este es el primer estudio que evalúa la expresión génica y proteica de un miembro de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs) como potencial nuevo biomarcador de diagnóstico del cáncer de próstata, y que para nuestro conocimiento este gen no ha sido previamente relacionado con cánceres sólidos (198, 199). Se validó el perfil de expresión del transcrito FMOD en líneas celulares de cáncer de próstata epiteliales humanas con diferentes fenotipos metastásicos, demostrando que la línea LNCaP tuvo una expresión significativamente mayor que la línea PC-3 de fenotipo altamente agresivo, comparado con la línea no

tumorigénica (PWR-1E). Este hallazgo indico que la expresión de este gen estaba asociada a estadios tempranos del cáncer de próstata, lo que fue validado con los datos encontrados a través del análisis de expresión en una variedad de muestras clínicas de cáncer de próstata y tejido benigno obtenidas comercialmente. Se demostró que la expresión de FMOD fue significativamente más alta en las muestras de cáncer en estadios tempranos que en los individuos sin evidencia de tumor, concluyendo que FMOD tuvo el potencial de discriminar entre etapas tempranas del CaP y HPB. La proteína fibromodulina, se encontró mayormente expresado en epitelio que en estroma y estuvo significativamente expresado en tumores dependientes de andrógenos, tal como se encontró en la línea celular LNCaP.

No se encontró correlación significativa entre los perfiles de expresión de FMOD y la edad, así como con variables clínico-patológicas como el grado de lesión del tumor (puntuación de Gleason), estadios tumorales y volumen prostático (VP). Por lo tanto, la asociación entre el nivel de fibromodulina en suero y orina con los estadios de la enfermedad no pudieron ser evaluados, lo que indico que este proteoglicano por lo menos en la población estudiada no tuvo potencial de ser evaluado como marcador de pronóstico.

Encontramos que el desempeño diagnóstico de fibromodulina en sangre y orina fueron muy diferentes. La proteína fibromodulina medida en orina, confirma tener valor discriminatorio estadísticamente significativo entre pacientes con CaP en etapa temprana y aquellos con HPB. Esta prueba tendría el potencial de beneficiar un gran número de pacientes que con la prueba actual de PSA estarían sometidos a métodos diagnósticos invasivos como la biopsia transrectal de próstata y/o a terapias invasivas innecesarias. Sin embargo, este primer estudio debe ser validado por estudios clínicos multicéntricos que permitan evaluar la prueba en la población en general, con el fin de determinar cuál sería el porcentaje de pacientes que se beneficiarían con la prueba.

## **ANEXO 1.**

Bettin A, Reyes I and Reyes N. Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer. *Int J Biol Markers*. 2016; 31(2): e153 - e162.

## **ANEXO 2.**

Reyes, N. Benedetti I, Bettin A, Rebollo J and Geliebter J. The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue. *Cancer Biomark*, 2016.

16(1): p. 191-202.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. **Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA.** The cancer genome. *Nature*. 2009;458: p. 719-24. DOI: 10.1038/nature07943.
2. **Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S.** Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer. *Am J Pathol*. 2016;186: p. 1724-35. DOI: 10.1016/j.ajpath.2016.02.023.
3. **Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW.** Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339: p. 1546-58. DOI: 10.1126/science.1235122.
4. **Valdes-Mora F, Clark SJ.** Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies. *Oncogene*. 2015;34: p. 1609-18. DOI: 10.1038/onc.2014.111.
5. **Siegel RL, Miller KD, Jemal A.** Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin*. 2016;66: p. 7-30. DOI: 10.3322/caac.21332.
6. **Instituto de Nacional de Cancerología.** Anuario estadístico 2012. Consultado: enero de 2016. Disponible en:<http://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/ANUARIO> p.
7. **Oon SF, Pennington SR, Fitzpatrick JM, Watson RW.** Biomarker research in prostate cancer-towards utility, not futility. *Nat Rev Urol*. 2011;8: p. 131-8.
8. **Ilic D, Neuberger MM, Djulbegovic M, Dahm P.** Screening for prostate cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2013;1: p. CD004720. DOI: 10.1002/14651858.CD004720.pub3.
9. **Carroll PR, Whitson JM, Cooperberg MR.** Serum prostate-specific antigen for the early detection of prostate cancer: always, never, or only sometimes? *J Clin Oncol*. 2010;29: p. 345-7. DOI: 10.1200/JCO.2010.32.5308.
10. **Castelblanco D GJF, Trujillo Ordóñez C.** análisis retrospectivo de las biopsias de próstata realizadas en la Clínica de Próstata del Hospital universitario Fundación santa Fe de Bogotá. *urología colombiana*. 2011;XX: p. 27-33.
11. **Velonas VM, Woo HH, Remedios CG, Assinder SJ.** Current status of biomarkers for prostate cancer. *Int J Mol Sci*. 2013;14: p. 11034-60. DOI: 10.3390/ijms140611034.
12. **Reyes I, Tiwari R, Geliebter J, Reyes N.** DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines. *Biomedica*. 2007;27: p. 190-203. DOI: S0120-41572007000800006.
13. **Lucarelli G, Rutigliano M, Bettocchi C, Palazzo S, Vavallo A, Galleggiante V, et al.** Spondin-2, a secreted extracellular matrix protein, is a novel diagnostic biomarker for prostate cancer. *J Urol*. 2013;190: p. 2271-7. DOI: 10.1016/j.juro.2013.05.004.
14. **Ferro M, Buonerba C, Terracciano D, Lucarelli G, Cosimato V, Bottero D, et al.** Biomarkers in localized prostate cancer. *Future Oncol*. 2016;12: p. 399-411. DOI: 10.2217/fon.15.318.

