

**EVALUACIÓN INMUNOHISTOLÓGICA DE LA EXPRESIÓN DE GENES Y
microRNAs ASOCIADOS AL CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU RELACIÓN CON LA
PROGRESIÓN**

Estebana Inés Benedetti Padrón, M.D., Patóloga
Trabajo de tesis para optar el título de Doctor en Ciencias Biomédicas

Niradiz Reyes Ramos, PhD.
Grupo de Investigación Genética y Biología Molecular
Facultad de Medicina
Directora de Tesis



Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Investigaciones Inmunológicas
Campus Zaragocilla
Universidad de Cartagena
2017

Nota de aceptación

Jurado 1

Jurado 2

Jurado 3

Cartagena de Indias, 2017

A la memoria de mis padres, Manolo y Edith, quienes me motivaron hacia el saber

A mis hijos, Andrés, Laura y Juliana, a quienes he tratado de guiar en el mismo sentido

A Jesús Antonio, mi esposo, nuestro referente en el conocimiento

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Cartagena, y su Facultad de Medicina, que en su interés por mejorar la calidad académica de sus docentes me brindaron la oportunidad y las condiciones necesarias para la realización de este doctorado.

A mi tutora la doctora Niradiz Reyes, por el interés y la dedicación hacia mi aprendizaje, por todas las enseñanzas recibidas, por el trabajo compartido.

Al doctor Angelo De Marzo y su equipo en Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Johns Hopkins University, por las oportunidades brindadas, por su amable acogida y todo el apoyo recibido.

Al doctor Luis Rafael Caraballo, por ser el maestro que supo hacer crecer en mí el interés ya establecido por las ciencias biomédicas.

A los doctores Jesús Olivero y Luis Franco, miembros de mi comité tutorial por toda la colaboración y las enseñanzas recibidas.

A mis compañeros en el doctorado, Alfonso Bettín y Juan Rebollo, dos biólogos estudiosos, dedicados, y, sobre todo, buenos amigos, con quienes compartí muchas horas de estudio y quienes me enseñaron el paso a paso de los ensayos moleculares.

A mis antiguos alumnos, ahora compañeros y amigos Oscar Correa y Javier Baena, dos mentes brillantes cuya colaboración fue parte importante de este trabajo.

Al doctor César Redondo del Departamento de Patología del Hospital Universitario del Caribe, por toda la colaboración prestada.

Al doctor Edgar Cerpa, del Departamento de Radiología del Hospital Universitario del Caribe, por su invaluable ayuda.

Al personal de los laboratorios de Investigación y de Histotecnología de la facultad de Medicina, del grupo de Química ambiental y computacional, y del Instituto de Investigaciones Inmunológicas, de la Universidad de Cartagena, por su amable disposición y colaboración.

A Luis Alvis, por estar dispuesto a colaborar cada vez que fue necesario.

A mi amiga Lía Barrios por impulsarme a iniciar este camino y acompañarme durante todo el recorrido.

A Mark, Cande y Ana Coggiano, por su acogida cariñosa y su amistad incondicional.

A mis hermanas, por apoyarme y estar disponibles durante todo este proceso.

A mis hijos por todo el apoyo y comprensión recibidos, por aceptar mis ausencias y entender mis motivos

A mi esposo, por todo...

TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS.....	10
LISTA DE FIGURAS	12
ABREVIATURAS.....	16
RESUMEN	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUCCIÓN.....	20
2. MARCO TEÓRICO	23
2.1 LA GLÁNDULA PROSTÁTICA	23
2.1.1 Desarrollo embriológico	23
2.1.2 Estructura anatomo-histológica	23
2.2 ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.....	26
2.2.1 Epidemiología.....	26
2.2.2 Factores de riesgo.....	27
2.2.3 Diagnóstico.....	28
2.3 PATOGÉNESIS DEL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA	31
2.3.1 Inflamación y cáncer de próstata.....	31
2.3.2 Lesiones precursoras de CaP	34
2.3.2.1 Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN).....	35
2.3.2.2 Atrofia prostática focal	35
2.3.2.1 Atrofia inflamatoria proliferativa (PIA)	36
2.4 EXPRESIÓN GÉNICA EN EL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO: RNA MENSAJERO Y MICRORNAS.....	42
2.4.1 Estudio de la expresión génica del adenocarcinoma prostático en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina	46
2.4.2 Microdissección con captura láser (LCM) en el análisis de expresión génica del CaP.....	51
2.5 EXPRESIÓN DEL GEN CXXC5 EN CÁNCER	55
2.6 EXPRESIÓN DE FMOD EN TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y EN ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO	59
3. OBJETIVOS.....	63
3.1 OBJETIVO GENERAL	63
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	63

4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE INFLAMACIÓN, ATROFIA, ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA, Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE ALTO GRADO, EN BIOPSIAS DE PRÓSTATA CON TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y CON ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE ESTA NEOPLASIA.	64
4.1 MATERIALES Y METODOS.....	64
4.1.1 Tipo de estudio y población	64
4.1.2 Biopsias de tejido prostático	64
4.1.3 Identificación histológica.....	65
4.2 RESULTADOS.....	69
4.2.1 Inflamación crónica, intensidad, y localización, en relación con adenocarcinoma prostático.....	69
4.2.2 Atrofia focal, tipos y grados, relación con la edad y con adenocarcinoma prostático	72
4.2.3 Atrofia focal en relación con presencia de inflamación	73
4.2.4 HGPIN en relación con CaP, grado tumoral, atrofia focal e inflamación ...	73
4.2.5 Efectos de la presencia de Inflamación, PIA, y HGPIN en el riesgo de adenocarcinoma	76
4.2.6 Asociación topográfica entre PIA y HGPIN o adenocarcinoma	76
5. EVALUACIÓN POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL, DE LA EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE GENES Y SU ASOCIACIÓN CON CÁNCER DE PRÓSTATA EN BIOPSIAS DE PRÓSTATA CON TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.	78
5.1 MATERIALES Y METODOS.....	78
5.1.1 Muestras.....	78
5.1.2 Biopsias de tejido prostático	78
5.1.3 Extracción de RNA	80
5.1.4 Síntesis de cDNA	81
5.1.5 PCR cuantitativa en tiempo real	81
5.1.1 Análisis de expresión génica a nivel de transcritos del grupo de genes, en tejido prostático benigno y adenocarcinoma.....	82
5.1.2 Análisis de expresión génica a nivel de transcritos de CXXC5, en tejido prostático benigno y adenocarcinoma	84
5.2 RESULTADOS.....	85
5.2.1 Análisis de expresión a nivel de transcritos en TPB y CaP, del grupo de genes expresado diferencialmente en las líneas celulares de CaP.....	85

5.2.2	Expresión de CXXC5 a nivel de transcritos en biopsias de próstata con tejido prostático benigno y adenocarcinoma de próstata.....	86
6.	EVALUACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA, E HIBRIDACIÓN CROMOGENICA <i>IN SITU</i> , DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CXXC5 Y FMOD, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA, EN TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y CON ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.	90
6.1	MATERIALES Y METODOS.....	90
6.1.1	Muestras.....	90
6.1.2	Procedimiento de IHQ para detección de expresión de Fibromodulina	91
6.1.3	Procedimiento de IHQ para detección de expresión de CXXC5.....	92
6.1.4	Evaluación de IHQ en cortes de tejido prostático	93
6.1.5	Diseño y construcción de microarreglo de tejido prostático (TMA, Tissue Microarray)	94
6.1.6	Procesamiento del TMA para estudio de expresión in situ de mRNA de CXXC5 y FMOD por hibridación cromogénica in situ (CISH)	99
6.1.7	Evaluación de CISH de CXXC5 y FMOD en TMA de tejido prostático....	100
6.1.8	Evaluación de IHQ de CXXC5 y Fibromodulina en TMA de tejido prostático	101
6.2	RESULTADOS.....	102
6.2.1	Expresión de CXXC5 a nivel de proteína en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP.....	102
6.2.2	Expresión In Situ de RNA mensajero de CXXC5 en TMA de tejido prostático	106
6.2.3	Expresión de la proteína CXXC5 en TMA de tejido prostático	110
6.2.4	Expresión de Fibromodulina en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP, en muestras de tejido prostático	116
6.2.5	Expresión In Situ de RNA mensajero de FMOD en TMA de tejido prostático	121
6.2.6	Expresión de Fibromodulina en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP en TMA de tejido prostático	125
7.	EVALUACIÓN POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL, EN MUESTRAS DE PRÓSTATA CON TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y CON ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO, DE LA EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE MICRORNAS Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DEL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.	131
7.1	MATERIALES Y METODOS.....	131

7.1.1	Selección de microRNAs a estudiar	131
7.1.2	Muestras de tejido prostático.....	131
7.1.3	Microdissección láser para obtención de tejido prostático benigno, con PIA, HGPIN y CaP.....	132
7.1.3.1	Procedimiento de LCM	133
7.1.3.2	Obtención de RNA del tejido microdisecado	135
7.1.4	Bloques de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina	137
7.1.4.1	Obtención de tejido disecado manualmente a partir de los bloques de tejido prostático FFPE	138
7.1.4.2	Obtención de RNA de los cortes de tejido prostático FFPE	139
7.1.5	Síntesis de cDNA	140
7.1.6	PCR cuantitativa en tiempo real	141
7.1.7	Análisis de expresión de microRNAs.....	142
7.2	RESULTADOS.....	142
7.2.1	Características del RNA obtenido.....	142
7.2.1.1	RNA extraído de las muestras de tejido prostático obtenidas por LCM... ..	142
7.2.1.2	RNA extraído de las muestras de tejido prostático obtenidas por disección manual	143
7.2.3	Análisis de expresión a nivel de transcritos de los microRNAs expresados diferencialmente en las líneas celulares de CaP	150
7.2.3.1	Expresión de microRNAs a nivel de transcritos en muestras de TPB, PIA y CaP obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE	150
7.2.3.2	Expresión de microRNAs a nivel de transcritos en muestras de TPB, PIA HGPIN y CaP obtenidas por LCM	154
8.	DISCUSIÓN.....	157
8.1	ASOCIACIÓN ENTRE INFLAMACIÓN, ATROFIA, ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA (PIA), Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE ALTO GRADO (HGPIN), CON LA PRESENCIA DE ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.....	157
8.2	EXPRESIÓN DE CXXC5 EN RELACIÓN CON CÁNCER DE PRÓSTATA Y CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.....	164
8.3	EXPRESIÓN DE FMOD EN RELACIÓN CON CÁNCER DE PRÓSTATA Y CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.....	166
8.4	FIBROMODULINA EN RELACIÓN CON INFLAMACIÓN, Y PRESENCIA DE CUERPOS AMILÁCEOS EN EL TEJIDO PROSTÁTICO	170

8.5 USO DE TEJIDOS FFPE PARA ESTUDIAR EL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO	172
8.6 EXPRESIÓN DE RNU6 Y SU USO COMO GEN DE REFERENCIA EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CAP	175
8.7 USO DE CISH PARA ESTUDIAR EL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO	177
8.8 EXPRESIÓN DE LOS MICRORNAS: MIR-9 Y MIR-155, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO Y SUS POSIBLES LESIONES PRECURSORAS.....	178
9. CONCLUSIONES	184
10. PUBLICACIONES Y PONENCIAS	187
11. BIBLIOGRAFÍA.....	189
12. ANEXOS.....	210

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de los infiltrados inflamatorios prostáticos.....	67
Tabla 2.	Edad, y características histopatológicas de biopsias, en relación con presencia de adenocarcinoma.....	71
Tabla 3.	Localización de la inflamación en las biopsias de próstata.....	72
Tabla 4.	Efectos de la presencia de Inflamación, número de cilindros con inflamación moderada/severa, localización glandular de la inflamación, y HGPIN, en riesgo de cáncer de próstata.....	77
Tabla 5.	Secuencias de cebadores usados en el estudio.....	83
Tabla 6.	Perfil de expresión de transcritos de CXXC5 en biopsias de tejido prostático...88	
Tabla 7.	Número de cilindros, por tipo de tejido o lesión, representados en el TMA.....	98
Tabla 8.	Niveles de expresión inmunohistoquímica de CXXC5 en las diferentes lesiones, en tejidos FFPE de especímenes de prostatectomía.....	105
Tabla 9.	Niveles de expresión inmunohistoquímica de Fibromodulina en las diferentes lesiones, en tejidos FFPE de especímenes de prostatectomía.....	119
Tabla 10.	Muestras de tejido prostático disecadas por LCM, y RNA obtenido.....	134
Tabla 11.	Muestras de bloques de tejido prostático FFPE disecadas manualmente, y RNA obtenido.....	139
Tabla 12	Tabla de cebadores de microRNAs.....	141

Tabla 13. Características del RNA obtenido en relación con el tiempo de almacenamiento (en meses) de los bloques de tejido prostático FFPE.....	144
Tabla 14. Correlación entre tiempo de almacenamiento de los bloques, volumen de tejido estudiado, calidad del RNA, y concentración del RNA obtenido.....	145
Tabla 15. Niveles de transcritos de miR-9 en muestras de TPB y CaP obtenidas por disección manual de bloques de tejido prostático FFPE.....	152
Tabla 16. Niveles de transcritos de miR155-5p en muestras de TPB y CaP obtenidas por disección manual de bloques de tejido prostático FFPE.....	153
Tabla 17. Niveles de transcritos de miR155-5p en muestras de TPB, PIA, HGPIN y CaP obtenidas por LCM.....	155

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura histológica normal de la glándula prostática en comparación con el adenocarcinoma de próstata.....	25
Figura 2. Nuevo sistema de graduación histológica del adenocarcinoma de próstata...	32
Figura 3 Clasificación y características histológicas de los tipos de atrofia prostática focal.....	38
Figura 4. PIA como precursor de HGPIN, y de adenocarcinoma prostático.....	40
Figura 5. Biogénesis de microRNAs.....	45
Figura 6. Localización de la inflamación en relación con presencia de adenocarcinoma prostático.....	74
Figura 7. Relación entre tipo y grado de atrofia focal, e inflamación.....	75
Figura 8. Niveles de transcritos de CXXC5 en tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático.....	89
Figura 9 Tinción para p27 en tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático...	97
Figura 10 Tinción para Ki67 en tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático.	97
Figura 11, Evaluación de los cortes de tejido de los bloques de tejido prostático y diseño del TMA.....	98
Figura 12. Expresión de proteína CXXC5 en tejido prostático benigno y con adenocarcinoma prostático.....	104

Figura 13. . Expresión de proteína CXXC5 en glándulas tumorales de CaP de bajo grado, CaP de grado intermedio y CaP de alto grado	105
Figura 14. Expresión de proteína CXXC5 a través de las lesiones en tejidos de especímenes de prostatectomía.....	107
Figura 15. Expresión de mRNA de CXXC5 a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático.....	108
Figura 16. Expresión de proteína CXXC5 a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático.....	111
Figura 17. Puntajes de expresión de proteína CXXC5 a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático.....	113
Figura 18. Comparación de la expresión de mRNA y de proteína CXXC5 en tejido con adenocarcinoma prostático, y a través de la progresión del adenocarcinoma prostático.....	114
Figura 19. Expresión de Fibromodulina en glándulas prostáticas benignas en comparación con adenocarcinoma prostático.....	118
Figura 20. Expresión de Fibromodulina en adenocarcinoma prostático de bajo grado, grado intermedio y de alto grado.....	119
Figura 21. Expresión de Fibromodulina a través de las lesiones, en tejidos de especímenes de prostatectomía.....	120

Figura 22. Puntajes de expresión de mRNA de FMOD a través de las lesiones en TMA de tejido prostático.....	122
Figura 23. Expresión de mRNA de FMOD a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático.....	123
Figura 24. Puntajes de expresión de la proteína Fibromodulina a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático.....	126
Figura 25. Expresión de proteína Fibromodulina a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático.....	127
Figura 26. Comparación de expresión de mRNA de FMOD y de proteína Fibromodulina en tejido con adenocarcinoma prostático, y a través de la progresión del adenocarcinoma prostático.....	129
Figura 27. Tejido prostático benigno y con adenocarcinoma antes y después de la microdissección con captura laser.....	136
Figura 28. Asociación entre concentración y calidad del RNA obtenido.....	146
Figura 29. Asociación entre tiempo de almacenamiento del bloque de tejido, y calidad y concentración del RNA.....	147
Figura 30. Niveles de expresión de RNU6 en las diferentes lesiones en tejido prostático.....	148
Figura 31. Asociación entre tiempo de almacenamiento del bloque de tejido, calidad y concentración del RNA, con niveles de expresión de RNU6.....	149

Figura 32. Perfil de expresión de miR-9 en muestras de tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático, obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE.....152

Figura 33. Perfil de expresión de miR-155 en muestras de tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático, obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE.....153

Figura 34. Perfil de expresión de miR-155 en muestras de TPB, PIA, HGPIN y CaP, obtenidas por LCM.....156

Figura 35. Perfil de expresión de miR-155 en muestras de tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático, obtenidas por microdisección con captura láser156

ABREVIATURAS

AR: Androgen receptor / receptor de andrógenos

CaP: Cáncer de próstata

cDNA: complementary DNA / ADN complementario

CISH: Chromogenic *in situ* hybridization / hibridación cromogénica *in situ*

DNA: Desoxirribonucleic acid / ácido desoxirribonucleico

DRE: Digital rectal examination / examen digital rectal

FFPE: Formalin-Fixed Paraffin-Embedded / fijados en formol e incluidos en parafina

FMOD: símbolo del gen que codifica la proteína fibromodulina

GSTP1: Glutathion-S-transferase π 1 / glutathion-S-transferase π 1

FISH: Fluorescence *in situ* hybridization / hibridación fluorescente *in situ*

H&E: Hematoxilina y Eosina

HGPIN: High Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia / neoplasia intraepitelial prostática de alto grado

HPB: Hiperplasia prostática benigna.

IHQ: Inmunohistoquímica

LCM: Laser Capture Microdissection / microdissección con captura laser

LMA: Leucemia mieloide aguda

LNCaP: Línea celular de cáncer de próstata metastásico a ganglio linfático

miRISC: miRNA-induced silencing complex / complejo de silenciamiento inducido por microRNA

PC-3: Línea celular de cáncer de próstata altamente metastásico

PIA: Proliferative Inflammatory Atrophy / atrofia inflamatoria proliferativa

PSA: Prostatic Specific Antigen / Antígeno prostático específico.