15. **Costa-Pinheiro P, Patel HR, Henrique R, Jeronimo C.** Biomarkers and personalized risk stratification for patients with clinically localized prostate cancer. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2015;14: p. 1349-58. DOI: 10.1586/14737140.2014.952288.
16. **Chakravarti S.** Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconj J.* 2002;19: p. 287-93. DOI: 10.1023/A:1025348417078.
17. **Chen S, Oldberg A, Chakravarti S, Birk DE.** Fibromodulin regulates collagen fibrillogenesis during peripheral corneal development. *Dev Dyn.* 2010;239: p. 844-54. DOI: 10.1002/dvdy.22216.
18. **Viola M, Bartolini B, Sonaggere M, Giudici C, Tenni R, Tira ME.** Fibromodulin interactions with type I and II collagens. *Connect Tissue Res.* 2007;48: p. 141-8. DOI: 10.1080/03008200701276133.
19. **Hildebrand A, Romaris M, Rasmussen LM, Heinegard D, Twardzik DR, Border WA, et al.** Interaction of the small interstitial proteoglycans biglycan, decorin and fibromodulin with transforming growth factor beta. *Biochem J.* 1994;302 ( Pt 2): p. 527-34.
20. **Soo C, Hu FY, Zhang X, Wang Y, Beanes SR, Lorenz HP, et al.** Differential expression of fibromodulin, a transforming growth factor-beta modulator, in fetal skin development and scarless repair. *Am J Pathol.* 2000;157: p. 423-33. DOI: S0002-9440(10)64555-5.
21. **Adini I, Ghosh K, Adini A, Chi ZL, Yoshimura T, Benny O, et al.** Melanocyte-secreted fibromodulin promotes an angiogenic microenvironment. *J Clin Invest.* 2014;124: p. 425-36. DOI: 10.1172/JCI69404.
22. **Sjoberg A, Onnerfjord P, Morgelin M, Heinegard D, Blom AM.** The extracellular matrix and inflammation: fibromodulin activates the classical pathway of complement by directly binding C1q. *J Biol Chem.* 2005;280: p. 32301-8. DOI: 10.1074/jbc.M504828200.
23. **Jelinek DF, Tschumper RC, Stolovitzky GA, Iturria SJ, Tu Y, Lepre J, et al.** Identification of a global gene expression signature of B-chronic lymphocytic leukemia. *Mol Cancer Res.* 2003;1: p. 346-61.
24. **Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, Mattioli M, Cattoretti G, Husson H, et al.** Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med.* 2001;194: p. 1625-38.
25. **Mayr C, Bund D, Schlee M, Moosmann A, Kofler DM, Hallek M, et al.** Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes. *Blood.* 2005;105: p. 1566-73. DOI: 10.1182/blood-2004-04-1233.
26. **Garusi E, Rossi S, Perris R.** Antithetic roles of proteoglycans in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2011;69: p. 553-79. DOI: 10.1007/s00018-011-0816-1.
27. **Iozzo RV, Sanderson RD.** Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2011;15: p. 1013-31. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2010.01236.x.

28. **Edwards IJ.** Proteoglycans in prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2012;9: p. 196-206. DOI: 10.1038/nrurol.2012.19.
29. **Suhovskih AV, Mostovich LA, Kunin IS, Boboev MM, Nepomnyashchikh GI, Aidagulova SV, et al.** Proteoglycan expression in normal human prostate tissue and prostate cancer. *ISRN Oncol.* 2013;2013: p. 680136. DOI: 10.1155/2013/680136.
30. **Hayward SW, Cunha GR.** The prostate: development and physiology. *Radiol Clin North Am.* 2000;38: p. 1-14.
31. **Instituto Nacional de Cancerología ESE.** Guía de práctica clínica (GPC) para la detección temprana, diagnóstico, tratamiento, seguimiento y rehabilitación de pacientes con diagnóstico de cáncer de colon y recto. consultado: nero de 2016. Disponible en:[http://gpc.minsalud.gov.co/Documents/Guias-PDF-Recursos/Colon/GPC\\_Prof\\_Sal\\_Ca\\_colon.pdf](http://gpc.minsalud.gov.co/Documents/Guias-PDF-Recursos/Colon/GPC_Prof_Sal_Ca_colon.pdf): p.
32. **Maya R. Rodríguez-López, y IBB-C, Bermúdez-Velásquez. S.** Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna. *Rev Biomed.* 2007;18: p. 47-59.
33. **Collins MM, Stafford RS, O'Leary MP, Barry MJ.** How common is prostatitis? A national survey of physician visits. *J Urol.* 1998;159: p. 1224-8.
34. **Fong YK, Milani S, Djavan B.** Natural history and clinical predictors of clinical progression in benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol.* 2005;15: p. 35-8.
35. **Eaton CL.** Aetiology and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol.* 2003;13: p. 7-10. DOI: 10.1097/01.mou.0000049392.71470.38.
36. **Salinas Sanchez AS, Hernandez Millan IR, Segura Martin M, Lorenzo Romero JG, Lopez Torres Hidalgo J, Virseda Rodriguez JA.** [Impact of prostatic symptoms in patients with prostatic benign hyperplasia]. *Arch Esp Urol.* 2000;53: p. 212-24.
37. **José Luis Poveda Matiza NJAR, María Paula Sáenz Becerra y Fabián Pompilio Daza Almendrales.** Evolución de la mortalidad por cáncer de próstata en Colombia: estudio ecológico. *Revista Urología Colombiana.* 2014;23: p. 3-10.
38. **Kijvikai K.** Digital rectal examination, serum prostatic specific antigen or transrectal ultrasonography: the best tool to guide the treatment of men with benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol.* 2009;19: p. 44-8. DOI: 10.1097/MOU.0b013e32831743d0.
39. **Uribe Arcila Juan Fernando.** Cáncer de Próstata ¿Qué es el antígeno prostático específico? (La biología del PSA). *urología colombiana.* 2007;XVI: p. 37-46.
40. **Tricoli JV, Schoenfeldt M, Conley BA.** Detection of prostate cancer and predicting progression: current and future diagnostic markers. *Clin Cancer Res.* 2004;10: p. 3943-53. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-03-0200.
41. **Nogueira L, Corradi R, Eastham JA.** Other biomarkers for detecting prostate cancer. *BJU Int.* 2009;105: p. 166-9. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.09088.x.

42. **Andriole GL, Crawford ED, Grubb RL, 3rd, Buys SS, Chia D, Church TR, et al.** Mortality results from a randomized prostate-cancer screening trial. *N Engl J Med.* 2009;360: p. 1310-9. DOI: 10.1056/NEJMoa0810696.
43. **Schroder FH, Roobol MJ.** Re: Prostate cancer screening in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian cancer screening trial: update on findings from the initial four rounds of screening in a randomized trial. *BJU Int.* 2009;103: p. 143-4. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2008.08257.x.
44. **Stamey TA, Caldwell M, McNeal JE, Nolley R, Hemenez M, Downs J.** The prostate specific antigen era in the United States is over for prostate cancer: what happened in the last 20 years? *J Urol.* 2004;172: p. 1297-301. DOI: 00005392-200410000-00018.
45. **Steuber T, O'Brien MF, Lilja H.** Serum markers for prostate cancer: a rational approach to the literature. *Eur Urol.* 2008;54: p. 31-40. DOI: 10.1016/j.eururo.2008.01.034.
46. **Bickers B, Aukim-Hastie C.** New molecular biomarkers for the prognosis and management of prostate cancer--the post PSA era. *Anticancer Res.* 2009;29: p. 3289-98.
47. **Shariat SF, Semjonow A, Lilja H, Savage C, Vickers AJ, Bjartell A.** Tumor markers in prostate cancer I: blood-based markers. *Acta Oncol.* 2011;50 Suppl 1: p. 61-75. DOI: 10.3109/0284186X.2010.542174.
48. **Martinez CH, Chalasani V, Chin J.** Molecular biomarkers in prostate cancer. *Expert Opinion on Medical Diagnostics.* 2009;3: p. 345-353.
49. **Kitagawa Y, Izumi K, Sawada K, Mizokami A, Nakashima K, Koshida K, et al.** Age-specific reference range of prostate-specific antigen and prostate cancer detection in population-based screening cohort in Japan: verification of Japanese Urological Association Guideline for prostate cancer. *Int J Urol.* 2014;21: p. 1120-5. DOI: 10.1111/iju.12523.
50. **Kosaka T, Mizuno R, Shinojima T, Miyajima A, Kikuchi E, Tanaka N, et al.** The implications of prostate-specific antigen density to predict clinically significant prostate cancer in men  $\leq$  50 years. *Am J Clin Exp Urol.* 2014;2: p. 332-6.
51. **Thompson IM, Ankerst DP, Chi C, Lucia MS, Goodman PJ, Crowley JJ, et al.** Operating characteristics of prostate-specific antigen in men with an initial PSA level of 3.0 ng/ml or lower. *JAMA.* 2005;294: p. 66-70. DOI: 10.1001/jama.294.1.66.
52. **Senior K.** Age-specific PSA screening better. *Lancet Oncol.* 2007;8: p. 378.
53. **Oesterling JE.** Age-specific reference ranges for serum PSA. *N Engl J Med.* 1996;335: p. 345-6. DOI: 10.1056/NEJM199608013350511.
54. **Hofner T, Pfitzenmaier J, Alrabadi A, Pahernik S, Hadaschik B, Wagener N, et al.** PSA density lower cutoff value as a tool to exclude pathologic upstaging in initially diagnosed unilateral prostate cancer: impact on hemiablativ focal therapy. *World J Urol.* 2011;DOI: 10.1007/s00345-010-0631-6.
55. **Yousra S, Rafik E, Manel M, Kacem M.** [Contribution of PSA and its density in the diagnosis and tracking of the prostate cancer]. *Ann Biol Clin (Paris).* 2010;68: p. 585-93. DOI: 10.1684/abc.2010.0481.

56. **Liu S, Lu JJ, Fu Q, Zhang H, Gao DX, Liu Z.** Total PSA, PSA density and biopsy Gleason score in predicting the pathologic stage of prostate cancer. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2010;16: p. 415-9.
57. **Swoboda A, Luboldt HJ, Rubben H, Borgermann C.** [Free/total PSA ratio in clinical and ambulatory application. Are different cutoffs justified?]. *Urologe A.* 2009;48: p. 1002, 1004, 1006-7. DOI: 10.1007/s00120-009-2075-4.
58. **Yokomizo Y, Miyoshi Y, Nakaigawa N, Makiyama K, Ogawa T, Yao M, et al.** Free PSA/total PSA ratio increases the detection rate of prostate cancer in twelve-core biopsy. *Urol Int.* 2009;82: p. 280-5. DOI: 10.1159/000209358.
59. **Pepe P, Aragona F.** Incidence of insignificant prostate cancer using free/total PSA: results of a case-finding protocol on 14,453 patients. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2010;13: p. 316-9. DOI: 10.1038/pcan.2010.29.
60. **van der Kwast TH, Lopes C, Santonja C, Pihl CG, Neetens I, Martikainen P, et al.** Guidelines for processing and reporting of prostatic needle biopsies. *J Clin Pathol.* 2003;56: p. 336-40.
61. **Nash PA, Bruce JE, Indudhara R, Shinohara K.** Transrectal ultrasound guided prostatic nerve blockade eases systematic needle biopsy of the prostate. *J Urol.* 1996;155: p. 607-9.
62. **Epstein JI.** An update of the Gleason grading system. *J Urol.* 2010;183: p. 433-40. DOI: 10.1016/j.juro.2009.10.046.
63. **Sarkar S, Das S.** A Review of Imaging Methods for Prostate Cancer Detection. *Biomed Eng Comput Biol.* 2016;7: p. 1-15. DOI: 10.4137/BECB.S34255.
64. **Ilyin SE, Belkowski SM, Plata-Salaman CR.** Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol.* 2004;22: p. 411-6. DOI: 10.1016/j.tibtech.2004.06.005.
65. **Flaig TW, Nordeen SK, Lucia MS, Harrison GS, Glode LM.** Conference report and review: current status of biomarkers potentially associated with prostate cancer outcomes. *J Urol.* 2007;177: p. 1229-37. DOI: 10.1016/j.juro.2006.11.032.
66. **Verma M, Srivastava S.** New cancer biomarkers deriving from NCI early detection research. *Recent Results Cancer Res.* 2003;163: p. 72-84; discussion 264-6.
67. **Winget MD, Baron JA, Spitz MR, Brenner DE, Warzel D, Kincaid H, et al.** Development of common data elements: the experience of and recommendations from the early detection research network. *Int J Med Inform.* 2003;70: p. 41-8. DOI: S1386505603000054.
68. **Bensalah K, Montorsi F, Shariat SF.** Challenges of cancer biomarker profiling. *Eur Urol.* 2007;52: p. 1601-9. DOI: 10.1016/j.eururo.2007.09.036.
69. **Balistreri CR, Candore G, Lio D, Carruba G.** Prostate cancer: from the pathophysiologic implications of some genetic risk factors to translation in personalized cancer treatments. *Cancer Gene Ther.* 2014;21: p. 2-11. DOI: 10.1038/cgt.2013.77.