PSAP: Prostate Specific Acid Phosphatase / fosfatasa acida prostática

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

RNA ISH: RNA *in situ* hybridization / hibridación *in situ* de RNA

RNA: Ribonucleic acid / ácido ribonucleico

mRNA: messenger RNA / ARN mensajero

RT-qPCR: Reverse transcription, quantitative, real-time, polymerase chain reaction / reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, cuantitativa, por transcripción reversa

SLRPs: Small leucine-rich repeat proteoglycan / proteoglicanos pequeños ricos en leucina

SNP: Single Nucleotide Polimorphism / polimorfismo de nucleótido único

SnoRNAs: Small nucleolar RNAs / RNAs nucleolares pequeños

TPB: Tejido prostático benigno

RESUMEN

Es limitado el conocimiento de los genes involucrados en la carcinogénesis prostática y su progresión, en la que se ha postulado la participación de la Atrofia Inflamatoria Proliferativa (PIA), junto con la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN). En este contexto, el presente estudio evaluó la asociación histológica entre la inflamación prostática, PIA, HGPIN y el adenocarcinoma de próstata (CaP). Además, se evaluó la expresión de algunos genes y microRNAs encontrados diferencialmente expresados en estudios previos: FMOD, CXXC5, miR-9 y miR-155; en muestras de tejido prostático con las diferentes lesiones postuladas como parte de la progresión del CaP; mediante PCR cuantitativa en tiempo real, hibridación cromogénica *in situ* e inmunohistoquímica. Se encontró una asociación entre la inflamación prostática crónica y el CaP, los niveles más intensos de inflamación se asociaron con mayor extensión de PIA. Fueron confirmadas las asociaciones previas entre la presencia e intensidad de inflamación, con la presencia de PIA; así como, la presencia de HGPIN con riesgo aumentado de diagnóstico de CaP. Se encontró aumento significativo de la expresión del gen CXXC5 a nivel de mRNA y de proteína en CaP en comparación al tejido prostático benigno, con aumento en su expresión a lo largo del modelo propuesto para la progresión del CaP. Del mismo modo se encontró sobreexpresión de FMOD y su producto el proteoglicano fibromodulina, a lo largo de dicho modelo. Hubo una tendencia a la sub-expresión de miR-155, y, a sobreexpresión de miR-9 en el CaP y en las lesiones asociadas a su progresión. Se requieren estudios posteriores que determinen el papel biológico y las posibles implicaciones clínicas de la expresión de los genes CXXC5 y FMOD, y de miR-155 y miR-9 en la progresión de esta neoplasia.

ABSTRACT

Although proliferative inflammatory atrophy (PIA) and high-grade intraepithelial neoplasia (HGPIN) have been described to play a role in prostatic carcinogenesis and its progression, knowledge of the genes involved in this process is still limited. For this reason, this study evaluated the histological association between prostatic inflammation, PIA, HGPIN and prostatic cancer (PCa). Expression of genes and microRNAs previously found differentially expressed: FMOD, CXXC5, miR-9 y miR-155, was also evaluated in tissue samples showing different stages in the prostatic cancer progression, by using real time qualitative polymerase chain reaction, chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry. An association between chronic prostatic inflammation and prostatic cancer, with higher levels of inflammation associated with greater extension of PIA was found. Previous associations between presence and intensity of inflammation with the presence of PIA were confirmed, as well as, the presence of HGPIN with higher risk of prostatic cancer diagnosis. The gene CXXC5 was overexpressed at mRNA and protein level in PCa when compared to benign prostate tissue, with greater expression across the subsequent stages of the proposed model for prostatic cancer progression. Likewise, FMOD gene and its product fibromodulin were also found over-expressed across the same model. There was a tendency for sub-expression of miR-155 and over-expression of miR-9 in PCa and the lesions associated to its progression. Further studies determining the biological foundation and clinical implications of the expression of CXXC5 and FMOD and of miR-155 and miR-9 in the progression of prostatic cancer are needed.

1. INTRODUCCIÓN

El adenocarcinoma de próstata (CaP) es el segundo cáncer más frecuentemente diagnosticado, y la quinta causa de muerte por cáncer, en hombres a nivel mundial (1). Sin embargo, a pesar de ser un problema importante de salud, son muchos los vacíos que existen en el conocimiento de su patogénesis.

Es bien conocida la asociación planteada entre la inflamación crónica y el desarrollo de cáncer (2-5). En la próstata se ha postulado que la inflamación conlleva al desarrollo de Atrofia Inflamatoria Proliferativa (PIA, por su sigla del inglés: Proliferative Inflammatory Atrophy), un tipo de atrofia prostática focal usualmente asociada con inflamación, descrita recientemente (6-8). En este contexto, uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar la asociación entre la inflamación prostática crónica y sus diferentes características: grado, extensión y localización, con la presencia de PIA, y CaP, en tejido prostático.

A pesar de los estudios de estas lesiones, y de las investigaciones que han reportado diversos perfiles de expresión génica en el CaP, el conocimiento de los genes involucrados en su carcinogénesis y progresión es todavía limitado (9-11). En este contexto está siendo estudiada también la relevancia que puedan tener los microRNAs, un grupo de moléculas pequeñas de RNA no codificante que modulan la expresión génica (12, 13), muchos de ellos han sido implicados en la carcinogénesis prostática con perfiles de expresión poco consistentes (12, 14, 15). Su papel en este proceso sigue siendo explorado (13, 16-18), por lo que su identificación, y el conocimiento de su

participación en estas redes moleculares reguladoras pueden llevar a aclarar los mecanismos de la progresión de esta neoplasia.

Estudios previos de nuestro grupo llevaron a identificar el perfil de expresión global asociado al fenotipo agresivo del CaP en un modelo animal *in vitro* (19). A partir de estos resultados se escogió un grupo de 20 genes para validar su expresión en tres líneas celulares prostáticas humanas, confirmándose la expresión diferencial en varios de ellos (20). Uno de los objetivos del presente estudio fue evaluar en los diferentes compartimentos celulares presentes en muestras de tejido prostático humano, un subgrupo de estos genes encontrados diferencialmente expresados en las líneas celulares prostáticas humanas. Adicionalmente se evaluó la expresión de algunos microRNAs que previamente encontramos diferencialmente expresados en tres líneas celulares prostáticas humanas, (datos en proceso de publicación).

El grupo de genes evaluados está conformado por genes que previamente mostraron expresión diferencial en LNCaP y en PC-3, en comparación con PWR-1E (20), así: FMOD, CXXC5, CD81 y KBTBD10, encontrados sobre-expresados en LNCaP y PC-3; Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (F2RL1), CD24 y Caveolin-1 (CAV-1) detectados sobre-expresados exclusivamente en PC-3; Thymosin beta 4, X-linked (TMSB4X) y Syalophorin (SPN) sub-expresados en LNCaP; y Forkhead box Q1 (FOXQ1) sub-expresado en LNCaP y PC-3.

De particular interés en este estudio fueron los genes CXXC5 y FMOD. CXXC5 codifica un factor nuclear inducible por retinoides (RINF), que juega un papel esencial en la hematopoyesis humana (21-23). En relación con su participación en la carcinogénesis prostática, en estudios previos de nuestro grupo, se encontró diferencialmente expresado

entre la línea celular prostática humana no cancerosa PWR-1E, y las líneas celulares prostáticas humanas cancerígenas LNCaP y PC3 (20). El gen FMOD codifica para la proteína fibromodulina, miembro de la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucina (SLRPs), ha sido evaluado previamente por el grupo como potencial biomarcador de diagnóstico del CaP (20, 24, 25). Su expresión diferencial en líneas celulares prostáticas indicó que estaba asociado a estadios tempranos del CaP (20). Se demostró que su expresión fue significativamente más alta en las muestras de cáncer en estadios tempranos que en los individuos sin evidencia de tumor (24). Además, la proteína fibromodulina medida en orina, confirmó tener valor discriminatorio entre pacientes con CaP en etapa temprana y aquellos con hiperplasia prostática benigna (HPB) (25).

Estos dos genes se encuentran involucrados en procesos de regulación de la transcripción y la motilidad celular, y no existe para ellos a la fecha una descripción de su expresión en relación con la secuencia de progresión planteada para el adenocarcinoma prostático. Por tanto, la evaluación de su expresión, junto con la de algunos microRNAs previamente encontrados diferencialmente expresados en líneas celulares de CaP (datos en proceso de publicación), en el contexto de las diferentes lesiones tisulares postuladas como parte de la progresión del adenocarcinoma prostático, podría llevarnos a la identificación de nuevos mecanismos involucrados en este proceso, y a mejorar nuestro entendimiento de las bases moleculares de la progresión de esta neoplasia.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 LA GLÁNDULA PROSTÁTICA

La glándula prostática humana es una glándula accesoria del sistema reproductor masculino, su función biológica es la acumulación lenta y la expulsión ocasional y rápida de pequeños volúmenes de líquido prostático (26). Su secreción incluye sustancias como las enzimas hidrolíticas antígeno específico de la próstata (PSA, del inglés: Prostatic Specific Antigen), y fosfatasa acida prostática específica (PSAP del inglés: Prostate Specific Acid Phosphatase), que facilitan la movilidad de los espermatozoides (27).

2.1.1 Desarrollo embriológico

El desarrollo de la próstata inicia con una condensación del mesénquima del seno urogenital, con proliferación de yemas epiteliales a partir de la uretra, proceso que es activado por los andrógenos de los testículos fetales (26), con interacciones epitelio-estroma en la formación y diferenciación del órgano (27). Su maduración se completa alrededor de los 20 años. En la mayoría de los hombres mayores de 50 años, se reanuda el crecimiento en el cuadro conocido clínicamente como hiperplasia prostática benigna (HPB), en el que se incrementa su espesor (26).

2.1.2 Estructura anatomo-histológica

La próstata es un órgano compuesto, formado de elementos glandulares y no glandulares estrechamente unidos dentro de una cápsula fibromuscular (26, 28). Está compuesta por cinco regiones: La zona anterior, compuesta principalmente por estroma fibromuscular, y cuatro regiones glandulares: la zona periférica, la zona central, la zona de transición y la zona periuretral. Estas zonas dan lugar a diferentes entidades

patológicas (29). Histológicamente es una glándula túbulo-alveolar compleja. El parénquima está organizado en glándulas formadas por conductos que se ramifican desde la uretra y terminan en acinos secretores (30) (Figura 1). La zona periférica corresponde al 65 a 70% del volumen de tejido glandular, es la zona más susceptible a la inflamación y el sitio más frecuente de origen del CaP. La zona central, usualmente no se asocia con inflamación o CaP (26, 27). La zona de transición es el sitio exclusivo de origen de la HPB. La zona periuretral puede desarrollar crecimiento patológico en los estadios avanzados de la HPB, principalmente de su componente estromal (26, 27).

Dentro de cada zona, los conductos y los acinos prostáticos tienen apariencia histológica, calibre y disposición similares. Los acinos usualmente contienen pliegues papilares y están sostenidos por un estroma con gran cantidad de músculo liso (26).

El epitelio que los reviste está compuesto por dos capas con tres tipos celulares. Las células lumbinales secretoras son columnares, forman una capa de células polarizadas, separadas de la membrana basal y del estroma por la capa de células basales (26). Se derivan de la diferenciación de las células basales, son las células maduras que llevan a cabo las funciones de la próstata al ser estimuladas por andrógenos, producen secreción proteica, expresan altos niveles de: PSA, receptor de andrógenos (AR), citoqueratina 8 y citoqueratina 18 (31, 32). Las células basales se localizan paralelas a la membrana basal, corresponden al compartimiento proliferativo del epitelio prostático, se dividen y dan origen a las células secretoras maduras (26). Expresan p63, Bcl-2, receptor de factor de crecimiento epidérmico, citoqueratinas de alto peso molecular y bajos niveles de: AR, citoqueratina 8 y citoqueratina 18. (31, 32). Su presencia es poco evidente en los cortes de rutina (26), sin embargo, la tinción inmunohistoquímica (IHQ) con citoqueratina

específica para células basales, o con el anticuerpo p63, permite evidenciar que están presentes. En los acinos malignos infiltrantes las tinciones con dichos marcadores son negativas debido a que las células basales están ausentes (27, 33, 34). Las células neuroendocrinas de los acinos prostáticos son escasas, expresan marcadores endocrinos como sinaptofisina y cromogranina A, y son negativas para AR (32).

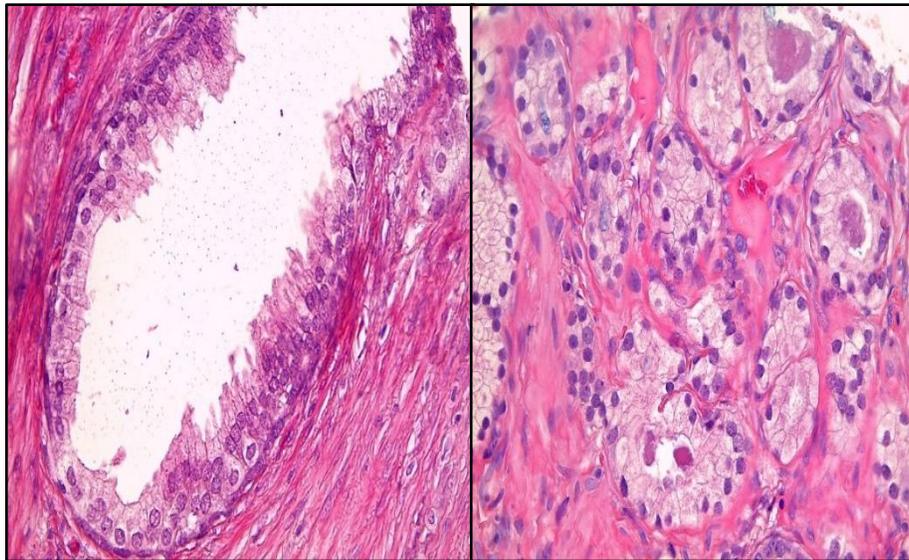


Figura 1. Estructura histológica de la glándula prostática en comparación con el adenocarcinoma de próstata. Izquierda: Acino prostático rodeado de estroma fibromuscular, morfología habitual. Derecha: Acinos tumorales formando parte de un foco de adenocarcinoma prostático. HE, 100X (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

En las luces glandulares del tejido prostático se observan con frecuencia estructuras denominadas cuerpos amiláceos. Los cuerpos amiláceos son pequeños cuerpos laminados observados en número variable, desde pocos hasta miles, en el tejido prostático del hombre adulto. Con base en resultados de varios estudios se ha planteado una potencial etiología infecciosa en su desarrollo (35, 36). Debido a su alta prevalencia en la próstata del adulto, su presencia parece indicar que la inflamación aguda posiblemente causada por infecciones bacterianas, es más común en la próstata de lo que anteriormente se consideraba (35). Se ha postulado también que los cuerpos amiláceos causan traumatismo en el epitelio glandular, o disrupción de la arquitectura epitelial con derrame de líquido prostático, con la inducción subsecuente de inflamación focal aguda y crónica (8).

2.2 ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

2.2.1 Epidemiología

El adenocarcinoma de próstata es el segundo cáncer más frecuente, y la quinta causa de muerte por cáncer, en hombres, a nivel mundial. 70% de los casos se presenta en países en vías de desarrollo (1). Según cifras de la Sociedad Americana de Cáncer, es el tumor maligno que se espera se presente con mayor frecuencia en hombres durante el año 2017(37), y la segunda causa de muerte por cáncer en hombres en el 2016, en los Estados Unidos (38). En Colombia, de acuerdo con el Instituto Nacional de Cancerología, ocupó el primer lugar en las cifras de incidencia de cáncer en hombres durante los años 2010 y 2012, alcanzando 6521 casos por año (30/100.000 habitantes), y es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres mayores de 65 años (39, 40).

2.2.2 Factores de riesgo

Edad avanzada: Es el factor de riesgo aislado más significativo, cerca de dos tercios de los casos de CaP son diagnosticados en mayores de 60 años y es muy raro antes de los 40 años (41). Se ha postulado que esta asociación no es simplemente producto del envejecimiento, sino probablemente el resultado de la interacción de muchos factores ambientales, fisiológicos, moleculares y hereditarios cuyos efectos son exacerbados por dicho envejecimiento (7, 32, 42).

Raza: El riesgo de CaP es mayor en la raza negra, es dos veces más alto en afroamericanos que en hombres blancos. Esto puede estar asociado a factores ambientales como la dieta y el nivel socioeconómico (43), o a factores genéticos (44)

Historia familiar: El riesgo para los familiares en primer grado de consanguinidad de hombres con CaP es dos veces mayor que el de la población general, y cuatro veces más alto para los familiares en primer grado de hombres con CaP diagnosticado antes de los 60 años. Esto, sumado al riesgo aumentado en gemelos homocigotos en comparación con los dicigotos, soporta la importancia de los factores genéticos en la variación del riesgo a nivel poblacional (45). Se han reportado 77 polimorfismos de nucleótido único, (SNP, del inglés: Single Nucleotide Polimorphism), asociados con CaP, muchos en regiones no codificantes, siendo la región 8q24, vecina al oncogén *c-MYC*, la primera identificada con expresión alterada en CaP (46).

Factores ambientales: La influencia de los factores ambientales ha sido demostrada por diversos estudios que muestran tasas de incidencia y mortalidad por CaP mucho más bajas en poblaciones del este y sudeste asiático, comparadas con las de países occidentales (8), y por el aumento rápido en las cifras de incidencia en estas poblaciones

tras su migración a occidente (32), con mayor riesgo de CaP en las generaciones posteriores a dicha migración (47). Han sido documentados como factores de riesgo importantes la influencia de la obesidad y la dieta (48), con un efecto promotor de algunos componentes de los alimentos, y otros con un efecto antioxidante, como la vitamina E, el licopeno y otros carotenoides, lo que apoya la hipótesis del papel importante que el estrés oxidativo asociado a la inflamación podría jugar dentro de la carcinogénesis prostática (11, 47, 49).

2.2.3 Diagnóstico

La mayoría de los adenocarcinomas se desarrollan en la zona periférica de la glándula, un número mucho menor en la zona de transición y casi ninguno en la zona central. La razón de esta predilección zonal sigue siendo un asunto no resuelto, junto con la alta selectividad de esta neoplasia por este órgano, comparado con los otros órganos del sistema genitourinario masculino (42). El CaP se sospecha tras la detección de un nivel sérico elevado de PSA y/o un examen digital rectal (EDR) anormal. El hallazgo de un nódulo anormal en la próstata durante el EDR, indica la realización de biopsia transrectal guiada por ultrasonido, para el diagnóstico definitivo (50, 51). La indicación más aceptada para la toma de biopsia transrectal de próstata es un valor sérico de PSA por encima de 4.0 ng/ml (52-54).

2.2.3.1 Histopatología

El CaP se origina del epitelio de los acinos prostáticos (55, 56), sus células, a pesar de poseer características fenotípicas de células lumbinales, también presentan el patrón de proliferación celular de las células basales (57). El diagnóstico de CaP se establece con el estudio histopatológico de las biopsias transrectales (58), con base en criterios

histológicos mayores que incluyen: patrón de crecimiento infiltrativo, glándulas pequeñas malignas extendiéndose entre otras grandes y complejas, ausencia de células basales y atipia nuclear con nucléolos agrandados; y criterios menores: mucina intraluminal basófila, secreción amorfa eosinófila, figuras de mitosis, cristaloides intraluminales, áreas de HGPIN adyacentes, citoplasma anfófilico e hiperchromasia nuclear (30, 59).

2.2.3.2 Grado histológico

El grado histológico de una neoplasia corresponde al grado de diferenciación de las células tumorales y está directamente relacionado con su potencial de malignidad. En el CaP, la evaluación del grado histológico se hace a través del sistema de graduación de Gleason (58, 60). Este sistema, en su diseño inicial, se basa en el patrón histológico de diferenciación y disposición de las células tumorales en cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E), se fundamenta en su patrón arquitectural. Se usan cinco patrones básicos (numerados de 1 a 5). Más de un patrón puede estar presente, se denomina primario al predominante, el que le sigue se denomina secundario, y se genera una suma histológica que puede oscilar entre 2 y 10 (61, 62) (Figura 2). Numerosos estudios han confirmado su importancia como indicador de pronóstico del CaP, además ha sido correlacionado con falla bioquímica, desarrollo de metástasis, y supervivencia (63).

Sin embargo, el sistema de Gleason no puede predecir en forma exacta la agresividad del CaP, pues tumores con patrones histológicos similares pueden tener diferente evolución clínica (32), por lo cual se le realizaron algunas modificaciones (64). Recientemente, se propuso un nuevo sistema de graduación basado en cambios mayores al sistema original (65). Este nuevo sistema refleja mejor la biología del CaP. Ofrece una estratificación más exacta de los tumores, ha demostrado ser más preciso

en la predicción de la progresión, y puede ser usado en combinación con su equivalente en la escala de Gleason (Figura 2)(66).

2.2.3.3 Uso de inmunohistoquímica en el diagnóstico del CaP

La IHQ juega un papel fundamental en el diagnóstico de CaP, sea en la confirmación del diagnóstico de CaP, o, de un tumor metastásico (34, 67). Se usa en la identificación de las células basales, que están ausentes en el CaP, por tinción con los anticuerpos para células basales: p63, y 34BE12 (Anticuerpo contra citoqueratina de alto peso molecular) (67). Aunque se han reportado casos raros de CaP con tinción positiva para 34BE12, y para p63, pero en una distribución no-basal (30, 68). Otro marcador ampliamente usado en la IHQ del CaP es el anticuerpo P504S, que detecta la proteína alfa-metilacil-CoA-racemasa (AMACR, del inglés: α -Methylacyl-CoA-racemase), presente en la mayoría de estos tumores. La combinación de estos marcadores permite confirmar o descartar el diagnóstico de CaP (30, 34, 68).

2.2.3.1 Antígeno Prostático Específico (PSA)

El PSA es una serina proteasa de 240 aminoácidos, producida por las células epiteliales de la próstata, que está presente en la secreción prostática normal, y se eleva en el CaP. El valor sérico normal de PSA aceptado generalmente es de 4,0 ng/ml o menos (69). Una concentración sérica elevada de PSA puede obedecer a diversos factores, entre ellos, CaP, eyaculación, inflamación e infección prostática, hiperplasia prostática, o instrumentación urológica reciente (70). El nivel sérico de PSA ha sido usado como prueba de tamización para CaP durante mucho tiempo, y se considera la causa de la disminución en la mortalidad por esta neoplasia en USA. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que un 20% de los hombres con PSA por debajo de 4 ng/ml tienen CaP,

y muchos hombres con niveles más altos de PSA no lo tienen (52). Actualmente la mayoría de los expertos están de acuerdo en que el índice de Gleason y el estadio patológico son los más fuertes determinantes del comportamiento biológico del CaP (71).

2.3 PATOGÉNESIS DEL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA

2.3.1 Inflamación y cáncer de próstata

En la patogénesis de muchos tumores malignos en humanos son componentes importantes los procesos inflamatorios causados por patógenos o por agentes químicos o físicos, se considera que el daño persistente al tejido y la proliferación celular en un microambiente rico en especies altamente reactivas de oxígeno y nitrógeno contribuye al desarrollo y la progresión del cáncer (2, 3). Uno de los factores ambientales más estudiados recientemente en la patogénesis del CaP es el desarrollo de inflamación crónica en la próstata (8), su papel ha sido sugerido desde tiempo atrás teniendo como evidencia la infiltración de la glándula por células inflamatorias en pacientes con cáncer (72). Se ha documentado que la inflamación en la próstata es frecuente en la zona periférica, al igual que el CaP. El desarrollo de inflamación en la próstata ha sido asociado a factores hormonales, dietéticos, mecanismos potencialmente desencadenantes como sustancias químicas o agentes físicos intraluminales, y procesos infecciosos como las infecciones de transmisión sexual (ITS), y las infecciones del tracto urinario (8, 73).

La causa de la inflamación prostática crónica y su papel potencial en la carcinogénesis sigue siendo objeto de estudio, con evidencias cada vez más fuertes en favor de su posible implicación en el desarrollo del CaP (8, 42, 47, 74, 75).

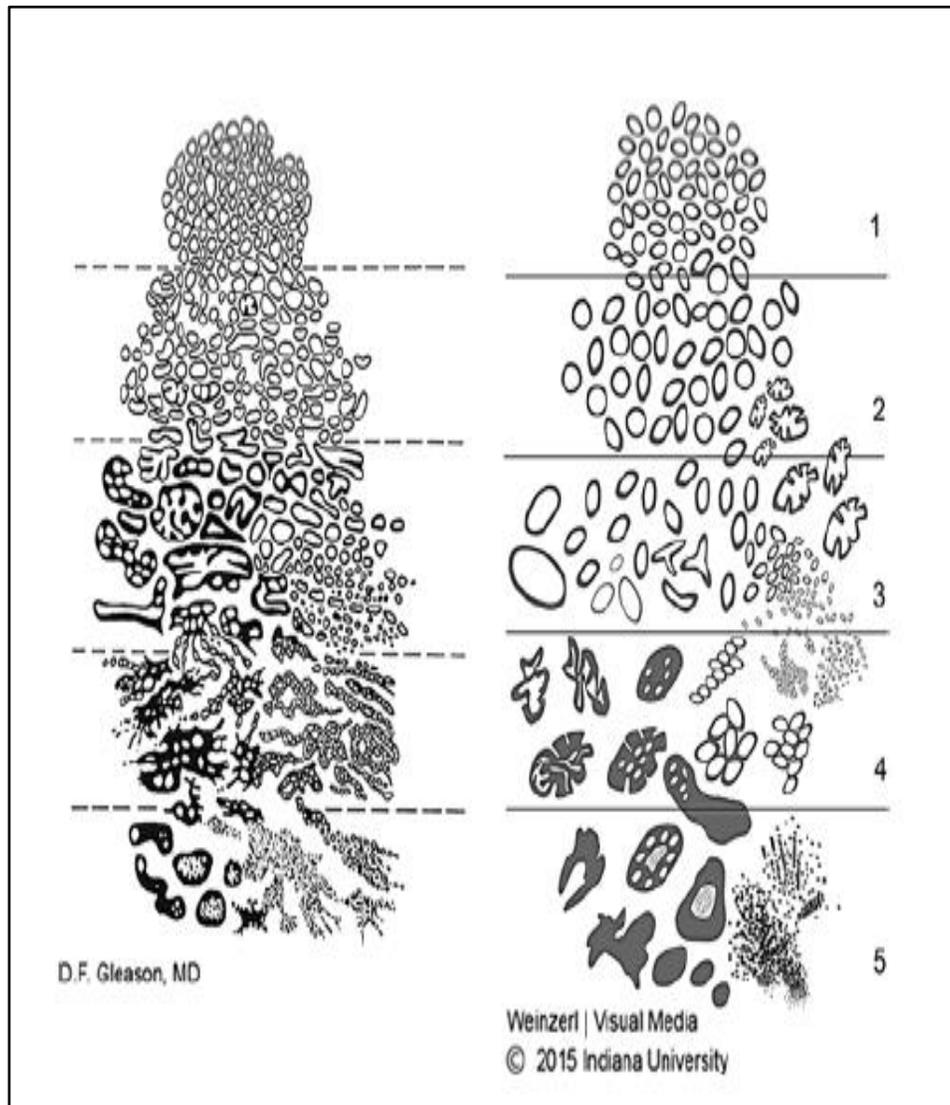


Figura 2. Sistema de Gleason, y, nuevo sistema de graduación histológica del adenocarcinoma de próstata. Patrones histológicos del sistema de Gleason original (Izquierda), diagrama de los patrones del nuevo sistema de graduación (derecha): Grupo grado 1 (Gleason 6), Grupo grado 2 (Gleason 7 = 3+4), Grupo grado 3 (Gleason 7 = 4+3), Grupo grado 4 (Gleason 8), Grupo grado 5 (Gleason 9, 10). Tomado de: Epstein JI, Egevad L, Amin M, Delahunt B, Srigley J, and Humphrey PA. *The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma* Am J Surg Pathol Volume 40, Number 2, February 2016.

En la búsqueda de la etiología de las infecciones prostáticas se han detectado diversos microorganismos como virus, bacterias y protozoarios, siendo algunas bacterias no relacionadas con ITS, como *Escherichia coli* y *Enterococcus spp*, los microorganismos más comúnmente implicados en la etiología infecciosa de la inflamación crónica de la próstata. Aunque varios microorganismos asociados con ITS también han sido implicados tales como: *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria Gonorrhoea*, *Trichomona vaginalis*, *Treponema pallidum* y *Mycoplasma spp*. (8).

Durante mucho tiempo, se ha intentado identificar agentes infecciosos en la próstata de pacientes con CaP, como parte del estudio de la asociación planteada entre la etiología infecciosa de la prostatitis y esta neoplasia. Hasta la fecha no existe evidencia de que un único microorganismo sea el estímulo reconocido para la inflamación asintomática observada en estos pacientes, o que contribuya directamente a la carcinogénesis prostática, a pesar de numerosos reportes sobre la presencia de especies bacterianas, parasitarias o virales en la próstata de estos pacientes. De modo que no existe un consenso en relación con la contribución de los agentes infecciosos a la carcinogénesis prostática (35).

Se han llevado a cabo muchos trabajos, pero, el estudio de la inflamación prostática clínica no ha sido fácil (76). La prostatitis es una entidad heterogénea, que de acuerdo al consenso del Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos, se clasifica en cuatro categorías, las tres primeras son sintomáticas: (I) prostatitis bacteriana aguda I; (II) prostatitis bacteriana crónica; (III) prostatitis crónica/CPPS; y la última es la (IV) prostatitis inflamatoria asintomática (77). El término histológico prostatitis implica presencia de infiltración patológica de la próstata por células inflamatorias. Los patólogos usualmente

han prestado poca atención a la inflamación prostática a menos que sea florida, la principal razón es que su significado clínico no se ha definido. Para los patólogos, la 'prostatitis' se define como aumento de células inflamatorias dentro del parénquima prostático (75).

La influencia de la inflamación prostática en la iniciación y/o progresión del CaP es difícil de analizar debido a que pocos casos de inflamación prostática generan sintomatología. También debido a la alta prevalencia de inflamación prostática asintomática, evidenciada en los estudios histológicos de especímenes de biopsias prostáticas de pacientes con niveles elevados de PSA, prostatectomías radicales, o resecciones transuretrales de próstata, de pacientes con CaP o con HPB, o incluso en especímenes de autopsia (42, 78-80). Los estudios que han intentado establecer una asociación entre la prostatitis y el riesgo de CaP han mostrado resultados contradictorios, por lo que esta asociación sigue siendo motivo de investigación (8).

2.3.2 Lesiones precursoras de CaP

La carcinogénesis es un proceso complejo que involucra muchos cambios, en el caso del CaP describe el cambio de glándulas benignas hasta carcinoma invasor, pasando por lesiones premalignas. Para que una lesión de la próstata sea considerada como premaligna debe cumplir una serie de condiciones: debe existir una relación epidemiológica, la lesión precursora debe estar presente en edades más tempranas que el cáncer y con características morfológicas similares, debe localizarse cercana a su presunto equivalente maligno, y, la prueba definitiva es la evidencia clínica de progresión a enfermedad invasiva (81).

2.3.2.1 Neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN)

Actualmente, HGPIN es considerada la lesión precursora de CaP de acuerdo con las evidencias disponibles (82, 83), fundamentadas en varios aspectos: mayor frecuencia de HGPIN en próstatas con CaP, asociación topográfica y transición frecuente entre HGPIN y focos de CaP, semejanza citológica y alteraciones moleculares compartidas entre HGPIN y CaP(84). HGPIN representa el estadio final pre-invasivo de una cadena de proliferaciones celulares a nivel del epitelio de los acinos y conductos prostáticos (83). Su importancia radica en que un diagnóstico de HGPIN se asocia con un riesgo aumentado de CaP en una biopsia posterior, que actualmente se describe en un 24%, siendo mayor que el observado en los casos con biopsias iniciales con diagnóstico benigno (82).

2.3.2.2 Atrofia prostática focal

Es controvertido el planteamiento de si el epitelio prostático directamente origina HGPIN o hay otra lesión intermedia involucrada, o, si HGPIN da origen directamente a CaP, o igualmente hay otro intermediario. Se ha postulado que ambos podrían originarse de otras lesiones, entre las que se ha propuesto la atrofia focal (85, 86), debido a su presencia frecuente en la cercanía de lesiones cancerosas y su localización habitual en la zona periférica de la glándula (87-89). La atrofia prostática puede dividirse en: atrofia difusa, producto de disminución o bloqueo de los niveles de andrógenos, y, atrofia focal, que se presenta como focos de glándulas atróficas rodeadas por glándulas de apariencia habitual (6, 90-92).

Microscópicamente, la atrofia prostática focal es reconocida como focos de glándulas de aspecto hipercromático, debido al escaso citoplasma de las células lumbinales, en las que

puede ser difícil discriminar las células basales (93). Se habían descrito muchos patrones morfológicos de atrofia prostática focal (87, 92, 94), hasta que se estableció una terminología estandarizada, que la clasificó en cuatro patrones morfológicos: Atrofia simple, hiperplasia post-atrónica, atrofia simple con formación de quistes y atrofia parcial (95). En la atrofia simple las glándulas presentan un patrón arquitectural normal sin incremento en su número. En la hiperplasia post-atrónica las glándulas son más pequeñas, están apiñadas y aumentadas en número, lo que le da un aspecto “Hiperplásico”. En ambos tipos, en la mayoría de los casos, se observa algún infiltrado inflamatorio crónico asociado, aunque también puede encontrarse infiltrado inflamatorio agudo (Figura 3) (91, 94).

2.3.2.1 Atrofia inflamatoria proliferativa (PIA)

Los estudios morfológicos, inmunohistoquímicos, moleculares y genéticos de algunos tipos de atrofia focal aportan evidencias en favor de su participación en la carcinogénesis prostática (6, 89, 90, 96), planteando que no es una lesión involutiva sino regenerativa en respuesta a eventos que lleven a pérdida celular (6, 31).

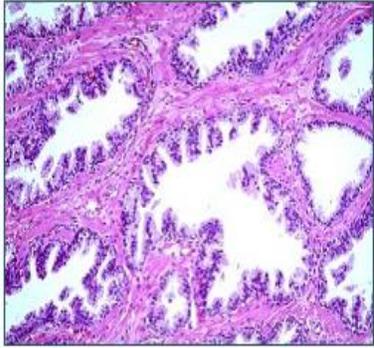
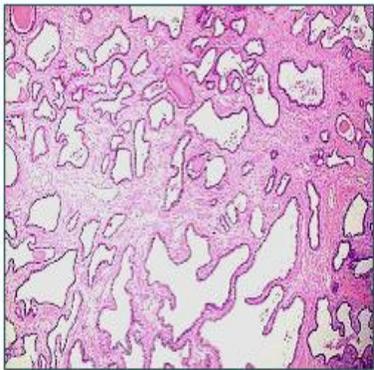
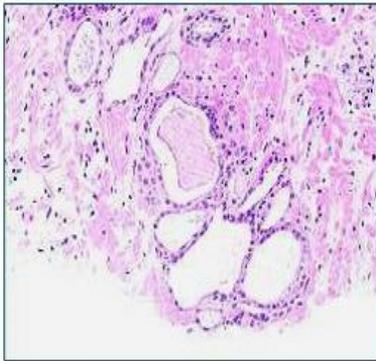
Como resultado de la caracterización IHQ y morfológica de la atrofia focal prostática, De Marzo propuso el término “Atrofia inflamatoria proliferativa” (PIA), en razón de su frecuente asociación con inflamación y su alto índice proliferativo; describiéndola como focos de atrofia focal asociados con inflamación en el componente epitelial y estromal, planteando que esta lesión se produce dentro del ambiente de estrés oxidativo generado por la inflamación (6). De Marzo postuló que PIA podría representar una lesión precursora de HGPIN y por tanto de CaP (Figura 4) (6, 97), Esto se fundamenta en las siguientes evidencias: 1) PIA se asocia frecuentemente con inflamación aguda y crónica,

2) Es altamente proliferativa comparada con el epitelio normal, 3) Al igual que HGPIN y CaP se presenta con mayor frecuencia en la zona periférica de la glándula, 4) La inflamación es casi inexistente en las vesículas seminales, con riesgo muchísimo menor de desarrollar cáncer que la próstata, 5) Al igual que HGPIN, PIA contiene muchas células proliferantes en el estrato luminal, 6) Muchas células lumbales en PIA tienen expresión disminuida del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27^{kip1} implicado en la iniciación y progresión del CaP, 7) PIA contiene muchas células con fenotipo de “células intermedias” propuestas como blanco de la carcinogénesis prostática, 8) PIA contiene muy pocas células apoptóticas, con alta expresión de Bcl2 en la capa luminal, 9) PIA presenta expresión aumentada de la enzima GSTP1, consistente con respuesta a un estrés oxidativo aumentado, y 10) PIA con frecuencia presenta transición morfológica con focos de CaP (86).

Caracterización morfológica de PIA: En PIA el epitelio no forma proyecciones papilares abundantes y las células lumbales tienen escaso citoplasma; además el estroma periglandular usualmente presenta un infiltrado inflamatorio mononuclear que también puede encontrarse dentro del epitelio y las luces glandulares (31).

Su actividad proliferativa aumentada ha sido documentada, por mayor índice de tinción con el marcador de proliferación celular Ki-67 en células basales y lumbales, lo cual puede ser una respuesta a la liberación local de factores de crecimiento por daño y pérdida de células epiteliales (6, 94, 96), y sub-regulación del inhibidor de quinasa dependiente de ciclina p27^{kip1} en las células lumbales, igual que en HGPIN y CaP (6, 98, 99).