70. **Shariat SF, Canto EI, Kattan MW, Slawin KM.** Beyond prostate-specific antigen: new serologic biomarkers for improved diagnosis and management of prostate cancer. *Rev Urol.* 2004;6: p. 58-72.
71. **Shariat SF, Karakiewicz PI, Roehrborn CG, Kattan MW.** An updated catalog of prostate cancer predictive tools. *Cancer.* 2008;113: p. 3075-99. DOI: 10.1002/cncr.23908.
72. **Villari D, Nesi G, Della Melina A, Palli D, Ceroti M, Castigli M, et al.** Radical retropubic prostatectomy for prostate cancer with microscopic bladder neck involvement: survival and prognostic implications. *BJU Int.* 2010;105: p. 946-50. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08914.x.
73. **Stratton KL, Chang SS.** Locally advanced prostate cancer: the role of surgical management. *BJU Int.* 2009;104: p. 449-54. DOI: 10.1111/j.1464-410X.2009.08741.x.
74. **Magklara A, Scorilas A, Catalona WJ, Diamandis EP.** The combination of human glandular kallikrein and free prostate-specific antigen (PSA) enhances discrimination between prostate cancer and benign prostatic hyperplasia in patients with moderately increased total PSA. *Clin Chem.* 1999;45: p. 1960-6.
75. **Dhir R, Vietmeier B, Arlotti J, Acquafondata M, Landsittel D, Masterson R, et al.** Early identification of individuals with prostate cancer in negative biopsies. *J Urol.* 2004;171: p. 1419-23. DOI: 10.1097/01.ju.0000116545.94813.27.
76. **Duffy MJ.** Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochem Soc Trans.* 2002;30: p. 207-10. DOI: 10.1042/.
77. **Hirano D, Minei S, Sugimoto S, Yamaguchi K, Yoshikawa T, Hachiya T, et al.** Implications of circulating chromogranin A in prostate cancer. *Scand J Urol Nephrol.* 2007;41: p. 297-301. DOI: 10.1080/00365590701303934.
78. **Whitaker HC, Warren AY, Eeles R, Kote-Jarai Z, Neal DE.** The potential value of microseminoprotein-beta as a prostate cancer biomarker and therapeutic target. *Prostate.* 2010;70: p. 333-40. DOI: 10.1002/pros.21059.
79. **Mahn R, Heukamp LC, Rogenhofer S, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J.** Circulating microRNAs (miRNA) in serum of patients with prostate cancer. *Urology.* 2011;77: p. 1265 e9-16. DOI: 10.1016/j.urology.2011.01.020.
80. **Shen J, Hruby GW, McKiernan JM, Gurvich I, Lipsky MJ, Benson MC, et al.** Dysregulation of circulating microRNAs and prediction of aggressive prostate cancer. *Prostate.* 2012;72: p. 1469-77. DOI: 10.1002/pros.22499.
81. **Sreekumar A, Poisson LM, Rajendiran TM, Khan AP, Cao Q, Yu J, et al.** Metabolomic profiles delineate potential role for sarcosine in prostate cancer progression. *Nature.* 2009;457: p. 910-4. DOI: 10.1038/nature07762.
82. **Ferro M, Lucarelli G, Bruzzese D, Perdona S, Mazzarella C, Perruolo G, et al.** Improving the prediction of pathologic outcomes in patients undergoing radical prostatectomy: the value of prostate cancer antigen 3 (PCA3), prostate health index (phi) and sarcosine. *Anticancer Res.* 2015;35: p. 1017-23.

83. **Bussemakers MJ, van Bokhoven A, Verhaegh GW, Smit FP, Karthaus HF, Schalken JA, et al.** DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res.* 1999;59: p. 5975-9.
84. **Hessels D, Schalken JA.** The use of PCA3 in the diagnosis of prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2009;6: p. 255-61. DOI: nrurrol.2009.40 [pii] 10.1038/nrurrol.2009.40.
85. **Liu GX, Guo HQ, Li XG, Gan WD, Zeng LQ, Shi HL, et al.** [Detection of DD3 mRNA in the urine of prostate cancer patients and its clinical significance]. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007;13: p. 511-3.
86. **Groskopf J, Aubin SM, Deras IL, Blase A, Bodrug S, Clark C, et al.** APTIMA PCA3 molecular urine test: development of a method to aid in the diagnosis of prostate cancer. *Clin Chem.* 2006;52: p. 1089-95. DOI: 10.1373/clinchem.2005.063289.
87. **Meng FJ, Shan A, Jin L, Young CY.** The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11: p. 305-9.
88. **Hessels D, Klein Gunnewiek JM, van Oort I, Karthaus HF, van Leenders GJ, van Balken B, et al.** DD3(PCA3)-based molecular urine analysis for the diagnosis of prostate cancer. *Eur Urol.* 2003;44: p. 8-15; discussion 15-6. DOI: S030228380300201X [pii].
89. **Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun XW, et al.** Recurrent fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cancer. *Science.* 2005;310: p. 644-8. DOI: 10.1126/science.1117679.
90. **Tomlins SA, Laxman B, Dhanasekaran SM, Helgeson BE, Cao X, Morris DS, et al.** Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature.* 2007;448: p. 595-9. DOI: 10.1038/nature06024.
91. **Hessels D, Smit FP, Verhaegh GW, Witjes JA, Cornel EB, Schalken JA.** Detection of TMPRSS2-ERG fusion transcripts and prostate cancer antigen 3 in urinary sediments may improve diagnosis of prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13: p. 5103-8. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0700.
92. **Cao DL, Ye DW, Zhang HL, Zhu Y, Wang YX, Yao XD.** A multiplex model of combining gene-based, protein-based, and metabolite-based with positive and negative markers in urine for the early diagnosis of prostate cancer. *Prostate.* 2011;71: p. 700-10. DOI: 10.1002/pros.21286.
93. **Salami SS, Schmidt F, Laxman B, Regan MM, Rickman DS, Scherr D, et al.** Combining urinary detection of TMPRSS2:ERG and PCA3 with serum PSA to predict diagnosis of prostate cancer. *Urol Oncol.* 2013;31: p. 566-71. DOI: 10.1016/j.urolonc.2011.04.001.
94. **Dozmorov MG, Hurst RE, Culkin DJ, Kropp BP, Frank MB, Osban J, et al.** Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. *Prostate.* 2009;69: p. 1077-90. DOI: 10.1002/pros.20960.

95. **Horoszewicz JS, Leong SS, Chu TM, Wajsman ZL, Friedman M, Papsidero L, et al.** The LNCaP cell line--a new model for studies on human prostatic carcinoma. *Prog Clin Biol Res.* 1980;37: p. 115-32.
96. **Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al.** LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res.* 1983;43: p. 1809-18.
97. **Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW.** Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol.* 1979;17: p. 16-23.
98. **Sankpal UT, Abdelrahim M, Connelly SF, Lee CM, Madero-Visbal R, Colon J, et al.** Small molecule tolfenamic acid inhibits PC-3 cell proliferation and invasion in vitro, and tumor growth in orthotopic mouse model for prostate cancer. *Prostate.* 2012;72: p. 1648-58. DOI: 10.1002/pros.22518.
99. **Webber MM, Bello D, Kleinman HK, Wartinger DD, Williams DE, Rhim JS.** Prostate specific antigen and androgen receptor induction and characterization of an immortalized adult human prostatic epithelial cell line. *Carcinogenesis.* 1996;17: p. 1641-6.
100. **Fukuhara S, Chang I, Mitsui Y, Chiyomaru T, Yamamura S, Majid S, et al.** Functional role of DNA mismatch repair gene PMS2 in prostate cancer cells. *Oncotarget.* 2015;6: p. 16341-51. DOI: 10.18632/oncotarget.3854.
101. **Schaefer L, Schaefer RM.** Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules. *Cell Tissue Res.* 2010;339: p. 237-46. DOI: 10.1007/s00441-009-0821-y.
102. **Schaefer L, Iozzo RV.** Biological functions of the small leucine-rich proteoglycans: from genetics to signal transduction. *J Biol Chem.* 2008;283: p. 21305-9. DOI: 10.1074/jbc.R800020200.
103. **Cattaruzza S, Nicolosi PA, Perris R.** Proteoglycans in the control of tumor growth and metastasis formation. *Connect Tissue Res.* 2008;49: p. 225-9. DOI: 10.1080/03008200802143448.
104. **Iozzo RV, Schaefer L.** Proteoglycans in health and disease: novel regulatory signaling mechanisms evoked by the small leucine-rich proteoglycans. *FEBS J.* 2010;277: p. 3864-75. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07797.x.
105. **Friedl A.** Proteoglycans: master modulators of paracrine fibroblast-carcinoma cell interactions. *Semin Cell Dev Biol.* 2010;21: p. 66-71. DOI: 10.1016/j.semcdb.2009.11.013.
106. **Iozzo RV.** The biology of the small leucine-rich proteoglycans. Functional network of interactive proteins. *J Biol Chem.* 1999;274: p. 18843-6.
107. **Antonsson P, Heinegard D, Oldberg A.** Structure and deduced amino acid sequence of the human fibromodulin gene. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1174: p. 204-6. DOI: 0167-4781(93)90117-V.
108. **Kalamajski S, Oldberg A.** Fibromodulin binds collagen type I via Glu-353 and Lys-355 in leucine-rich repeat 11. *J Biol Chem.* 2007;282: p. 26740-5. DOI: 10.1074/jbc.M704026200.
109. **Onnerfjord P, Heathfield TF, Heinegard D.** Identification of tyrosine sulfation in extracellular leucine-rich repeat proteins using mass

- spectrometry. *J Biol Chem.* 2004;279: p. 26-33. DOI: 10.1074/jbc.M308689200.
110. **Arnold K, Kiefer F, Kopp J, Battey JN, Podvinec M, Westbrook JD, et al.** The Protein Model Portal. *J Struct Funct Genomics.* 2009;10: p. 1-8. DOI: 10.1007/s10969-008-9048-5.
  111. **Scott PG, McEwan PA, Dodd CM, Bergmann EM, Bishop PN, Bella J.** Crystal structure of the dimeric protein core of decorin, the archetypal small leucine-rich repeat proteoglycan. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101: p. 15633-8. DOI: 10.1073/pnas.0402976101.
  112. **Scott PG, Dodd CM, Bergmann EM, Sheehan JK, Bishop PN.** Crystal structure of the biglycan dimer and evidence that dimerization is essential for folding and stability of class I small leucine-rich repeat proteoglycans. *J Biol Chem.* 2006;281: p. 13324-32. DOI: 10.1074/jbc.M513470200.
  113. **Sztrolovics R, Chen XN, Grover J, Roughley PJ, Korenberg JR.** Localization of the human fibromodulin gene (FMOD) to chromosome 1q32 and completion of the cDNA sequence. *Genomics.* 1994;23: p. 715-7. DOI: 10.1006/geno.1994.1567.
  114. **Svensson L, Aszodi A, Reinholt FP, Fassler R, Heinegard D, Oldberg A.** Fibromodulin-null mice have abnormal collagen fibrils, tissue organization, and altered lumican deposition in tendon. *J Biol Chem.* 1999;274: p. 9636-47.
  115. **Honardoust D, Varkey M, Marcoux Y, Shankowsky HA, Tredget EE.** Reduced decorin, fibromodulin, and transforming growth factor-beta3 in deep dermis leads to hypertrophic scarring. *J Burn Care Res.* 2012;33: p. 218-27. DOI: 10.1097/BCR.0b013e3182335980.
  116. **Lee YH, Schiemann WP.** Fibromodulin suppresses nuclear factor-kappaB activity by inducing the delayed degradation of IKBA via a JNK-dependent pathway coupled to fibroblast apoptosis. *J Biol Chem.* 2011;286: p. 6414-22. DOI: 10.1074/jbc.M110.168682.
  117. **Geng Y, McQuillan D, Roughley PJ.** SLRP interaction can protect collagen fibrils from cleavage by collagenases. *Matrix Biol.* 2006;25: p. 484-91. DOI: 10.1016/j.matbio.2006.08.259.
  118. **Bevilacqua MA, Iovine B, Zambrano N, D'Ambrosio C, Scaloni A, Russo T, et al.** Fibromodulin gene transcription is induced by ultraviolet irradiation, and its regulation is impaired in senescent human fibroblasts. *J Biol Chem.* 2005;280: p. 31809-17. DOI: 10.1074/jbc.M414677200.
  119. **Iovine B, Nino M, Irace C, Bevilacqua MA, Monfrecola G.** Ultraviolet B and A irradiation induces fibromodulin expression in human fibroblasts in vitro. *Biochimie.* 2009;91: p. 364-72. DOI: 10.1016/j.biochi.2008.10.017.
  120. **Mikaelsson E, Danesh-Manesh AH, Luppert A, Jeddi-Tehrani M, Rezvany MR, Sharifian RA, et al.** Fibromodulin, an extracellular matrix protein: characterization of its unique gene and protein expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma. *Blood.* 2005;105: p. 4828-35. DOI: 10.1182/blood-2004-10-3941.
  121. **Choudhury A, Derkow K, Daneshmanesh AH, Mikaelsson E, Kiaii S, Kokhaei P, et al.** Silencing of ROR1 and FMOD with siRNA results in