	NORMAL	ATROFIA SIMPLE	HIPERPLASIA POSTATRÓFICA	ATROFIA SIMPLE CON FORMACIÓN DE QUISTES	ATROFIA PARCIAL
CITOPLASMA	Abundante, claro	Escaso, oscuro	Escaso, oscuro	Escaso, claro	Más que en otras atrofias, claro
PAPILAS	Abundantes	Ninguna, algunas ondulaciones	Ninguna, pocas ondulaciones	Ninguna	Ninguna, ondulaciones sutiles
TAMANO Y FORMA GLANDULAR	Medianas a grandes Túbulo-alveolares compuestas, espaciadas	Similares a normales, menos complejas	Pequeñas redondeadas, cercanas	Medianas a grandes redondeadas, cercanas	Pequeñas a medianas forma variable
INFLAMACION	Ausente	Usualmente presente	Usualmente presente	Usualmente ausente	Usualmente ausente
FIBROSIS ESTROMAL	Ausente	Variable	Variable	No	No
CONSIDERADA PIA	No	Sí	Sí	No	No

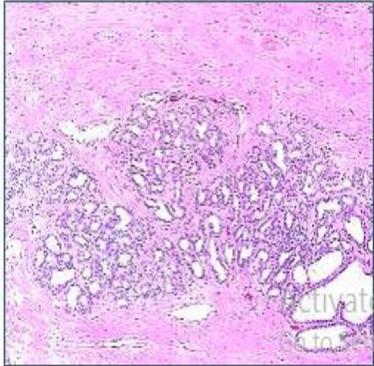


Figura 3 Clasificación y características histológicas de los tipos de atrofia prostática focal. Tomado de: *A Working Group Classification of Focal Prostate Atrophy Lesions, Am J Surg Pathol. Volume 30, Number 10, October 2006.*

Varios estudios morfológicos han encontrado evidencia de transición directa entre PIA y HGPIN, y, con menos frecuencia entre PIA y CaP, en ambos casos adyacentes a zonas de inflamación crónica (88, 100). PIA es significativamente más frecuente en los casos de CaP que en los casos de HPB (101). Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los cortes de tejido con HPB suelen corresponder a la zona transicional de la próstata, por lo que este hallazgo podría ser reflejo de diferentes prevalencias de atrofia en diversas zonas de la glándula (101-103).

Alteraciones cromosómicas en PIA: Varios estudios han demostrado que las células de PIA pueden contener aberraciones cromosómicas similares a las descritas en las células de HGPIN y CaP (98). Las células de PIA presentan aumento de señales centroméricas del cromosoma 8 (89, 104), pérdida de 8p (104, 105), y ganancia de 8q24, igual a lo observado en HGPIN y CaP (98, 104). También se ha descrito aumento en el porcentaje de núcleos con trisomía para 8c en PIA, HGPIN y CaP en comparación con el tejido prostático benigno (11, 89), lo cual puede ser reflejo de la actividad proliferativa aumentada en estas lesiones (106). La ganancia de 8q24 conlleva amplificación del oncogén C-MYC (49) cuya activación es una alteración somática temprana en la carcinogénesis prostática (46, 49, 107). Otro gen sobre-expresado en PIA es el supresor de tumor p53 (96, 108).

Caracterización molecular de PIA: Muchas vías moleculares involucradas en el CaP también están alteradas en PIA. El gen NKX3.1, que participa en la disminución del daño oxidativo del genoma se ha encontrado sub-expresado en HGPIN y PIA (49, 67, 74, 106). En PIA hay sobre-expresión de la proteína supresora de apoptosis Bcl-2, en las células luminales, a diferencia del epitelio normal, en el que se observa aumentada solamente

en las células basales (6, 109, 110). Otros productos de genes que se encuentran aumentados en PIA son los inducidos en respuesta al estrés oxidativo, o por señales asociadas con activación y proliferación celular, incluyendo GSTP1, GSTA1, COX2 y p16 (6, 111).

El gen GSTP1, codifica glutatión-S-transferasa π , una enzima inducible importante en la detoxificación intracelular de productos del estrés oxidativo (49, 111), se expresa en las células basales y está ausente en la mayoría de las células luminales (6, 96, 100). En PIA, presenta niveles elevados en muchas de las células luminales (6, 96, 100, 112). Esto hace que las células que no lo expresan estén propensas a desarrollar alteraciones genéticas y transformación neoplásica (6, 31). La razón de esta negatividad en algunas células de PIA podría ser hipermetilación del promotor de GSTP1, similar al 70% de los casos de HGPIN y a más del 90% de los casos de CaP (6, 100, 113), siendo este el gen afectado por hipermetilación más estudiado dentro de la carcinogénesis prostática (48, 114).

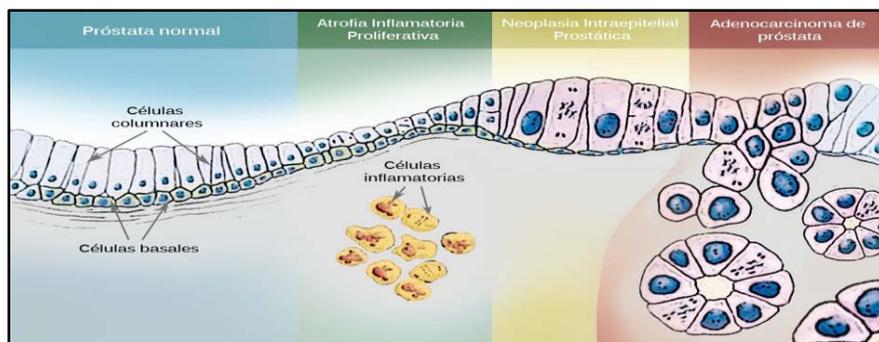


Figura 4. PIA como precursor de HGPIN y CaP. Modelo propuesto en el que PIA podría representar una lesión precursora de HGPIN y por tanto de CaP. Tomado de: *Atrofia inflamatoria proliferativa: potencial lesión precursora de adenocarcinoma prostático. Revista Ciencias Biomédicas. 2013; 5(1):88-99.*

Hay marcado incremento de la expresión de GSTA1 en PIA, confinada casi exclusivamente a las células epiteliales lumbinales, (111). COX2, igualmente se ha encontrado sobre-regulada en PIA (8, 115), sin embargo, los estudios de la expresión de COX2 en tejido prostático benigno y maligno han sido contradictorios (109, 116-118). La expresión aumentada de COX2 en PIA, se acompaña de sub-regulación del AR, probablemente resultado de la producción de citoquinas en el microambiente inflamatorio (110). Se ha propuesto que esta disminución (6), se origine en la metilación de su promotor (110, 119, 120).

Por su parte, p16/CDKN2, un inhibidor de quinasas dependientes de ciclinas (CDK), (121), se ha descrito sobre-expresado en las glándulas atróficas, al igual que en HGPIN y CaP. Es posible que el incremento de la proteína p16 en PIA represente una respuesta celular dirigida a mantener la homeostasis en respuesta a señales proliferativas y al estrés oxidativo (98, 122).

Evidencias en contra de PIA como lesión precursora de HGPIN y/o CaP: Existe controversia en relación con la postulación de PIA como lesión precursora de HGPIN o CaP. Diversos estudios han demostrado que la atrofia prostática focal es un hallazgo común en la próstata, no han encontrado asociación topográfica entre PIA y HGPIN o CaP y han planteado que la inflamación es un fenómeno secundario a la atrofia (102, 123-127). Se ha reportado alta frecuencia de atrofia en las biopsias con CaP (125, 128), y en especímenes de prostatectomía. sin relación topográfica entre PIA y HGPIN o CaP (129). Por tanto, persiste la duda con relación a si la atrofia prostática por sí misma está implicada en la carcinogénesis, o si el evento clave es el proceso inflamatorio que conlleva a atrofia, HGPIN y CaP (92, 101, 129).

2.4 EXPRESIÓN GÉNICA EN EL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO: RNA MENSAJERO Y MICRORNAS

El CaP al igual que otros tipos de cáncer es resultado de alteraciones genéticas y epigenéticas que transforman el epitelio glandular en lesiones pre-neoplásicas y luego en carcinoma infiltrante (47). A pesar de los estudios de estas lesiones, y las investigaciones que han reportado diversos perfiles de expresión génica en el CaP, el conocimiento de los genes involucrados en su carcinogénesis y progresión es todavía limitado (9-11). Se han reportado genes candidatos con efectos diversos en su patogenia, sin embargo, el gran número de genes con cambios en su expresión, muestra que en la cascada de eventos que llevan a su progresión, está involucrada una gran red de alteraciones moleculares, muchas de ellas producto de la activación de oncogenes y la inactivación de genes supresores de tumor, cuyo estudio ha demostrado la heterogeneidad de esta neoplasia (130, 131).

Los avances recientes en la investigación de la patología molecular del cáncer han permitido entender el funcionamiento de muchos oncogenes y genes supresores de tumor que participan en este proceso (45). Entre ellos se encuentran genes relacionados con la organización del citoesqueleto y la matriz extracelular, la regulación del ciclo celular, y la diferenciación y proliferación celular, genes importantes en el crecimiento y la supervivencia de las células epiteliales prostáticas, para los que existe evidencia de su participación directa en la carcinogénesis (10, 131, 132). Al comparar los cambios en la expresión génica entre tejido prostático sano y CaP no metastásico, y entre CaP no metastásico y metastásico, el mayor grado de expresión diferencial está en los genes involucrados en las vías de adhesión, proliferación, motilidad y muerte celular (133).

Los microRNAs son RNAs cortos (19 a 22 nucleótidos) no codificantes, que median el silenciamiento génico post-transcripcional. Reprimen la expresión génica por la degradación del mRNA, y previenen su traducción mediante mecanismos dependientes del grado de complementariedad entre sus secuencias y las del mRNA diana. Su efecto predominante en los genes es inhibitorio, por lo que este mecanismo se denomina “RNA de silenciamiento” (13, 15, 134). Cada microRNA puede tener muchos mRNA diana, y un mRNA puede ser regulado por muchos microRNAs simultáneamente, lo que los convierte en importantes moduladores de la expresión génica (134-136). Su biogénesis inicia con un transcrito primario largo, produciendo al final un microRNA maduro que se une al mRNA complementario para el silenciamiento post-transcripcional. Este microRNA suprime directamente la expresión de los genes diana mediante unión por complementariedad entre su secuencia semilla y la secuencia del mRNA diana, llevando a inhibición de la traducción, o disminución de su estabilidad (Figura 5)(134).

La expresión alterada de muchos microRNAs está asociada con la iniciación, progresión e invasión de muchos tipos de cáncer, a través de vías oncogénicas, o supresoras de tumor, o, de aberraciones genéticas o epigenéticas, incluyendo amplificación, re-arreglos, delección, o silenciamiento del promotor. Cerca del 50% de los genes de microRNAs están ubicados en regiones genómicas relacionadas con cáncer, con frecuencia dentro de sitios cromosómicos frágiles que muestran amplificación, delección o translocación durante la progresión tumoral. Algunos microRNAs han sido catalogados como supresores de tumor, o como oncogenes, dependiendo de los genes que regulan (15, 134, 137). Muchos estudios confirman su amplia desregulación en el tejido tumoral, lo que llevó a su postulación como biomarcadores para diagnóstico, pronóstico y manejo

del cáncer, sumado a que pueden ser extraídos en forma reproducible de una amplia variedad de muestras biológicas, y pueden ser detectados y cuantificados en forma precisa por una variedad de técnicas ampliamente usadas como RT-qPCR, microarreglos, y secuenciación de RNA (14, 17, 137-140). En tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE del inglés: Formalin Fixed Paraffin Embbed), su evaluación tiene ventajas metodológicas en comparación con la del mRNA, pues son más resistentes a la fijación y se degradan menos rápidamente, lo que lleva a que los ensayos sean más exitosos (137, 141-144).

El análisis de expresión de los microRNAs ha permitido separar diferentes tipos de tejido, y varios han sido identificados como des-regulados en múltiples tumores, lo que sugiere que pueden ser incluso mejores que el mRNA para la clasificación molecular específica de los tejidos y los tumores (139). Su silenciamiento epigenético también está involucrado en la adquisición de fenotipos invasivos (145).

Hace más de una década que se realizaron los primeros estudios de perfiles de expresión de microRNAs en muestras clínicas de cáncer, incluyendo CaP (139, 146). Desde entonces, numerosos microRNAs han sido implicados en la carcinogénesis prostática (12, 14, 15, 137, 141, 147). Sin embargo, los perfiles de expresión son poco consistentes, mostrando en algunos casos sub-expresión, y en otros sobre-expresión, posiblemente resultado de los diferentes métodos de estudio, de la heterogeneidad de la enfermedad, y de la dinámica de la expresión de los microRNAs que puede cambiar de acuerdo a la etapa de la carcinogénesis (12, 14, 15).

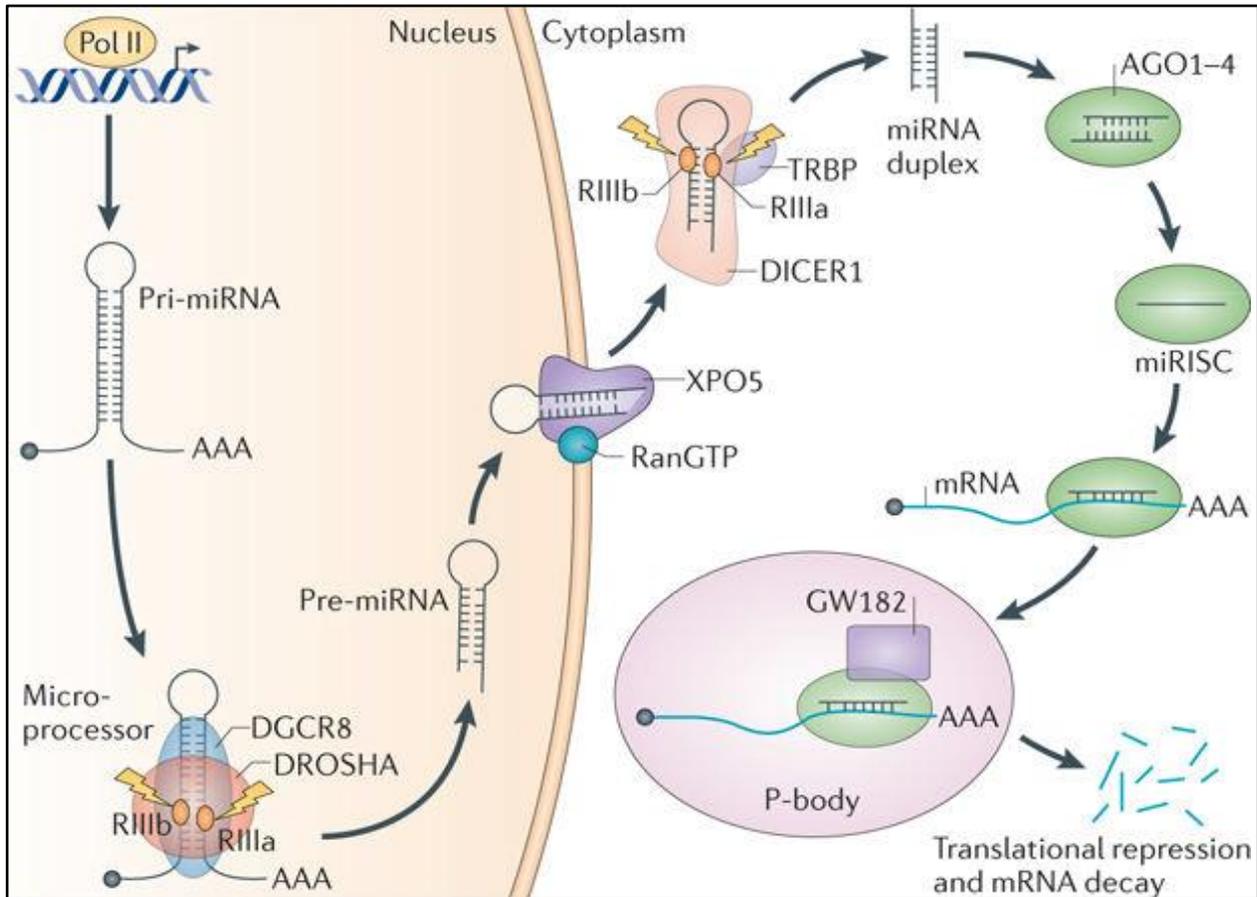


Figura 5. Biogénesis de microRNAs. Los genes de MicroRNAs (miRNAs) son transcritos como miRNAs primarios (pri-miRNAs) por la RNA polimerasa II (Pol II) en el núcleo. El pri-miRNA largo es cortado por el Microprocesador, que incluye DROSHA y DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8), para producir el precursor de miRNA (pre-miRNA) de 60–70-nucleotidos. El pre-miRNAs es entonces exportado del núcleo al citoplasma por la exportina 5 (XPO5) y luego procesado por DICER1, una ribonucleasa III (RIII) que produce el miRNA maduro. Una hebra del miRNA maduro (la hebra guía) es cargada en el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), que contiene las proteínas DICER1 y Argonauta (AGO), dirige el miRISC hacia el mRNA diana por unión de complementariedad de secuencia, y media la supresión génica por degradación dirigida del mRNA y represión de la traducción en los cuerpos de procesamiento (P-bodies). TRBP, transactivation-responsive RNA-binding protein. *Tomado de: MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat Rev Cancer. 2015; 15(6):321-33.*

2.4.1 Estudio de la expresión génica del adenocarcinoma prostático en tejidos fijados en formalina e incluidos en parafina

El diagnóstico molecular de las alteraciones genéticas y el perfil de expresión de mRNA o de proteínas son esenciales para el diagnóstico y manejo de los pacientes con cáncer. La exactitud y reproducibilidad de este diagnóstico molecular depende de la cantidad y calidad de los ácidos nucleicos obtenidos de los especímenes de tejido tumoral (148).

Uno de los factores que puede afectar en forma irreversible la calidad de las biomoléculas, es la isquemia, que inicia cuando se interrumpe el flujo sanguíneo hacia el tejido (149-151). Cuando es prolongada compromete la integridad de moléculas como el mRNA, y por tanto, altera los datos de la expresión génica en una medida dependiente del tiempo y el tipo celular (151, 152). Para evitar esto, es fundamental la técnica usada en la preservación del tejido, considerada el paso más crítico para asegurar un rendimiento adecuado y de alta calidad de DNA, RNA y proteínas (153). El tiempo entre la extracción del tejido y la fijación también es un aspecto importante, pues el retraso en la penetración del fijador en el tejido ocasiona degradación autolítica del RNA y las proteínas, por activación de ribonucleasas y proteasas (154).

Tradicionalmente la fijación se usó para preservar la morfología tisular, pero recientemente se ha enfocado además en la preservación de la integridad molecular de los tejidos. Hay dos formas de preservar el tejido: por fijación química, o por congelamiento (155). El método usado rutinariamente es la fijación en formalina al 10%, por su bajo costo, rápida y completa penetración al tejido (154), excelente conservación de la morfología (155), y porque permite la realización de tinciones de IHQ (156). Los tejidos se denominan fijados en formalina e incluidos en parafina (FFPE), por el

procesamiento al que son sometidos tras la fijación. Ambos procesos, fijación y procesamiento, facilitan que los tejidos sean almacenados a temperatura ambiente por largo tiempo (156, 157).

Efectos del procesamiento de los tejidos en la recuperación y calidad de los ácidos

nucleicos: El congelamiento es uno de los mejores métodos para preservar la integridad de los ácidos nucleicos y las proteínas (148). Comparados con los tejidos congelados, los tejidos FFPE son más fáciles de obtener, y sus archivos en los laboratorios de patología, representan una fuente valiosa de muestras clínicas para estudio (142). El ingrediente activo de la formalina, el formaldehído, lleva a formación de enlaces cruzados entre proteínas y nucleótidos (154) y produce desnaturalización del DNA (148), Esto puede generar fallas o resultados inconsistentes en el análisis molecular, originados en degradación parcial o en modificaciones químicas en el DNA, RNA o las proteínas. Se ha sugerido que estas alteraciones se acentúan con la fijación prolongada, con degradación adicional durante el periodo de almacenamiento (142, 154, 155). La alteración en la amplificación generada por la formalina parece correlacionarse positivamente con el tiempo de fijación y la longitud del amplicón (158). Sin embargo, a pesar de esto, las biomoléculas pueden ser recuperadas y analizadas usando protocolos de extracción específicos, optimizados para tejidos FFPE (159, 160), pues muchas de las modificaciones pueden ser revertidas por calentamiento antes de la hibridación, o la transcripción reversa (158).