- apoptosis of CLL cells. *Br J Haematol.* 2010;151: p. 327-35. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2010.08362.x.
122. **DeLong ER, DeLong DM, Clarke-Pearson DL.** Comparing the areas under two or more correlated receiver operating characteristic curves: a nonparametric approach. *Biometrics.* 1988;44: p. 837-45.
  123. **Klotz L, Emberton M.** Management of low risk prostate cancer-active surveillance and focal therapy. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014;11: p. 324-34. DOI: 10.1038/nrclinonc.2014.73.
  124. **Melichar B.** PSA, PCA3 and the philosophy of prostate cancer management. *Clin Chem Lab Med.* 2013;51: p. 707-12. DOI: 10.1515/cclm-2013-0156.
  125. **Garusi E, Rossi S, Perris R.** Antithetic roles of proteoglycans in cancer. *Cell Mol Life Sci.* 2012;69: p. 553-79. DOI: 10.1007/s00018-011-0816-1.
  126. **Munkley J, Mills IG, Elliott DJ.** The role of glycans in the development and progression of prostate cancer. *Nat Rev Urol.* 2016;DOI: 10.1038/nrurol.2016.65.
  127. **Schonherr E, Sunderkotter C, Iozzo RV, Schaefer L.** Decorin, a novel player in the insulin-like growth factor system. *J Biol Chem.* 2005;280: p. 15767-72. DOI: 10.1074/jbc.M500451200.
  128. **Schaefer L, Iozzo RV.** Small leucine-rich proteoglycans, at the crossroad of cancer growth and inflammation. *Curr Opin Genet Dev.* 2012;22: p. 56-7. DOI: 10.1016/j.gde.2011.12.002.
  129. **Hu Y, Sun H, Owens RT, Wu J, Chen YQ, Berquin IM, et al.** Decorin suppresses prostate tumor growth through inhibition of epidermal growth factor and androgen receptor pathways. *Neoplasia.* 2009;11: p. 1042-53.
  130. **Seidler DG, Goldoni S, Agnew C, Cardi C, Thakur ML, Owens RT, et al.** Decorin protein core inhibits in vivo cancer growth and metabolism by hindering epidermal growth factor receptor function and triggering apoptosis via caspase-3 activation. *J Biol Chem.* 2006;281: p. 26408-18. DOI: 10.1074/jbc.M602853200.
  131. **Datta MW, Hernandez AM, Schlicht MJ, Kahler AJ, DeGueme AM, Dhir R, et al.** Perlecan, a candidate gene for the CAPB locus, regulates prostate cancer cell growth via the Sonic Hedgehog pathway. *Mol Cancer.* 2006;5: p. 9. DOI: 10.1186/1476-4598-5-9.
  132. **Arichi N, Mitsui Y, Hiraki M, Nakamura S, Hiraoka T, Sumura M, et al.** Versican is a potential therapeutic target in docetaxel-resistant prostate cancer. *Oncoscience.* 2015;2: p. 193-204.
  133. **Sakko AJ, Ricciardelli C, Mayne K, Tilley WD, Lebaron RG, Horsfall DJ.** Versican accumulation in human prostatic fibroblast cultures is enhanced by prostate cancer cell-derived transforming growth factor beta1. *Cancer Res.* 2001;61: p. 926-30.
  134. **Ricciardelli C, Mayne K, Sykes PJ, Raymond WA, McCaul K, Marshall VR, et al.** Elevated levels of versican but not decorin predict disease progression in early-stage prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 1998;4: p. 963-71.

135. **Szarvas T, Reis H, Vom Dorp F, Tschirdewahn S, Niedworok C, Nyirady P, et al.** Soluble syndecan-1 (SDC1) serum level as an independent pre-operative predictor of cancer-specific survival in prostate cancer. *Prostate*. 2016;DOI: 10.1002/pros.23186.
136. **Fujii T, Shimada K, Tatsumi Y, Fujimoto K, Konishi N.** Syndecan-1 responsive microRNA-126 and 149 regulate cell proliferation in prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;456: p. 183-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2014.11.056.
137. **Shimada K, Anai S, Fujii T, Tanaka N, Fujimoto K, Konishi N.** Syndecan-1 (CD138) contributes to prostate cancer progression by stabilizing tumour-initiating cells. *J Pathol*. 2013;231: p. 495-504. DOI: 10.1002/path.4271.
138. **Chen D, Adenekan B, Chen L, Vaughan ED, Gerald W, Feng Z, et al.** Syndecan-1 expression in locally invasive and metastatic prostate cancer. *Urology*. 2004;63: p. 402-7. DOI: 10.1016/j.urology.2003.08.036.
139. **Mondal B, Patil V, Shwetha SD, Sravani K, Hegde AS, Arivazhagan A, et al.** Integrative functional genomic analysis identifies epigenetically regulated fibromodulin as an essential gene for glioma cell migration. *Oncogene*. 2016;DOI: 10.1038/onc.2016.176.
140. **Peehl DM.** Primary cell cultures as models of prostate cancer development. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12: p. 19-47. DOI: 10.1677/erc.1.00795.
141. **Welsbie DS, Xu J, Chen Y, Borsu L, Scher HI, Rosen N, et al.** Histone deacetylases are required for androgen receptor function in hormone-sensitive and castrate-resistant prostate cancer. *Cancer Res*. 2009;69: p. 958-66. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-2216.
142. **Wang Q, Li W, Liu XS, Carroll JS, Janne OA, Keeton EK, et al.** A hierarchical network of transcription factors governs androgen receptor-dependent prostate cancer growth. *Mol Cell*. 2007;27: p. 380-92. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.05.041.
143. **Heemers HV, Schmidt LJ, Sun Z, Regan KM, Anderson SK, Duncan K, et al.** Identification of a clinically relevant androgen-dependent gene signature in prostate cancer. *Cancer Res*. 2011;71: p. 1978-88. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2512.
144. **Vellaichamy A, Sreekumar A, Strahler JR, Rajendiran T, Yu J, Varambally S, et al.** Proteomic interrogation of androgen action in prostate cancer cells reveals roles of aminoacyl tRNA synthetases. *PLoS One*. 2009;4: p. e7075. DOI: 10.1371/journal.pone.0007075.
145. **Dubrovskaya A, Kim S, Salamone RJ, Walker JR, Maira SM, Garcia-Echeverria C, et al.** The role of PTEN/Akt/PI3K signaling in the maintenance and viability of prostate cancer stem-like cell populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106: p. 268-73. DOI: 10.1073/pnas.0810956106.
146. **Hughes-Fulford M, Li CF, Boonyaratanakornkit J, Sayyah S.** Arachidonic acid activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling and induces gene expression in prostate cancer. *Cancer Res*. 2006;66: p. 1427-33. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-0914.
147. **Drake JM, Strohschein G, Bair TB, Moreland JG, Henry MD.** ZEB1 enhances transendothelial migration and represses the epithelial phenotype

- of prostate cancer cells. *Mol Biol Cell*. 2009;20: p. 2207-17. DOI: 10.1091/mbc.E08-10-1076.
148. **Kovalenko PL, Zhang Z, Cui M, Clinton SK, Fleet JC.** 1,25 dihydroxyvitamin D-mediated orchestration of anticancer, transcript-level effects in the immortalized, non-transformed prostate epithelial cell line, RWPE1. *BMC Genomics*. 2010;11: p. 26. DOI: 10.1186/1471-2164-11-26.
149. **O'Connell K, Prencipe M, O'Neill A, Corcoran C, Rani S, Henry M, et al.** The use of LC-MS to identify differentially expressed proteins in docetaxel-resistant prostate cancer cell lines. *Proteomics*. 2012;12: p. 2115-26. DOI: 10.1002/pmic.201100489.
150. **Sardana G, Jung K, Stephan C, Diamandis EP.** Proteomic analysis of conditioned media from the PC3, LNCaP, and 22Rv1 prostate cancer cell lines: discovery and validation of candidate prostate cancer biomarkers. *J Proteome Res*. 2008;7: p. 3329-38. DOI: 10.1021/pr8003216.
151. **Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK.** Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression. *Cancers (Basel)*. 2014;6: p. 1298-327. DOI: 10.3390/cancers6031298.
152. **Webber MM, Bello D, Quader S.** Immortalized and tumorigenic adult human prostatic epithelial cell lines: characteristics and applications Part 2. Tumorigenic cell lines. *Prostate*. 1997;30: p. 58-64.
153. **Johnson IR, Parkinson-Lawrence EJ, Butler LM, Brooks DA.** Prostate cell lines as models for biomarker discovery: performance of current markers and the search for new biomarkers. *Prostate*. 2014;74: p. 547-60. DOI: 10.1002/pros.22777.
154. **Bennett NC, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC.** Expression profiles and functional associations of endogenous androgen receptor and caveolin-1 in prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2014;74: p. 478-87. DOI: 10.1002/pros.22767.
155. **NickKholgh B, Fang X, Winters SM, Raina A, Pandya KS, Gyabaah K, et al.** Cell line modeling to study biomarker panel in prostate cancer. *Prostate*. 2016;76: p. 245-58. DOI: 10.1002/pros.23116.
156. **Zhou JR, Yu L, Zerbini LF, Libermann TA, Blackburn GL.** Progression to androgen-independent LNCaP human prostate tumors: cellular and molecular alterations. *Int J Cancer*. 2004;110: p. 800-6. DOI: 10.1002/ijc.20206.
157. **Achbarou A, Kaiser S, Tremblay G, Ste-Marie LG, Brodt P, Goltzman D, et al.** Urokinase overproduction results in increased skeletal metastasis by prostate cancer cells in vivo. *Cancer Res*. 1994;54: p. 2372-7.
158. **Saraon P, Cretu D, Musrap N, Karagiannis GS, Batruch I, Drabovich AP, et al.** Quantitative proteomics reveals that enzymes of the ketogenic pathway are associated with prostate cancer progression. *Mol Cell Proteomics*. 2013;12: p. 1589-601. DOI: 10.1074/mcp.M112.023887.
159. **Thiele S, Gobel A, Rachner TD, Fuessel S, Froehner M, Muders MH, et al.** WNT5A has anti-prostate cancer effects in vitro and reduces tumor

- growth in the skeleton in vivo. *J Bone Miner Res.* 2015;30: p. 471-80. DOI: 10.1002/jbmr.2362.
160. **Jeet V, Tevz G, Lehman M, Hollier B, Nelson C.** Elevated YKL40 is associated with advanced prostate cancer (PCa) and positively regulates invasion and migration of PCa cells. *Endocr Relat Cancer.* 2014;21: p. 723-37. DOI: 10.1530/ERC-14-0267.
  161. **Lee SL, Yu D, Wang C, Saba R, Liu S, Trpkov K, et al.** ERG Expression in Prostate Needle Biopsy: Potential Diagnostic and Prognostic Implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2015;23: p. 499-505. DOI: 10.1097/PAI.000000000000119.
  162. **Andrews C, Humphrey PA.** Utility of ERG versus AMACR expression in diagnosis of minimal adenocarcinoma of the prostate in needle biopsy tissue. *Am J Surg Pathol.* 2014;38: p. 1007-12. DOI: 10.1097/PAS.0000000000000205.
  163. **Korbakis D, Gregorakis AK, Scorilas A.** Quantitative analysis of human kallikrein 5 (KLK5) expression in prostate needle biopsies: an independent cancer biomarker. *Clin Chem.* 2009;55: p. 904-13. DOI: 10.1373/clinchem.2008.103788.
  164. **Hoogland AM, Bottcher R, Verhoef E, Jenster G, van Leenders GJ.** Gene-expression analysis of gleason grade 3 tumor glands embedded in low- and high-risk prostate cancer. *Oncotarget.* 2016;DOI: 10.18632/oncotarget.9344.
  165. **Antonio Serafin LB, Pedro Fernandez, Daniel Achel & John Akudugu, .** The potential of PAI-1 expression in needle biopsies as a predictive marker for prostate cancer,. *Cogent Medicine.* 2016.;3: 1183275.: p.
  166. **Vela-Navarrete R.** [Comment to: <<Relation between prostate gland volume and some histological markers of malignancy>>]. *Actas Urol Esp.* 2012;36: p. 91-2. DOI: 10.1016/j.acuro.2011.10.006.
  167. **Babaian RJ, Miyashita H, Evans RB, Ramirez EI.** The distribution of prostate specific antigen in men without clinical or pathological evidence of prostate cancer: relationship to gland volume and age. *J Urol.* 1992;147: p. 837-40.
  168. **Benson MC, Whang IS, Pantuck A, Ring K, Kaplan SA, Olsson CA, et al.** Prostate specific antigen density: a means of distinguishing benign prostatic hypertrophy and prostate cancer. *J Urol.* 1992;147: p. 815-6.
  169. **Gregg JL, Brown KE, Mintz EM, Piontkivska H, Fraizer GC.** Analysis of gene expression in prostate cancer epithelial and interstitial stromal cells using laser capture microdissection. *BMC Cancer.* 2010;10: p. 165. DOI: 10.1186/1471-2407-10-165.
  170. **Jia Z, Wang Y, Sawyers A, Yao H, Rahmatpanah F, Xia XQ, et al.** Diagnosis of prostate cancer using differentially expressed genes in stroma. *Cancer Res.* 2011;71: p. 2476-87. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-2585.
  171. **Jhavar S, Bartlett J, Kovacs G, Corbishley C, Dearnaley D, Eeles R, et al.** Biopsy tissue microarray study of Ki-67 expression in untreated, localized prostate cancer managed by active surveillance. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2009;12: p. 143-7. DOI: 10.1038/pcan.2008.47.