En intentos de incrementar la calidad del RNA obtenido de las muestras FFPE, y con el fin de evitar la degradación descrita con la formalina, han sido propuestos métodos diferentes de fijación, como: solución de Bouin, fijador de Carnoy, acetona y alcohol, para

el análisis patológico (156). El método ideal debe brindar equilibrio entre, la preservación de la morfología tisular y la cantidad y calidad de ácidos nucleicos obtenidos, especialmente de RNA (161). El más utilizado es el etanol al 70%, un fijador coagulativo que no induce enlaces cruzados en las proteínas y mantiene la integridad de las biomoléculas mucho mejor que la formalina (162). Permite amplificar eficientemente productos mayores de 150 a 200 pb (163), aunque no se ha demostrado que la recuperación de biomoléculas sea mejor en comparación con la que se logra a partir de tejidos FFPE, o de tejidos congelados (153).

Aunque el RNA puede ser potencialmente degradado en los tejidos FFPE, la posibilidad de existencia de los enlaces cruzados descritos es mayor en las moléculas de RNA más largas, por lo que los microRNAs pueden ser obtenidos más fácilmente y es posible obtener datos de su expresión a partir de estas muestras (142, 164).

Los ensayos basados en técnica de PCR han sido optimizados para superar las dificultades técnicas que generan este tipo de muestras (165). El grupo de Patología de Johns Hopkins evaluó el impacto del procedimiento de FFPE en la calidad del RNA, demostrando que especímenes quirúrgicos no adecuados para congelamiento, como las biopsias de próstata, o los tejidos con poco volumen de cáncer, pueden ser analizados usando microarreglos tras la extracción del RNA de los cortes de tejidos FFPE (166). La capacidad de analizar la expresión de RNA en las biopsias de próstata FFPE, por tanto, provee una herramienta útil para la estratificación de riesgo en las biopsias negativas, identificación de marcadores de pronóstico en las biopsias positivas, y permite que los perfiles de expresión génica puedan usarse como una alternativa en los estudios de prevención de CaP. (167).

Estudio de expresión génica por hibridación *in situ* en tejidos FFPE: El desarrollo de técnicas de hibridación *in situ* de RNA (RNA ISH, del inglés: RNA *in situ* hybridization), permite el análisis del RNA dentro del contexto morfológico, su localización precisa en las células individuales, y cuantificación en tipos celulares específicos (168, 169). Esta localización es posible con las técnicas tradicionales de hibridación *in situ*, pero su uso se dificulta por su complejidad y bajo rendimiento (170).

La tecnología de hibridación cromogénica *in situ* RNAscope® (Advanced Cell Diagnostics Inc., Hayward, CA), basada en un sistema de diseño de sonda y amplificación de señal único, amplifica señales específicas, sin amplificar el ruido de fondo (171). Con el fin de mejorar sustancialmente la relación señal-ruido, esta tecnología emplea una estrategia en la cual dos sondas independientes (pares de sondas Z dobles) deben hibridar a la secuencia diana en tándem para amplificación de la señal. Dado que es altamente improbable que dos sondas independientes puedan hibridar a dianas vecinas inespecíficas, este diseño asegura la amplificación selectiva de la señal diana específica y previene la amplificación de uniones inespecíficas (171, 172).

Esta técnica permite alta resolución en el estudio de la expresión de cada célula dentro de su contexto espacial y morfológico. Tiene la capacidad de detectar múltiples dianas en forma simultánea, y la aparición de señales específicas de cada diana como puntos facilita su medición (171, 173, 174). Su uso en forma manual se ha establecido como una herramienta importante en la detección *in situ* de RNA en una variedad de aplicaciones, y actualmente se está implementando un ensayo automatizado que permitiría mejorar su utilidad en el contexto clínico (172).

Aunque esto había sido demostrado previamente a través de otras técnicas (175, 176), la técnica RNAscope® permite la detección robusta de moléculas aisladas de RNA en especímenes clínicos procesados rutinariamente (172).

Cuando se estudia la expresión génica de los tumores se debe considerar su heterogeneidad. Pero los métodos como RT-qPCR y RNA-seq para determinación cuantitativa del RNA destruyen la morfología de la lesión e impiden la evaluación en el contexto espacial del tejido, limitando la comparación de la expresión génica entre poblaciones celulares heterogéneas (177). Otro aspecto es el relacionado con el microambiente tumoral, hay una interacción altamente compleja de doble vía entre el tumor y su microambiente, y la localización de los marcadores moleculares dentro del microambiente tumoral permite una caracterización más completa del tumor (178). La CISH de RNA permite identificar la fuente precisa de las proteínas secretadas en esto aventaja a la IHQ, pues localiza específicamente el mRNA en la célula de origen, aunque las proteínas secretadas se hayan diluído en el espacio intercelular (179-181).

Esta técnica además permite analizar la heterogeneidad tumoral combinando la CISH y la IHQ, para la identificación de biomarcadores en genes codificantes y no codificantes. Cuando se busca la expresión de genes no codificantes el RNA es la única opción, e incluso para algunos marcadores basados en expresión de genes codificantes que no tienen buenos anticuerpos, para aquellos en los que el nivel de la proteína es variable, o demasiado bajo para ser detectado. Las técnicas CISH de RNA e IHQ se pueden llevar a cabo en la misma lámina en forma secuencial (182, 183), siendo una técnica de fácil implementación y evaluación (171, 172).

2.4.2 Microdissección con captura láser (LCM) en el análisis de expresión génica del CaP

El análisis molecular de los especímenes de tejido y su correlación con los datos clínicos y patológicos, es parte importante de la investigación biológica, pues permite estudiar las células y su interacción con el microambiente tisular (153). Por tanto, un enfoque diferencial de los mecanismos moleculares en los tejidos puede requerir la obtención de una población celular pura (184). En el estudio específico de las neoplasias la participación de diferentes tipos celulares en el tumor, incluyendo células neoplásicas, estromales, e inflamatorias, es un obstáculo importante en su análisis (178), debido a que la amplificación por igual de todos los componentes tisulares obtiene productos con una representación proporcional a la participación de cada tipo celular, y los productos amplificados de las células contaminantes afectan significativamente el análisis. Esto puede llevar a disminuir la señal relativa de la célula diana con cada ciclo de elongación, debido a la presencia de menor cantidad de moléculas molde de la población celular diagnóstica minoritaria. (185).

Esta fuente de incertidumbre común en el análisis genómico, proteómico y transcriptómico de los tumores humanos (185) se supera con el uso de la microdissección con captura láser (LCM, del inglés: Laser Capture Microdissection), una valiosa herramienta de enriquecimiento de un tipo celular específico dentro de un contexto de muestras de tejido complejas (153), en la que es esencial el patólogo por su experticia en histopatología, manipulación de tejidos, técnicas de análisis tisular y correlación clínica de los hallazgos biológicos (153).

Ventajas y limitaciones de la LCM: La aplicación de la LCM permite comparar con mayor precisión la expresión génica entre diferentes poblaciones celulares de un tumor, o entre células tumorales y el tejido sano (186, 187), y, aumenta la especificidad y sensibilidad del estudio del perfil molecular de un tipo celular específico (153, 185). Sus ventajas sobre el resto de métodos para aislar poblaciones celulares similares son su precisión, versatilidad, velocidad, y capacidad para capturar las células en su estado natural, pues las células microdisecadas mantienen el estado fisiológico en el que se encontraban al momento de la fijación, y conservan su morfología (185, 188).

Las limitaciones de la LCM se originan en la resolución óptica disminuida de los cortes de tejidos deshidratados, sin cubre-objetos, que dificulta hacer disecciones exactas de tejidos sin características arquitecturales circunscritas (188, 189). Esto se supera usando tinciones especiales o IHQ para resaltar las células que se desea disecar o que deben ser evitadas (185, 187). Otro aspecto es que los métodos de tinción usados pueden impactar también la cantidad y calidad de DNA, RNA y proteínas obtenidos (190).

Muestreo, preservación y almacenamiento de especímenes de tejido: La calidad y reproducibilidad de los resultados obtenidos por la LCM depende de la calidad de los tejidos (184). Algunos factores pueden afectar el éxito de la recuperación de DNA, RNA y proteínas de las células microdisecadas como el muestreo, duración, método de preservación o fijación y almacenamiento del tejido (153). La congelación en seco permite alto rendimiento y calidad en la obtención de biomoléculas, (155, 185), pero su calidad morfológica es inferior a la de los tejidos FFPE (191). El almacenamiento de los cortes puede resultar en oxidación del RNA en la superficie expuesta, por esto se corta el bloque solo cuando se va a hacer el estudio y se descartan los primeros dos a tres

cortes (153, 184, 192). Se deben evitar los ciclos de congelación-descongelación pues disminuyen la calidad de las biomoléculas en forma irreversible (193).

Selección y preparación de las muestras para LCM: La selección de los tejidos para usar en la LCM depende de la presencia, abundancia y distribución de las células diana en los cortes coloreados con H&E (153). Los cortes montados en las láminas de LCM deben ser almacenados en un ambiente seco y teñidos antes de la disección (194). La llamada Inmuno-LCM, permite reconocer y disecar poblaciones celulares definidas para su estudio molecular (195). Esta técnica es útil también para identificar células que difieren por su estado metabólico (196). En los cortes congelados, un factor limitante es el tiempo requerido para obtener suficiente cantidad de células aisladas (197).

Número adecuado de células microdisecadas: Cada célula humana contiene cerca de 7 pg de DNA genómico (198). La obtención de 600 a 1000 células podría proveer suficiente DNA para varias amplificaciones (185). Una muestra típica obtenida por LCM tiene de 50 a 300 ng de DNA total, pero, puede estar fragmentado, por lo que se recomienda usar amplicones de menos de 200pb (153).

En cuanto al RNA, una célula humana típica contiene 10 a 30 pg de RNA total, del cual el mRNA corresponde al 5% (185). Una forma de calibrar el método de LCM es usar el número de pulsos con el láser, como una aproximación al número de células recolectadas. El aumento de pulsos desde 1000 hasta 3000 se asocia con disminución en los valores de Ct del RNAr 18S, y aumento del RNA obtenido (199). También se ha utilizado la amplificación del RNA para los ensayos de expresión génica, pues estos requieren cantidades mayores de mRNA a las que se obtienen en este tipo de muestras (200).

El contenido de proteínas de las células depende del tejido y del órgano específico, generalmente se requiere de 10 a 100 veces más células para un análisis proteico que para la amplificación de DNA o RNA (185), aunque es posible realizar análisis genómico en muestras derivadas de una sola célula (201).

Análisis de las muestras obtenidas por LCM: Las técnicas de análisis molecular del RNA extraído mediante LCM de tejidos FFPE, deben ser capaces de detectar pequeñas cantidades de biomoléculas parcialmente degradadas (153). Según algunos autores deben limitarse principalmente a RT-qPCR, debido a la pérdida de integridad del RNA generada por la formalina (202). Podrían ser analizadas con una plataforma de microarreglos que requiera poca cantidad y trabaje con ácidos nucleicos parcialmente fragmentados (153). Para obtener la cantidad de RNA necesaria para microarreglos de cDNA de genoma completo, el RNA total aislado debe ser amplificado por transcripción in vitro (203).

LCM en el estudio de expresión génica del CaP: La dificultad generada por la heterogeneidad celular en el estudio de la expresión génica de los tumores, es un problema particular en la evaluación del CaP, debido a que usualmente crece formando acinos tumorales infiltrando a través del estroma y cercanos a glándulas benignas (196). Muchos de los estudios de expresión génica del CaP han examinado el tejido tumoral completo, por tanto, los resultados de los microarreglos usados para diferenciar expresión génica entre células tumorales y normales pueden ser ambiguos (204). Teniendo en cuenta que el tejido benigno tiene un contenido estromal relativamente alto, que disminuye con la progresión del CaP, el análisis de un gen expresado por células estromales puede aparecer sub-regulado en el tumor, igualmente un gen expresado por

células epiteliales puede encontrarse sobre-regulado en el tejido tumoral si está enriquecido por células epiteliales benignas y malignas (199). Además en el CaP el estroma circundante a las células tumorales no es inerte, sino que regula positiva o negativamente su comportamiento y su potencial maligno, lo que resalta la importancia del estudio diferencial de las poblaciones celulares (199).

Varios estudios en los que el uso de LCM aseguró la pureza de las poblaciones celulares estudiadas han comparado los perfiles de expresión entre: células epiteliales prostáticas y células estromales, CaP con diferentes puntajes de Gleason, y, CaP localizado y metastásico a ganglios linfáticos (185, 205-209), también han comparado las modificaciones epigenéticas entre distintos grupos celulares en CaP (210), y, mediante Inmuno-LCM se ha realizado microdissección de células específicas en CaP metastásico para comparar su expresión (211).

2.5 EXPRESIÓN DEL GEN CXXC5 EN CÁNCER

El gen *CXXC5* está localizado en el brazo largo del cromosoma 5, en la región 5q31.3, abarca 35.5 kb y está organizado en 4 exones. Su región promotora corriente-arriba contiene un elemento de respuesta a retinoides, y codifica un factor nuclear inducible por retinoides, por lo que inicialmente se llamó RINF, por “retinoid-inducible nuclear factor” (21, 23).

CXXC5 traduce una proteína de 322 aminoácidos con peso molecular de 32.98 kDa que posee un dominio único conservado: un típico motivo CXXC en dedos de zinc, localizado entre los aminoácidos 257 y 302, cerca al extremo C-terminal (23, 212). Este motivo contiene 8 residuos conservados de cisteína uniendo 2 iones de zinc, se encuentra en

otras 11 proteínas, muchas asociadas con la cromatina y se asume que reconoce sitios CpG no metilados (23). El análisis detallado de la secuencia de CXXC5 reveló además una señal de localización nuclear localizada hacia el extremo N-terminal del dominio CXXC en dedos de zinc (23, 212). Se ha demostrado que el dominio CXXC en los miembros fundadores de la familia de proteínas CXXC, participa en interacciones con el DNA. Además, muchas de las otras proteínas que contienen dominios CXXC regulan e interfieren con la actividad de los factores modificadores de la cromatina (12).

CXXC5 es un gen que hasta ahora ha sido poco investigado en el contexto clínico, debido a que su secuencia solo fue conocida recientemente (213). Los reportes de su expresión indican que tiene un compromiso funcional en la mielopoyesis tanto normal como tumoral, es expresado en las células hematopoyéticas normales, al menos en las etapas finales del proceso de maduración, y se ha propuesto como candidato a gen supresor de tumor en células mieloides (21, 23).

Su expresión no está restringida al tejido mieloide. Se ha descrito por análisis de las bases de datos que se expresa en forma ubicua en tejidos humanos adultos y embrionarios (212). En análisis de varios extractos proteicos de diferentes órganos, la proteína CXXC5 mostró diferentes niveles de expresión, encontrándose los niveles de expresión más altos en la placenta y los más bajos en el cerebro (23). Debido a que su expresión no está restringida al tejido mieloide, este gen puede estar involucrado en el desarrollo y/o homeostasis de otros tejidos. Se ha reportado que CXXC5 participa en el desarrollo del sistema nervioso (22).

Estudios recientes han demostrado que CXXC5 se une al DNA y actúa como activador transcripcional, así como también como represor. Además, se ha demostrado que el

parólogo de CXXC5, CXXC4 se une a DNA rico en sitios CpG no metilados, y se ha postulado que CXXC5 tenga una función similar (214).

CXXC5 ha sido descrito como supresor de tumor en leucemias, sin embargo, muchos genes han sido previamente observados regulados en forma diferencial entre leucemias y tumores sólidos. En el estudio de Knappskog *et al* investigaron su patrón de expresión en tumores sólidos derivados de tejidos con orígenes en diferentes líneas germinales, en todos ellos encontraron sobreexpresión de CXXC5 en el tejido maligno comparado con el tejido benigno. Esto contrasta con los hallazgos previos en líneas celulares de leucemia donde su expresión estuvo aumentada en el fenotipo benigno. La desregulación tumoral vs la desregulación normal de la expresión de CXXC5 presenta características similares a la de otros genes importantes en la diferenciación, cuyas sobre, o sub-regulación son requeridas funcionalmente de acuerdo con el contexto celular y el programa de diferenciación (213). Estos resultados pueden hacer parte del concepto emergente de que algunos genes de la diferenciación pueden contribuir funcionalmente al desarrollo de neoplasias al ser sobre, o sub-regulados por mecanismos epigenéticos, antes que por mutaciones de activación, translocaciones o amplificaciones. En contraste con la mayoría de los genes desregulados en cáncer, los genes de diferenciación pueden ser regulados en forma adversa dependiendo del contexto del tejido (213).

Se conoce poco acerca de los mecanismos moleculares a través de los cuales CXXC5 ejerce su función biológica. Se ha sugerido un vínculo entre su expresión y dos vías de señalización conocidas como desreguladas en tumores: la vía de beta-catenina/Wnt y WT1. También se ha sugerido un vínculo entre CXXC5 y la activación de la proteína

quinasa ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) reguladora de la activación transcripcional de p53 (212, 213). En este aspecto, se ha reportado que CXXC5 es requerido para la activación de ATM en respuesta al daño al DNA, y por tanto para la apoptosis y detención del ciclo celular inducida por activación transcripcional de p53. En respuesta a esto induce la expresión y los efectos biológicos de los genes dependientes de p53 (212). La localización nuclear de CXXC5 es necesaria para su capacidad de activar p53, y aunque la mutación de los residuos conservados de cisteína del motivo CXXC en dedos de zinc no afecta su localización nuclear, dicha mutación elimina su capacidad de activar p53 y sus efectos corriente-abajo, sugiriendo que este motivo tiene una participación importante en su función biológica. El silenciamiento de CXXC5 inhibe la fosforilación de ATM y la activación de p53 y detención del ciclo celular en las células MCF7, sin embargo, este silenciamiento no afecta el reclutamiento de ATM inducido por el daño al DNA (212). El hallazgo de que altos niveles de expresión de CXXC5 están asociados con p53 “wild-type” puede indicar que su sobreexpresión puede sustituir a las mutaciones de p53 como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama (213).

También se ha reportado que CXXC5 regula negativamente la vía de beta-catenina/Wnt, así como su blanco transcripcional Tumor de Wilms 1 (WT1). Esta inhibición de Wnt por CXXC5 ha sido descrita en tejidos no tumorales (215). La evidencia de su función como supresor de tumor en LMA ha sido demostrada en relación a esta regulación negativa, y la activación de Wnt ha sido implicada en la transformación leucémica, donde promueve la proliferación y supervivencia de las células leucémicas *in vitro* (214).

Sin embargo, en el estudio de Kuhn1 no se observó interacción de CXXC5 con las proteínas Dvl, lo que puede explicarse porque en las líneas celulares leucémicas

estudiadas CXXC5 estuvo localizada predominantemente en el núcleo, en contraste, Kim *et al* y Anderson *et al* encontraron que CXXC5 estuvo localizado en el citoplasma. De modo que la interacción de CXXC5 con las proteínas Dvl y su importancia en la atenuación de Wnt puede depender del contexto celular (214).

Las alteraciones genéticas de CXXC5 parecen ser infrecuentes. Los estudios realizados en LMA no han encontrado mutaciones de CXXC5 (21). Además se ha encontrado evidencia de silenciamiento de CXXC5 por hipermetilación del promotor por lo que se ha descrito que las modificaciones epigenéticas así como la regulación transcripcional podrían contribuir a la expresión aberrante de CXXC5 en LMA (214).

2.6 EXPRESIÓN DE FMOD EN TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y EN ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

El gen FMOD codifica para la proteína fibromodulina que pertenece a la familia de proteoglicanos pequeños ricos en leucinas (SLRPs, del inglés: small leucine-rich repeat proteoglycan) de la matriz extracelular, de la cual también hacen parte decorin, biglycan, y lumican (216). Los proteoglicanos son macromoléculas que consisten en una proteína central unida en forma covalente a una o más cadenas laterales de glucosaminoglicanos. Los miembros de esta familia tienen un dominio central que contiene 6–10 repeticiones ricas en leucina (LRR), flanqueadas por regiones N-terminales y C-terminales con residuos conservados de cisteína, y poseen cadenas laterales, las de fibromodulina son de queratansulfato (217).

Fibromodulina es una proteína de 42-kDa que se localiza en el citoplasma y contiene una secuencia secretora. Tiene un papel importante en la organización de la estructura de

las fibras de colágeno tipo I y II de la matriz extracelular (218, 219). Su expresión es ubicua en una variedad de tejidos conectivos densos regulares, como en tendones, ligamentos y cartílago, pero no se encuentra, o se expresa en bajos niveles en la piel, el tejido óseo, y las vísceras (220).

Además de sus funciones estructurales, fibromodulina también actúa como transductor de señales al interactuar con una variedad de moléculas secretadas a la matriz extracelular. Se ha demostrado su capacidad de estimular la cascada del complemento a través de su interacción física con C1q, por lo que también ha sido asociada con la respuesta inflamatoria (221). Al unirse fibromodulina al factor H del complemento, un regulador inmune que inhibe la activación del complemento, deja libre C1q, llevando a procesos patológicos por activación de la cascada (222).

Otras funciones descritas de fibromodulina incluyen su acción moduladora en la actividad de TGF- β con quien forma complejos durante la reparación de tejidos (223-225). Esta afinidad está relacionada también con su papel como estimulador de angiogénesis. Fibromodulina induce secreción de TGF- β por las células endoteliales, como se demostró en el estudio realizado en tejidos que contienen melanocitos, donde los altos niveles de expresión de fibromodulina estimularon la angiogénesis en los diferentes pasos de este proceso: crecimiento de células endoteliales, migración y formación de redes capilares (222).

Desde hace mucho los proteoglicanos han sido involucrados en la biología tumoral. Inicialmente, los patólogos notaron que algunos carcinomas inducen una reacción desmoplásica en el tejido conectivo que rodea a las células tumorales, en la que con tinciones especiales se identificó la presencia de proteoglicanos, y se consideró una

especie de “reacción ante el invasor”. Con los avances en la biología celular, se ha demostrado la capacidad de los proteoglicanos, sobre todo de otros de los miembros de la familia de SLRPs, de interactuar con ligandos y receptores que regulan el crecimiento celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos (226).

Sin embargo, solo recientemente se ha reportado su posible participación en los procesos de carcinogénesis. Los primeros reportes que asocian a fibromodulina con neoplasias provienen de estudios en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica de células B (CLL-B), donde se encontró significativamente sobreexpresada (227). Posteriormente se describió como un antígeno asociado a tumor, también en leucemia, debido a su potencial para generar una respuesta antitumoral específica (228, 229). Se considera que fibromodulina participa en la regulación de la dinámica entre el carcinoma y su estroma circundante, al inducir el ambiente inflamatorio de los carcinomas en desarrollo su producción en el estroma, llevando a una estructura tisular densa (220).

El conocimiento de la expresión de fibromodulina en otros procesos neoplásicos es limitado. En estudios de expresión génica mediante microarreglos, se identificó la expresión de este proteoglicano a nivel de transcritos en líneas celulares de CaP de rata, iniciando con los estudios de expresión a nivel epitelial de esta proteína, lo que sugirió nuevos roles para esta familia de proteoglicanos (19).

Hasta hace poco no había información de la expresión de fibromodulina en líneas celulares de CaP humano, o en tejido prostático humano normal, benigno o maligno. En estudios de expresión realizados mediante RT-qPCR se reportó su expresión diferencial a nivel de transcritos entre diferentes líneas celulares prostáticas humanas. El alto nivel de expresión de transcritos de FMOD en células LNCaP y en células PC-3, en

comparación con el de las células no-tumorogénicas PWR-1E, llevó a sugerir que este proteoglicano podría servir como marcador del potencial metastásico del CaP (20).

Mediante inmunocitoquímica se evaluó la expresión de la proteína fibromodulina en las mismas líneas celulares, encontrando que su expresión fue escasa o nula en las células PWR-1E, moderada a fuerte en casi todas las células PC3, y fuerte en células LNCaP. La tinción IHQ del tejido prostático humano benigno fue negativa en las células epiteliales y débil en el estroma, y fue significativamente más fuerte en las células epiteliales cancerosas que en los acinos prostáticos benignos adyacentes en el tejido del mismo paciente. Esto revela que en la expresión intracelular de este proteoglicano en los tumores de próstata ocurren cambios en su patrón de expresión, cambiando la localización de los niveles altos de expresión del estroma, hacia las células epiteliales (24).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar en muestras clínicas de tejido prostático, la asociación entre inflamación y adenocarcinoma prostático y sus posibles lesiones precursoras, y mediante RT-qPCR, inmunohistología, e hibridación cromogénica *in situ*, la expresión de genes y microRNAs asociados a esta neoplasia, y su relación con la progresión.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar mediante estudio histológico, en biopsias de próstata con tejido prostático benigno y con adenocarcinoma prostático, la presencia de inflamación, atrofia inflamatoria proliferativa (PIA), y neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIIN), y determinar su asociación con la presencia de adenocarcinoma.
- Evaluar mediante RT-qPCR, en biopsias de próstata con tejido prostático benigno y con adenocarcinoma prostático, la expresión de un grupo de genes y su asociación con cáncer de próstata.
- Evaluar mediante inmunohistoquímica e hibridación cromogénica *in situ*, en muestras de tejido prostático con tejido prostático benigno y con adenocarcinoma prostático, la expresión de un grupo de genes y su asociación con la presencia de lesiones precursoras del adenocarcinoma de próstata.
- Evaluar mediante RT-qPCR, en muestras de tejido prostático con tejido prostático benigno y con adenocarcinoma prostático, la expresión de un grupo de microRNAs y su asociación con la presencia de lesiones precursoras del adenocarcinoma de próstata.

4. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PRESENCIA DE INFLAMACIÓN, ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA, Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE ALTO GRADO, EN BIOPSIAS DE PRÓSTATA CON TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y CON ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE ESTA NEOPLASIA.

4.1 MATERIALES Y METODOS

4.1.1 Tipo de estudio y población

Estudio prospectivo observacional realizado entre enero de 2012 y junio de 2015 en el laboratorio de investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena y el Hospital Universitario del Caribe. Aprobado por los comités de ética de las instituciones participantes.

4.1.2 Biopsias de tejido prostático

Las biopsias de tejido prostático fueron tomadas de pacientes referidos al servicio de Radiología del Hospital Universitario del Caribe para realización de biopsia trans-rectal de próstata eco-dirigida por sospecha de adenocarcinoma prostático, sin tratamiento previo de quimioterapia u hormonoterapia, quienes fueron invitados a participar en el estudio y firmaron un consentimiento informado. Las muestras de tejido fueron recolectadas en los departamentos de Radiología y Patología, y los datos clínicos fueron obtenidos de los registros de los mismos departamentos del Hospital Universitario del Caribe de acuerdo con los lineamientos institucionales.

A estos pacientes se les tomó una muestra adicional de tejido prostático para estudio molecular. Siguiendo el protocolo de rutina, los pacientes recibieron profilaxis antibiótica por vía oral con 500 mg diarios de Ciprofloxacina durante diez días, desde tres días antes del procedimiento, hasta siete días después del mismo. Las biopsias fueron tomadas por un médico radiólogo experimentado, el agente anestésico usado fue lidocaína tópica. Los estudios de ultrasonido se realizaron con un equipo Sonosite Titan® (Fujifilm Sonosite Inc. USA) con transductor transrectal. A los pacientes sin lesiones hipo-ecoicas en el tejido prostático se les tomaron biopsias prostáticas por octantes, y a los que presentaron lesiones hipo-ecoicas se les tomaron biopsias prostáticas adicionales sitio-específicas. En general fueron tomados entre ocho y doce cilindros de tejido prostático de aproximadamente un centímetro de longitud de la zona periférica de la glándula y de los nódulos sospechosos. Una biopsia en espejo de los nódulos sospechosos fue tomada adicionalmente en los casos en los que estos estaban presentes, y en caso contrario la biopsia adicional fue tomada en espejo de una de las zonas previamente biopsiadas de la zona periférica. Todas las biopsias fueron tomadas con una pistola y una aguja Tru-Cut® calibre 18 (Carefusion, UK). Las muestras de biopsia fueron fijadas en formalina al 10%, procesadas y sometidas a coloración histológica con H&E, de acuerdo con el protocolo de rutina. Los cortes teñidos fueron evaluados por un Patólogo del hospital para su respectivo diagnóstico histopatológico.

4.1.3 Identificación histológica

Todos los cortes histológicos de los bloques de tejido incluidos en el estudio coloreados con coloración de rutina (H&E), fueron evaluados para determinar la presencia de tejido prostático sano, inflamación crónica, atrofia focal, PIA, HGPIIN y CaP.

Para el estudio de las biopsias fueron descartados los cilindros que solo contenían estroma prostático o tejido no prostático (mucosa rectal, o glándulas accesorias como Vesículas seminales o glándulas de Cooper). Las biopsias con CaP fueron categorizadas de acuerdo al índice de Gleason (60). Los focos de HGPIN presentes fueron identificados usando los criterios establecidos por Bostwick *et.al.* (84).

La inflamación en el tejido fue evaluada usando el Sistema de clasificación histopatológica de la inflamación prostática, desarrollado por el consenso del “North American Chronic Prostatitis Collaborative Research Network (CPCRN)” y el “International Prostatitis Collaborative Network (IPCN)”. Se determinó el grado (1, leve; 2, moderada; 3, severa), y la extensión de la inflamación (1, focal; 2, multifocal; 3, difusa), en cada compartimiento tisular (estromal, periglandular y glandular) (Tabla 1) (77).

Para los casos con presencia de inflamación se determinó el número de cilindros con inflamación moderada o severa, y en los casos con infiltrado inflamatorio de intensidad variable se registró el mayor grado observado. Para determinar el puntaje de intensidad de inflamación crónica, se siguieron los criterios usados por Gurel *et.al.*(75), multiplicando en cada biopsia el grado de inflamación presente por su respectiva extensión, y se clasificaron en: Ninguna: 0; Leve: 1-2; Moderada: 3-5, Severa: 6-9. En esta forma, el score de intensidad de inflamación crónica en cada biopsia en particular representa el área de tejido afectada por un grado particular de inflamación. Para el análisis de la inflamación crónica, el puntaje de intensidad de inflamación fue categorizado en tres niveles como: ausente, leve, y, moderada/severa. La localización de la inflamación fue clasificada como estromal, periglandular y glandular.

Tabla 1. Clasificación de los infiltrados inflamatorios prostáticos.

Características	
Localización	Patrón histológico
Glandular	Infiltrado infamatorio localizado en el epitelio de los conductos/las glándulas y/o en las luces
Periglandular	Infiltrado infamatorio localizado en el estroma, alrededor de las glándulas/los conductos, a < de 50 um de ellos.
Estromal	Infiltrado infamatorio localizado en el estroma prostático, sin rodear las glándulas/los conductos y localizado > de 50 um de ellos
Extensión	Área de tejido comprometido por el infiltrado infamatorio
Focal	<10%
Multifocal	10-50%
Difuso	>50%
Grado	Descripción morfológica (densidad de células inflamatorias, células/mm²)
1/ Leve	Células inflamatorias individuales, la mayoría separadas por espacios definidos (<100)
2 / Moderada	Sabanas confluentes de células inflamatorias sin destrucción de tejido o formación de folículos linfoides (100±500)
3 / Severa	Sabanas confluentes de células inflamatorias con destrucción de tejido o formación de folículos linfoides (>500)

1Tomado de: Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. BJU Int. 2001;87(9):797 (77).

La presencia de atrofia focal y su tipo más común en las biopsias fue evaluada de acuerdo con los parámetros establecidos por el “Working Group Classification of Focal Prostate Atrophy Lesions”, que incluye cuatro categorías: atrofia simple (SA), hiperplasia post-atrónica (PAH), atrofia simple con formación de quistes (SACF), y atrofia parcial (PA), usando las definiciones morfológicas de cada tipo (Figura 4). El término atrofia inflamatoria proliferativa incluye solo dos tipos de lesión: SA y PAH (95). En este estudio los otros dos tipos de atrofia focal: atrofia simple con formación de quistes (SACF), y atrofia parcial (PA), fueron categorizados juntos como No-PIA.

El grado de atrofia focal fue medido usando las categorías descritas por Postma: 0: no atrofia, 1: uno a tres cilindros con uno o más focos pequeños, separados de atrofia, 2: más de tres cilindros con uno o más focos pequeños, separados de atrofia, 3: más de 5 mm de atrofia continua en uno o dos cilindros, 4: más de 5 mm de atrofia continua en más de dos cilindros (125). Y fue categorizado como: ausente, grado 1/grado 2, y grado 3/grado 4.

Además fueron buscadas asociaciones topográficas y transiciones entre PIA-HGPIN y PIA-CaP, de acuerdo a la descripción de Putzi y De Marzo (90), con una modificación: la asociación de SA y PAH con HGPIN y/o CaP fue descrita como fusión, vecina, o distante. Fusión cuando el epitelio de un foco de HGPIN o carcinoma estaba directamente fusionado con PIA en un mismo acino o conducto. Vecina, cuando las dos lesiones estaban muy cercanas con escaso estroma interpuesto, pero no fusionadas en un mismo acino o conducto, estando ambas en un mismo campo microscópico de alto poder. Y distante, cuando el foco de HGPIN o de carcinoma estaba separado de PIA por más de un campo microscópico de alto poder.

Se determinó en forma global la prevalencia de inflamación, atrofia focal, y HGPIN en todas las biopsias de próstata, y luego para los dos grupos: biopsias con y sin adenocarcinoma.

La presencia, localización, e intensidad de la inflamación, fueron evaluadas en relación con la edad, la presencia de adenocarcinoma, el grado tumoral, la presencia, tipo y grado de atrofia focal, y la presencia de HGPIN. La presencia, tipo, y grado de atrofia focal fueron evaluadas en relación con la edad, la presencia de adenocarcinoma, el grado tumoral, la presencia de HGPIN, y la presencia, localización, e intensidad de la inflamación.

4.2 RESULTADOS

Para el análisis histológico, se incluyeron 1620 cilindros de biopsias de tejido prostático, obtenidas de 203 pacientes. En las biopsias de 90 pacientes se identificó CaP (44.3%). Hubo una diferencia significativa en la edad entre el grupo con cáncer y el grupo sin cáncer ($p < 0.0001$), (Tabla 2). El porcentaje de tejido prostático comprometido por el tumor en las biopsias con cáncer fue en promedio de 49.1% (DE: 25.5).

4.2.1 Inflamación crónica, intensidad, y localización, en relación con adenocarcinoma prostático

En general, la inflamación crónica fue un hallazgo frecuente, se encontró en los especímenes de biopsia de 157 (77.3%) pacientes (Tabla 3), siendo más frecuente la inflamación de intensidad leve (n: 105, 66.9%). La inflamación crónica moderada y severa estuvo presente en las biopsias de 44 (28%) y 8 (5.1%) casos, respectivamente. Se encontró una asociación significativa entre la presencia de inflamación y la presencia

de adenocarcinoma ($p=0.031$), con 76 biopsias mostrando inflamación y adenocarcinoma. Hubo una diferencia de edad significativa entre los pacientes con inflamación en sus biopsias (Media: 67.9, SD: 8.8) y los pacientes sin inflamación (media: 63.5, SD: 10.9) en sus biopsias ($p=0.005$).

En las 157 biopsias con presencia de infiltrado inflamatorio se evaluó su localización, encontrándose en forma predominante en el compartimiento periglandular ($n: 104$, 66.2%). Siendo también la localización más frecuente entre las 76 biopsias en las que la inflamación estuvo asociada a la presencia de adenocarcinoma ($n: 56$, 73.7%) (Tabla 3).

Al estudiar cada patrón de localización de la inflamación en relación con la presencia de adenocarcinoma, se encontró que la inflamación glandular estuvo asociada significativamente con menor frecuencia al adenocarcinoma, que al tejido prostático benigno ($p=0.032$), (Figura 6)(230). El infiltrado inflamatorio en esta localización estaba compuesto en estos casos además de linfocitos, por polimorfonucleares neutrófilos.

Hubo una diferencia significativa en la intensidad de la inflamación entre los tres compartimientos tisulares de localización de la misma, siendo la inflamación glandular más frecuentemente asociada a intensidad de inflamación moderada/severa, y la localización estromal a intensidad de inflamación leve ($p<0.0001$).

Tabla 2. Edad, y características histopatológicas de las biopsias, en relación con presencia de adenocarcinoma

	Casos sin cáncer n= 113	Casos con cáncer n= 90	<i>p</i> valor
Edad			
Media (±SD)	64.5 (9.5)	69.9 (8.5)	<0.0001*
95% CI de la media	62.75–66.3	68.1–71.7	
	n (%)	n (%)	
HGPIN			
Si	6 (5.3)	52 (57.8)	<0.0001**
No	107 (94.7)	38 (42.2)	
Inflamación			
Si	81 (71.7)	76 (84.4)	0.031**
No	32 (28.3)	14 (15.6)	
Atrofia focal			
Si	87 (77.0)	61 (67.8)	0.142**
No	26 (23.0)	29 (32.2)	
PIA			
Si	73 (64.6)	61 (67.8)	0.657**
No	40 (35.4)	29 (32.2)	

* Prueba U Mann-Whitney, **Prueba χ^2

4.2.2 Atrofia focal, tipos y grados, relación con la edad y con adenocarcinoma prostático

La atrofia focal fue también un hallazgo frecuente, estuvo presente en las biopsias de 148 (72.9%) pacientes (Tabla 1). La clasificación morfológica mostro que PIA fue el tipo más común, presente en 134 (66%) casos. En la mayor parte de los casos con PIA se encontró el tipo atrofia simple (n=131, 97.7% de los casos con_PIA), mientras que, la hiperplasia post-atrónica se identificó en 17 (12.7% de los casos con PIA). Ambos tipos de PIA fueron observados como única forma de atrofia focal, o combinados entre sí.