172. **Xue D, Zhou CX, Shi YB, Lu H, He XZ.** MD-miniRNA could be a more accurate biomarker for prostate cancer screening compared with serum prostate-specific antigen level. *Tumour Biol.* 2015;36: p. 3541-7. DOI: 10.1007/s13277-014-2990-x.
173. **Reichard CA, Stephenson AJ, Klein EA.** Molecular markers in urologic oncology: prostate cancer. *Curr Opin Urol.* 2016;26: p. 225-30. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000273.
174. **Murphy L, Prencipe M, Gallagher WM, Watson RW.** Commercialized biomarkers: new horizons in prostate cancer diagnostics. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15: p. 491-503. DOI: 10.1586/14737159.2015.1011622.
175. **Saini S.** PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr).* 2016;39: p. 97-106. DOI: 10.1007/s13402-016-0268-6.
176. **Coelho FF, Guimaraes FL, Cabral WL, Salles PG, Mateo EC, Nogueira e Nogueira LM, et al.** Expression of PCA3 and PSA genes as a biomarker for differential diagnosis of nodular hyperplasia and prostate cancer. *Genet Mol Res.* 2015;14: p. 13519-31. DOI: 10.4238/2015.October.28.13.
177. **Lazzeri M, Haese A, Abrate A, de la Taille A, Redorta JP, McNicholas T, et al.** 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 Int.* 2013;112: p. 313-21. DOI: 10.1111/bju.12217.
178. **Stephan C, Cammann H, Jung K.** Re: Scott A. Tomlins, John R. Day, Robert J. Lonigro, et al. Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur Urol.* In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eururo.2015.04.039>. *Eur Urol.* 2015;68: p. e106-7. DOI: 10.1016/j.eururo.2015.07.028.
179. **Tomlins SA, Day JR, Lonigro RJ, Hovelson DH, Siddiqui J, Kunju LP, et al.** Urine TMPRSS2:ERG Plus PCA3 for Individualized Prostate Cancer Risk Assessment. *Eur Urol.* 2015;DOI: 10.1016/j.eururo.2015.04.039.
180. **Blume-Jensen P, Berman DM, Rimm DL, Shipitsin M, Putzi M, Nifong TP, et al.** Development and clinical validation of an in situ biopsy-based multimarker assay for risk stratification in prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 2015;21: p. 2591-600. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-2603.
181. **Kim MJ, Choi NY, Lee EK, Kang MS.** Identification of novel markers that outperform EpCAM in quantifying circulating tumor cells. *Cell Oncol (Dordr).* 2014;37: p. 235-43. DOI: 10.1007/s13402-014-0178-4.
182. **Gordanpour A, Nam RK, Sugar L, Seth A.** MicroRNAs in prostate cancer: from biomarkers to molecularly-based therapeutics. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2012;15: p. 314-9. DOI: 10.1038/pcan.2012.3.
183. **Lai NS, Wu DG, Fang XG, Lin YC, Chen SS, Li ZB, et al.** Serum microRNA-210 as a potential noninvasive biomarker for the diagnosis and prognosis of glioma. *Br J Cancer.* 2015;112: p. 1241-6. DOI: 10.1038/bjc.2015.91.
184. **Koppers-Lalic D, Hackenberg M, Menezes R, Misovic B, Wachalska M, Geldof A, et al.** Noninvasive prostate cancer detection by measuring

- miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget*. 2016;DOI: 10.18632/oncotarget.8124.
185. **Royo F, Zuniga-Garcia P, Torrano V, Loizaga A, Sanchez-Mosquera P, Ugalde-Olano A, et al.** Transcriptomic profiling of urine extracellular vesicles reveals alterations of CDH3 in prostate cancer. *Oncotarget*. 2016;7: p. 6835-46. DOI: 10.18632/oncotarget.6899.
  186. **Brett SI, Kim Y, Biggs CN, Chin JL, Leong HS.** Extracellular vesicles such as prostate cancer cell fragments as a fluid biopsy for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 2015;18: p. 213-20. DOI: 10.1038/pcan.2015.17.
  187. **Giusti I, Dolo V.** Extracellular vesicles in prostate cancer: new future clinical strategies? *Biomed Res Int.* 2014;2014: p. 561571. DOI: 10.1155/2014/561571.
  188. **Wei JT.** Urinary biomarkers for prostate cancer. *Curr Opin Urol.* 2015;25: p. 77-82. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000133.
  189. **Heger Z, Gumulec J, Ondrak A, Skoda J, Zitka Z, Cernei N, et al.** Influence of Long-Distance Bicycle Riding on Serum/Urinary Biomarkers of Prostate Cancer. *Int J Mol Sci.* 2016;17: p. DOI: 10.3390/ijms17030377.
  190. **Tosoian JJ, Ross AE, Sokoll LJ, Partin AW, Pavlovich CP.** Urinary Biomarkers for Prostate Cancer. *Urol Clin North Am.* 2016;43: p. 17-38. DOI: 10.1016/j.ucl.2015.08.003.
  191. **Nguyen HG, Welty CJ, Cooperberg MR.** Diagnostic associations of gene expression signatures in prostate cancer tissue. *Curr Opin Urol.* 2015;25: p. 65-70. DOI: 10.1097/MOU.0000000000000131.
  192. **Lin J, Huang Y, Zhang L, Tang W, Li X, Wang X, et al.** Evaluation of serum granulysin as a potential biomarker for nasopharyngeal carcinoma. *Clin Chim Acta.* 2016;454: p. 72-6. DOI: 10.1016/j.cca.2015.12.035.
  193. **Reis IM, Ramachandran K, Speer C, Gordian E, Singal R.** Serum GADD45a methylation is a useful biomarker to distinguish benign vs malignant prostate disease. *Br J Cancer.* 2015;113: p. 460-8. DOI: 10.1038/bjc.2015.240.
  194. **Dijkstra S, Birker IL, Smit FP, Leyten GH, de Reijke TM, van Oort IM, et al.** Prostate cancer biomarker profiles in urinary sediments and exosomes. *J Urol.* 2014;191: p. 1132-8. DOI: 10.1016/j.juro.2013.11.001.
  195. **Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al.** Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93: p. 1054-61.
  196. **Makarov DV, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW.** Biomarkers for prostate cancer. *Annu Rev Med.* 2009;60: p. 139-51. DOI: 10.1146/annurev.med.60.042307.110714.
  197. **Parekh DJ, Ankerst DP, Troyer D, Srivastava S, Thompson IM.** Biomarkers for prostate cancer detection. *J Urol.* 2007;178: p. 2252-9. DOI: 10.1016/j.juro.2007.08.055.
  198. **Reyes N, Benedetti I, Bettin A, Rebollo J, Geliebter J.** The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial

- cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue. *Cancer Biomark.* 2016;16: p. 191-202. DOI: 10.3233/CBM-150555.
199. **Bettin A, Reyes I, Reyes N.** Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer. *Int J Biol Markers.* 2015;0. DOI: 10.5301/jbm.5000184.