La atrofia focal No-PIA estuvo presente en 43 (21.2%) casos, la mayoría correspondientes a atrofia parcial y frecuentemente asociados a atrofia simple. No-PIA fue el tipo menos frecuente de atrofia focal observado en forma aislada, presente en un bajo porcentaje de casos (n=14, 6.9%). Las formas combinadas de PIA y No-PIA fueron observadas en 14.3% (n=29) de los casos.

No hubo asociación entre el adenocarcinoma y la presencia ($p=0.142$), el grado ($p=0.263$), o el tipo ($p=0.157$) de atrofia focal. Cuando se evaluó PIA en forma específica, aislada, o combinada con No-PIA, no se encontró asociación entre su presencia y adenocarcinoma ($p=0.204$ y $p=0.406$, respectivamente).

Tabla 3. Localización de la inflamación en las biopsias de próstata (n=157)

Localización de inflamación	Biopsias con inflamación	Biopsias con inflamación y cáncer
	n (%)	n (%)
Glandular	28 (17.8%)	8 (10,5%)
Periglandular	104 (66.2%)	56 (73,7%)
Estromal	25 (15.9%)	12 (15.8%)
Total	157 (100%)	76 (100%)

La atrofia no estuvo asociada a la edad. Los grados leves de atrofia fueron más frecuentes (n=130, 64%) que los grados altos (n=18, 8.8%). No hubo diferencia significativa entre PIA y No-PIA en relación con grado de atrofia (p=0.267). Todos los casos con grados mayores de atrofia correspondieron a PIA.

4.2.3 Atrofia focal en relación con presencia de inflamación

Hubo diferencia significativa en la presencia y tipo de atrofia focal entre los casos con y sin inflamación (p<0.0001) (Figura 7A)(230). Los tipos de atrofia fueron significativamente diferentes entre las biopsias con diferente intensidad de inflamación (p<0.0001). PIA fue encontrada más frecuentemente en presencia de inflamación y fue el tipo predominante de atrofia en los casos con intensidad de inflamación moderada/severa (p<0.0001). Mientras No-PIA fue el tipo predominante en casos sin inflamación, y la inflamación estuvo presente en solo tres casos con No-PIA como un tipo exclusivo de atrofia. El grado de PIA estuvo asociado a la intensidad de la inflamación (p=0.003), y cada grado de PIA tuvo una diferencia significativa entre la inflamación leve y moderada/severa: PIA grado 1 y 2 estuvo asociada con inflamación leve y PIA grado 3 y 4 con inflamación moderada/severa (Figura 7 B) (230).

4.2.4 HGPIN en relación con CaP, grado tumoral, atrofia focal e inflamación

Fueron identificados focos de HGPIN en 58 (28.5%) casos. Hubo diferencia significativa en la edad de los pacientes con HGPIN (Media: 71.3, DE: 9.1) y sin HGPIN (Media: 65.1, DE: 9.0). Hubo asociación significativa entre HGPIN y presencia de CaP (p<0.0001), pero no entre HGPIN y el grado tumoral (p=0.68). La presencia de HGPIN no estuvo asociada a presencia o localización de inflamación, a la intensidad de la inflamación ni al tipo o grado de atrofia focal.

Localización de la inflamación	Biopsias con cáncer n (%)	Biopsias benignas n (%)	p
Glandular	8 (28.6%)	20 (71.4%)	0.032
Periglandular	56 (53.8%)	48 (46.2%)	ns
Estromal	12 (48%)	13 (52%)	ns

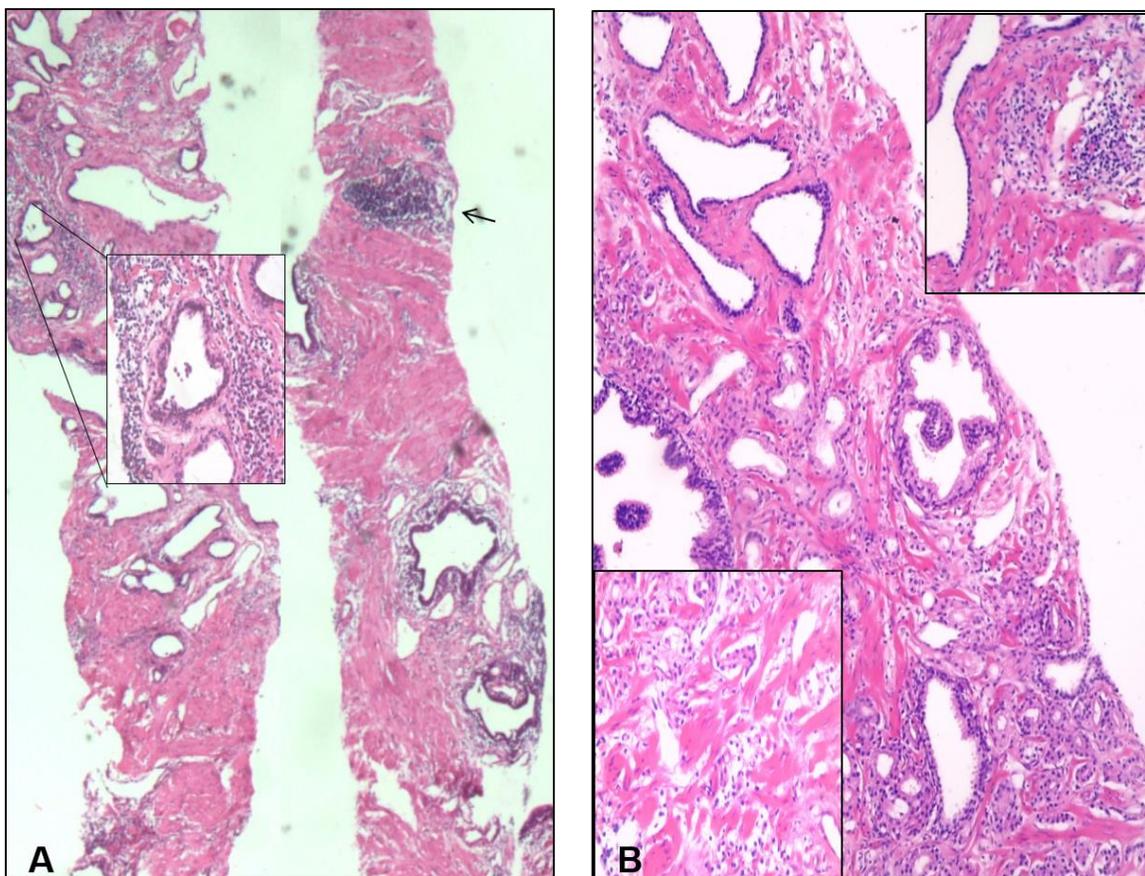


Figura 6. Localización de la inflamación en relación con adenocarcinoma prostático. Arriba: Localización de la inflamación en biopsias con y sin adenocarcinoma. Abajo: A: Biopsia benigna con inflamación estromal (flecha), periglandular y glandular inflamación (recuadro), HE, X40, X400. B: Biopsia de CaP con HGPIN y PIA, inflamación periglandular (recuadro, abajo), inflamación estromal (recuadro, arriba) H&E, X100. Tomado de: *Inflammation and focal atrophy in prostate needle biopsy cores and association to prostatic adenocarcinoma. Annals of diagnostic pathology. 2016; 24:55-61.*

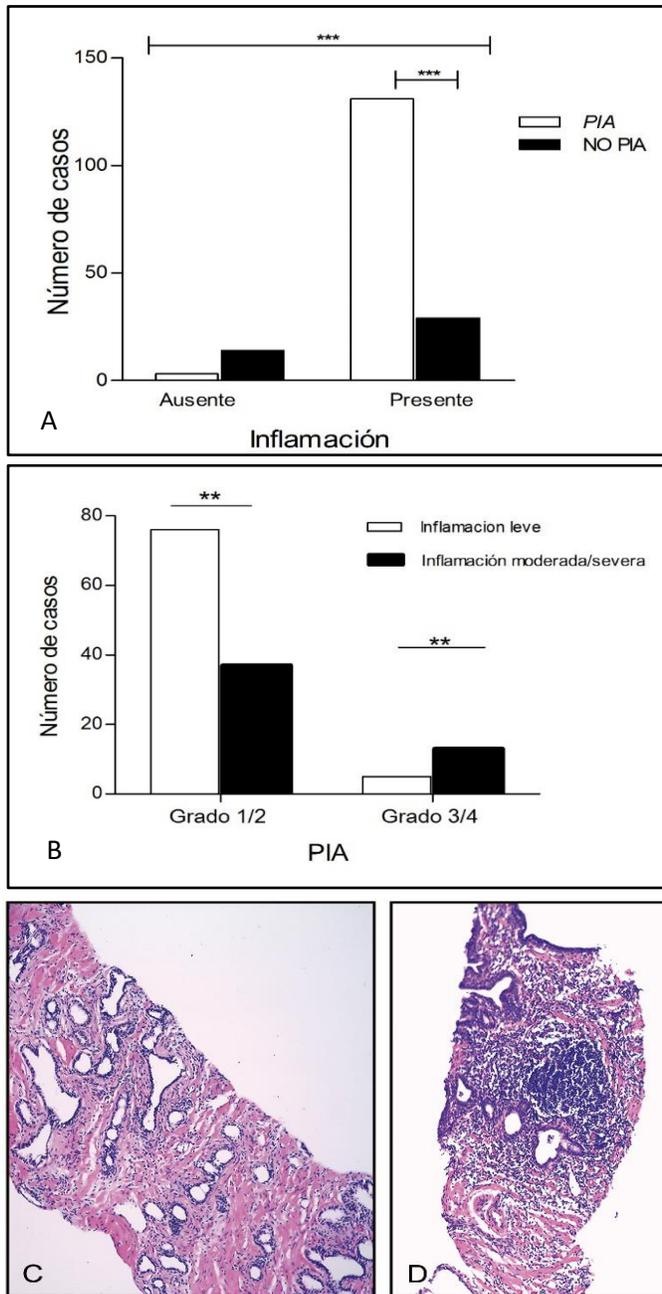


Figura 7. Relación entre tipo y grado de atrofia focal e inflamación. A: Asociación del tipo de atrofia focal con la presencia de inflamación. B: Asociación del grado de PIA con la intensidad de la inflamación. C: Biopsia de próstata con PIA e inflamación leve, D: Biopsia de próstata con PIA e inflamación severa, C a D: H&E, x100. Tomado de: *Inflammation and focal atrophy in prostate needle biopsy cores and association to prostatic adenocarcinoma. Annals of diagnostic pathology. 2016; 24:55-61.*

4.2.5 Efectos de la presencia de Inflamación, PIA, y HGPIN en el riesgo de adenocarcinoma

En un análisis multivariado inicial que incluyó inflamación, PIA y HGPIN, se encontró que la presencia de HGPIN estuvo asociada con un riesgo 22.02 veces más alto de adenocarcinoma (95% CI: 8.53 - 56.8). Aunque hubo mayor frecuencia de inflamación en las biopsias con cáncer, la asociación significativa encontrada en el análisis univariado se perdió en el análisis multivariado. La presencia de PIA no contribuyó a la probabilidad de adenocarcinoma.

Se observó que el 45.5% (n: 41) de los casos con cáncer tuvo al menos un cilindro de tejido con intensidad de inflamación crónica moderada/severa, comparado con el 22.1% (n=25) de los casos benignos. Esta variable fue incluida en un modelo multivariado incluyendo inflamación, número de cilindros con inflamación moderada/severa y localización glandular de la inflamación, resultando que los casos con al menos un cilindro de tejido con inflamación moderada/severa tenían 2.9 veces mayor probabilidad de adenocarcinoma, que los casos sin cilindros de tejido con esta intensidad de inflamación (OR: 2.94; IC 95%:1.27-6.8).

Este modelo también mostró que la localización glandular de la inflamación estuvo asociada con un riesgo disminuido de adenocarcinoma (OR: 0.295, 95% CI: 0.08-0.99), de acuerdo con los hallazgos descritos previamente (Tabla 4).

4.2.6 Asociación topográfica entre PIA y HGPIN o adenocarcinoma

Se observó transición topográfica entre PIA y HGPIN en 17 casos, en la mayoría de ellos observada en un solo cilindro de tejido (n: 15, 88.2%). En 5 casos (29.4%) se identificó

transición adyacente entre PIA y HGPIIN, transición vecina en 9 casos (52.9%), y distante en 3 (17.7%) de estos casos.

Una transición entre PIA y adenocarcinoma se observó en 35 casos, siendo vecina en 26 (74.3%), y distante en 9 (25.7%) de estos casos. Ambas formas de transición topográfica estuvieron presentes en 3 de estas biopsias en forma combinada.

Tabla 4. Efectos de la presencia de Inflamación, número de cilindros con inflamación moderada/severa, localización glandular de la inflamación, y HGPIIN, en riesgo de cáncer de próstata (n=203)

Variable	Biopsias con Cáncer n (%)	Biopsias benignas n (%)	Valor p	OR	IC 95%
Presencia de inflamación	76 (84.4)	81 (71,7)	0.917	0.954	0.39- 2.32
≥1 cilindro con inflamación moderada/severa	41 (45.5)	25 (21.1)	0.012	2.944	1.27- 6.80
Inflamación Glandular	8 (8.9)	20 (17.7)	0.050	0.295	0.08- 0.99
HGPIIN	52(57.8)	6 (5.3)	0.000	22.02	8.53- 56.8

5. EVALUACIÓN POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL, DE LA EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE GENES Y SU ASOCIACIÓN CON CÁNCER DE PRÓSTATA, EN BIOPSIAS DE PRÓSTATA CON TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.

5.1 MATERIALES Y METODOS

5.1.1 Muestras

Las biopsias de tejido prostático fueron tomadas de pacientes referidos al servicio de Radiología del Hospital Universitario del Caribe para biopsia transrectal de próstata eco-dirigida por sospecha de adenocarcinoma prostático, sin tratamiento previo de quimioterapia u hormonoterapia, quienes fueron invitados a participar en el estudio y firmaron un consentimiento informado. Las muestras de tejido fueron recolectadas en los departamentos de Radiología y Patología, y los datos clínicos fueron obtenidos de los registros de los mismos departamentos del Hospital Universitario del Caribe de acuerdo con los lineamientos institucionales.

5.1.2 Biopsias de tejido prostático

Las biopsias fueron tomadas por un médico radiólogo experimentado usando una pistola de biopsia (Anvotech®) y una aguja Tru-Cut® calibre 18 (Carefusion, UK). Bajo visión ecográfica con un equipo Sonosite Titan® (Fujifilm Sonosite Inc. USA) con transductor transrectal. Siguiendo el protocolo de rutina, los pacientes recibieron profilaxis antibiótica por vía oral con 500 mg diarios de Ciprofloxacina durante diez días, empezando tres días antes del procedimiento, hasta siete días después del mismo, el agente anestésico usado fue lidocaína tópica. A los pacientes sin lesiones hipo-ecoicas en el tejido prostático se

les tomaron biopsias prostáticas por octantes, y a los que presentaron lesiones hipoeoicas en el tejido prostático se les tomaron biopsias prostáticas adicionales sitio-especificas. En general fueron tomados entre ocho y doce cilindros de tejido prostático de aproximadamente un centímetro de longitud de la zona periférica de la glándula y de los nódulos sospechosos.

A cada paciente participante sometido a biopsia transrectal guiada por ultrasonido se le tomó una muestra de tejido prostático para análisis de expresión génica. Una biopsia en espejo de los nódulos sospechosos fue tomada en los casos en los que éstos estaban presentes, y en caso contrario la biopsia fue tomada en espejo de una de las zonas previamente biopsiadas de la zona periférica. Para preservar la integridad del RNA, los especímenes de biopsia de tejido prostático fueron colocados inmediatamente en RNAlater® (Life Technologies) en la sala de procedimientos, almacenados toda la noche a 4°C y luego congelados a -80°C hasta su procesamiento.

Las muestras de biopsia fueron fijadas en formalina al 10%, procesadas y sometidas a coloración histológica con H&E de acuerdo con el protocolo de rutina. Los cortes fueron evaluados por un Patólogo del hospital para su respectivo diagnostico histopatológico, los casos de adenocarcinoma fueron categorizados usando el sistema de Gleason. Posteriormente los especímenes de biopsias fueron clasificados en cuatro grupos: tejido prostático benigno (TPB), CaP de bajo grado (Gleason ≤ 6), CaP de grado intermedio (Gleason 7), y CaP de alto grado (Gleason ≥ 8), basado en el respectivo reporte de patología de cada paciente, y adicionalmente confirmado por el estudio histológico de los cilindros de biopsia tomados de la misma zona durante el procedimiento de la biopsia.

Las muestras de tejido prostático para determinación de expresión a nivel de transcritos fueron seleccionadas de grupos homogéneos de pacientes dentro de las mismas cuatro categorías: Tejido prostático benigno, CaP de bajo grado, CaP de grado intermedio y CaP de alto grado. Para lo cual se tuvieron en cuenta además del diagnóstico histopatológico, los siguientes criterios: edad \leq 75 años y para los casos de adenocarcinoma un porcentaje de tumor en la biopsia \geq 60%. Se incluyeron en total 65 muestras de biopsias de próstata, 1 por paciente, formando cuatro grupos así: 24 muestras con tejido prostático benigno, 9 muestras con CaP de bajo grado, 15 con CaP grado intermedio y 17 muestras con CaP de alto grado.

5.1.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA el tejido prostático fue descongelado a temperatura ambiente, se removió el exceso de RNAlater[®] y las muestras fueron sumergidas en forma inmediata en 700 μ L de solución de lisis (TRI-Reagent; Ambion[®]), y homogenizadas con un TissueRuptor[®] (Qiagen, USA) a máxima velocidad durante 1.30 min, luego, se adicionaron 300 μ L de Tri Reagent y se homogenizó suavemente por 30 segundos. Luego, con el tejido completamente homogenizado, se procedió a centrifugar la suspensión a 12.000 g durante 1 min a 4°C. Finalmente, todo el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo (1.5 ml) y se dejó en reposo por 5 minutos a temperatura ambiente. Al finalizar este tiempo, se le agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitó vigorosamente por 15 segundos, para dejarlo en reposo por 2-15 minutos a temperatura ambiente. La mezcla resultante fue centrifugada a 12.000 g por 15 minutos a 4.0 °C. Con la centrifugación, se obtuvo la fase acuosa superior incolora (conteniendo el RNA), la cual fue transferida a un tubo de 1.5 mL, para luego adicionarle 500 μ L de isopropanol,

se dejó en reposo por 5-10 minutos a temperatura ambiente y nuevamente se centrifugó a 12.000 g por 10 minutos a 4.0 °C. El RNA precipitado en el fondo del tubo se dejó secar al aire sobre papel absorbente por 5-10 minutos, y, finalmente, el RNA total fue re-suspendido en 50 µL de agua libre de RNasa, llevado a calentamiento en baño serológico por 5 min a 65 °C y almacenado a -80 °C, hasta su posterior utilización. La concentración y pureza del RNA total fueron medidas por espectrofotometría calculando el cociente entre las absorbancias a 260/280 nm, usando Nanodrop® (Thermo Scientific, Wilmington, DE).

5.1.4 Síntesis de cDNA

La reacción se llevó a cabo en dos etapas: primero la eliminación del DNA genómico y luego la reacción de transcripción reversa. Para eliminar cualquier contaminación de DNA genómico, 1 µg de RNA total fue incubado con Genomic DNA Wipeout Buffer® (Qiagen) por 2 minutos a 42°C, luego fue sometido a transcripción reversa en cDNA en un volumen de reacción de 20 µL, usando el estuche comercial QuantiTect Reverse Transcription® (Qiagen®) que contiene una mezcla de cebadores oligo-dT y cebadores aleatorios. Las muestras fueron incubadas a 42°C por 15 minutos, seguidas de inactivación a 95°C por 3 minutos y almacenadas a -20°C.

5.1.5 PCR cuantitativa en tiempo real

Inicialmente se llevó a cabo el análisis de la expresión génica a nivel de transcritos del grupo de genes con expresión diferencial en las líneas celulares.

Se realizó en grupos de cinco muestras de TPB, cinco muestras de tejido con CaP de bajo grado, y cinco muestras con CaP de alto grado. El cDNA fue usado para el análisis de expresión, mediante RT-qPCR, utilizando cebadores previamente diseñados para los

genes: KBTBD10, Sialophorin (SPN), CD24, Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (F2RL1), Thymosin beta 4, X-linked (TMSB4X), Synuclein gamma (breast cancer-specific protein 1) (SNCG), Caveolin 1 (CAV1), CXXC5, Forkhead box Q1 (FOXQ1), CD81, y para dos genes “housekeeping”: β -actina e Hipoxantina-guaninfosforibosiltransferasa (HPRT) (Tabla 5).

Las reacciones de RT-qPCR para cada muestra fueron realizadas en duplicado en platos de 48-pozos ópticos (Applied Biosystems®), en un termociclador StepOne® (Applied Biosystems®), usando el estuche comercial QuantiTect® SYBR® Green PCR Master Mix (Qiagen®). Para cada ensayo las mezclas de reacción fueron preparadas en hielo, conteniendo 1.5 μ L de cDNA, 10 μ L de QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix® (2X) (Qiagen® USA), 1 μ L de los correspondientes cebadores forward y reverse (0.25 μ M), y agua pura hasta un volumen final de 20 μ L. Las condiciones de corrida incluyeron un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 15 min (activación de la HotStarTaq DNA Polimerasa), seguido de 45 ciclos de amplificación a 94 °C por 15 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30s. Se incluyeron controles negativos (control sin muestra y control negativo de la transcriptasa reversa). Se realizaron curvas de fusión finales para determinar la especificidad de la amplificación.

5.1.1 Análisis de expresión génica a nivel de transcritos del grupo de genes, en tejido prostático benigno y adenocarcinoma

La cuantificación de la expresión relativa de mRNA del grupo de genes fue calculada con el software Sequence Detection System 2.1® (Applied Biosystems®), usando el método comparativo CT ($2^{-\Delta\Delta CT}$).

Tabla 5. Secuencias de cebadores usados en el estudio

GEN SÍMBOLO OFICIAL	CEBADOR (FORWARD/REVERSE)	TAMAÑO AMPLICÓN (PB)
B-ACT	AGAAAATCTGGCACCACACC	142
	GGGGTGTGAAGGTCTCAA	
HPRT1	GACCAGTCAACAGGGGACAT	132
	CCTGACCAAGGAAAGCAAAG	
FMOD	ACCGTCCCCGATAGCTACTT	145
	GCAGCTGGTTGTAGGAGAGG	
CXXC5	GGTGGACAAAAGCAACCCTA	140
	TCAGCATCTCTGTGGACTGC	
FOXQ1	TGCTATTGACCGATGCTTCA	154
	GCCCAAGGAGACCACAGTTA	
CD81	TGACCACCTCAGTGCTCAAG	157
	ATCATGATCACAGCGACCAC	
SPN	GCAACCAGTCATCCTGCTGTTC	107
	CTGGTCCTACTGGAGGTTTCTG	
CAV1	GAGCTGAGCGAGAAGCAAGT	152
	CAAATGCCGTCAAACACTGTG	
KBTBD10	TGCACTGGCTGAGCAGATTCCC	152
	CCTGGCTGAAGGCAGAGGTGGA	
CD24	GCCAGTCTCTTCGTGGTCTC	142
	CCTGTTTTTCCTTGCCACAT	
F2RL1	ATTCCTGCCCTGAACATCAC	140
	AGCACATAGGCAGAGGCTGT	
TMSB4X	TTGAACAGGAGAAGCAAGCA	160
	AGGGGCAGCACAGTCATTTA	
SNCG	TGTGGTGAGCAGCGTCAACACT	162
	TTGGATGCCTCACCCCTCCTGTT	

Los niveles de expresión de los genes blanco fueron normalizados a los niveles de expresión de los genes de referencia, β -actina e Hipoxantina-guaninfosforibosil-transferasa (HPRT). Se usó como control interno, y como calibrador, el grupo de muestras seleccionadas de tejido prostático benigno. Los cambios en la expresión génica fueron medidos calculando el valor promedio de las reacciones duplicadas para cada gen, entre los grupos de adenocarcinoma, comparándolos con los valores promedio de las reacciones duplicadas del tejido prostático benigno.

Los valores de “fold-change” fueron calculados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$. Para los fold changes <1 , el resultado inverso negativo fue reportado como disminución en el “fold change”. Los valores p fueron calculados usando la prueba no paramétrica U de Mann Whitney, comparando los “fold-changes” entre el grupo con CaP en relación con el grupo con TPB, y entre los grupos con CaP de bajo grado, grado intermedio y CaP de alto grado en relación con el grupo con TPB. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism[®] v5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA), y un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

5.1.2 Análisis de expresión génica a nivel de transcritos de CXXC5, en tejido prostático benigno y adenocarcinoma

Tomando como base los resultados obtenidos del análisis de expresión génica a nivel de transcritos del grupo de genes, se seleccionó el gen CXXC5 para continuar su análisis de expresión entre TPB y CaP.

A partir de los cDNA obtenidos del total de 65 muestras de tejido prostático, que incluyeron 24 biopsias con TPB y 41 biopsias con CaP: 9 biopsias con CaP de bajo grado

15 con CaP de grado intermedio y 17 con CaP de alto grado, respectivamente, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica a nivel de transcritos del gen CXXC5, mediante RT-qPCR, utilizando cebadores previamente diseñados para CXXC5 (Tabla 5). Las reacciones de RT-qPCR para análisis de expresión de CXXC5 en cada muestra fueron realizadas en las mismas condiciones descritas para las reacciones de RT-qPCR para análisis de expresión del grupo inicial de genes.

La cuantificación relativa de la expresión de mRNA para CXXC5 fue calculada con el software Sequence Detection System 2.1 (Applied Biosystems), usando el método comparativo Ct ($2^{-\Delta\Delta CT}$). Los niveles de expresión para CXXC5 fueron normalizados a los niveles de expresión de los genes de referencia, β -actina e Hipoxantina-guaninfosforibosil-transferasa (HPRT). Los valores p fueron calculados usando la prueba estadística no paramétrica Mann Whitney comparando los “fold-changes” entre el grupo con CaP en relación con el grupo con TPB, y entre los grupos con CaP de bajo grado, grado intermedio y CaP de alto grado. El análisis estadístico y las gráficas se realizaron con el software GraphPad Prism® v5.0 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA), y un valor $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Análisis de expresión a nivel de transcritos en TPB y CaP, del grupo de genes expresado diferencialmente en las líneas celulares de CaP

Inicialmente se llevó a cabo el análisis de la expresión génica a nivel de transcritos en TPB y CaP, del grupo de genes con expresión diferencial en las líneas celulares.

Se realizó mediante RT-qPCR, utilizando cebadores previamente diseñados para los genes: kelch-like family member 41 (*KBTBD10*), Sialophorin (*SPN*), *CD24*, Coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1 (*F2RL1*), Thymosin beta 4, X-linked (*TMSB4X*), Synuclein gamma (breast cancer-specific protein 1) (*SNCG*), Caveolin 1 (*CAV1*), *CXXC5*, Forkhead box Q1 (*FOXQ1*), *CD81*, y para dos genes “housekeeping”: β -actina e Hipoxantina-guaninfosforibosiltransferasa (*HPRT*), en grupos de cinco muestras de TPB, cinco muestras de tejido con CaP de bajo grado, y cinco muestras con CaP de alto grado.

5.2.2 Expresión de CXXC5 a nivel de transcritos en biopsias de próstata con tejido prostático benigno y adenocarcinoma de próstata

Los resultados del estudio previo de nuestro grupo comparando la expresión entre líneas celulares de CaP y línea celular epitelial prostática no tumoral, reportaron niveles medios de expresión de CXXC5 significativamente más bajos en la línea celular no tumoral PWR-1E en comparación con las líneas celulares de CaP: LNCaP (Fold change: 10.479, $p=0.001$), y PC3 (Fold change: 2.806, $p = 0.014$)(20).

Para caracterizar la expresión del gen CXXC5 en tejido prostático benigno y con CaP, se estudió, mediante RT-qPCR, la expresión de mRNA de CXXC5 en biopsias de pacientes diagnosticadas como TPB, o como CaP.

Su expresión fue evaluada en un total of 65 muestras de tejido prostático, compuestas por 24 biopsias con TPB, y 41 biopsias con CaP que incluyeron: 9 biopsias con CaP de bajo grado, 15 biopsias con CaP de grado intermedio y 17 biopsias con CaP de alto grado, respectivamente.

Los niveles de expresión de CXXC5 fueron significativamente más altos en las biopsias con CaP en general, comparadas con las biopsias con TPB ($p=0.036$, U Mann-Whitney).

Cuando se agruparon las biopsias de próstata en TPB, CaP de bajo grado, CaP de grado intermedio, y CaP de alto grado, los niveles de expresión de CXXC5 fueron significativamente más altos en el grupo de muestras con CaP de bajo grado en relación con el grupo de biopsias con TPB ($p = 0.037$; U Mann-Whitney). De modo que el gen CXXC5 fue expresado en forma diferencial a nivel de transcritos en las biopsias con CaP comparado con las biopsias con TPB, y en las biopsias con CaP de bajo grado en comparación con las biopsias con TPB. (Tabla 6 A; Figura 8). También hubo una tendencia a mayor expresión de CXXC5 en las biopsias con CaP de grado intermedio y de alto grado comparadas con las biopsias con TPB, sin embargo, la diferencia no alcanzó un nivel de significancia estadística, tal vez debido a heterogeneidad en la expresión de CXXC5 en estas muestras. No hubo una diferencia significativa en la expresión de CXXC5 ($p=0.488$, prueba ANOVA), entre los diferentes grados de tumor clasificados de acuerdo al sistema de Gleason (Tabla 6 B, Figura 8).

Tabla 6. Perfil de expresión de transcritos de CXXC5 en biopsias de tejido prostático.

A. Niveles de transcritos en especímenes de biopsia de pacientes con TPB y pacientes con CaP comparados por el método Ct. La diferencia de expresión de CXXC5 se determinó por comparación con los niveles de expresión del gen constitutivo β -actina en cada grupo de pacientes.

Grupo de casos	CT medio (DE) del gen blanco y del gen constitutivo		Fold change (Media)	
	CXXC5	B-actina	CXXC5	p
BPT (24)	29,16 (\pm 2.09)	22,95(\pm 2.03)	2,34	
CaP (41)	27,42 (\pm 2.16)	22,57 (\pm 2.64)	7,99	0,036*

*valor p de prueba Mann Whitney entre CaP y TPB

B. Niveles de transcritos en especímenes de biopsia de pacientes con TPB y pacientes con CaP de grado bajo, intermedio y alto, comparados por el método Ct. La diferencia de expresión de CXXC5 se determinó por comparación con los niveles de expresión del gen constitutivo β -actina en cada grupo de pacientes.

Grupo de casos	CT medio (DE) del gen blanco y del gen constitutivo		Fold change (Media)	
	CXXC5	B-actina	CXXC5	p
BPT (24)	29,16 (\pm 2.09)	22,95(\pm 2.03)	2,3	
CaP de bajo grado (9)	27,47 (\pm 1.99)	22,97 (\pm 2.38)	9,2	0,037*
CaP grado intermedio (15)	26.96 (\pm 2.52)	22,23 (\pm 2.45)	6,7	0,153**
CaP de altjo grado (17)	27,79 (\pm 1.93)	22,66 (\pm 3.02)	9,2	0,128***

La diferencia de expresión de CXXC5 se determinó por comparación con los niveles de expresión del gen constitutivo B-actina en cada grupo de pacientes

*valor p de prueba Mann Whitney entre CaP de bajo grado y TPB. **valor p de prueba Mann Whitney entre CaP grado intermedio y TPB. ***valor p de prueba Mann Whitney entre CaP de alto grado y TPB.

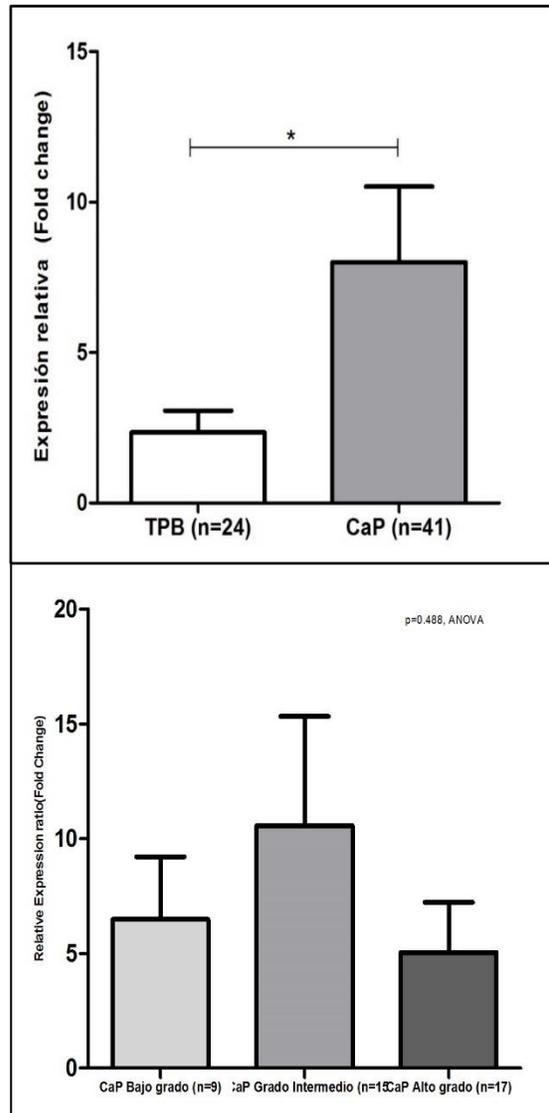


Figura 8. Niveles de transcritos de CXXC5 en tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático. Los niveles de transcritos de CXXC5 fueron cuantificados por RT-qPCR en tejido prostático de biopsias diagnosticadas como Tejido prostático benigno (n = 24), CaP (n=41), CaP de bajo grado (n = 9), CaP de grado intermedio (n=15) y CaP de alto grado (n=17). El “fold change” positivo indica sobreexpresión de transcritos de CXXC5 con relación al gen constitutivo en cada grupo de pacientes. Valor p, Arriba:0.036, U Mann-Whitney, abajo: 0.488 ANOVA)

6. EVALUACIÓN MEDIANTE INMUNOHISTOQUÍMICA, E HIBRIDACIÓN CROMOGENICA *IN SITU*, DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES CXXC5 Y FMOD, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DE ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA, EN TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y CON ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO.

6.1 MATERIALES Y METODOS

Para ampliar el estudio de la expresión del gen CXXC5 en CaP y en las diferentes lesiones precursoras del mismo, se determinó su presencia a nivel de transcritos, mediante CISH, y a nivel de proteína, mediante IHQ, en muestras clínicas de tejido prostático FFPE. Del mismo modo se amplió el estudio de la expresión del gen FMOD, cuya expresión a nivel de mRNA en líneas celulares y en biopsias de tejido prostático ha sido estudiada previamente por el grupo de investigación (24).

6.1.1 Muestras

La expresión génica a nivel de proteína mediante IHQ, se investigó inicialmente en tejidos FFPE de especímenes de prostatectomía radical y resección transuretral de la próstata (RTU), de un grupo de 62 pacientes con diagnóstico de CaP (n = 50) o HPB (n = 12), y un rango de edad entre 50 y 81 años (media= 69.5 años). Los bloques de tejido fueron obtenidos de los archivos del Departamento de Patología del Hospital Universitario del Caribe, Cartagena, Colombia, de pacientes con diagnóstico de CaP localizado, o con HPB, quienes fueron sometidos a resección quirúrgica como tratamiento inicial. Todo el material fue recolectado en forma anónima y los datos igualmente analizados anónimamente.

Los cortes de estos tejidos coloreados con H&E fueron examinados para determinar la presencia de TPB, PIA, HGPIN, y CaP. Los tejidos con adenocarcinoma fueron clasificados de acuerdo con la escala de Gleason (60, 64). La presencia de PIA en sus dos formas: atrofia simple (SA), e hiperplasia post-atr6fica (PAH), fue evaluada de acuerdo a las definiciones morfol6gicas establecidas por el "Working Group Classification of Focal Prostate Atrophy Lesions"(95). Se identific6 la presencia de HGPIN usando los criterios definidos por Bostwick *et.al.* (84).

Un grupo de muestras de tejidos de espec6menes de prostatectom6a que presentaban en forma simult6nea TPB, PIA, HGPIN, y CaP, fue seleccionado para la evaluaci6n de la expresi6n proteica de CXXC5 y fibromodulina a trav6s de las lesiones postuladas en la progresi6n del CaP.

6.1.2 Procedimiento de IHQ para detecci6n de expresi6n de fibromodulina

A los bloques de tejido prost6tico se les tomaron cortes seriados que fueron sometidos a t6cnica de IHQ, usando anticuerpos dirigidos contra la prote6na fibromodulina para determinar su expresi6n en TPB, PIA, HGPIN, y CaP.

Los cortes seriados de 4 μ m de espesor del tejido prost6tico montados en l6minas Superfrost Plus adhesi6n[®] (Lomb Scientific, Sydney, Australia), y calentados en horno convencional a 60°C por 45 minutos, fueron desparafinizados en xilol y rehidratados en alcohol de acuerdo con los procedimientos de rutina. Fueron colocados en olla de Pascal inmersos en buffer citrato 10mM (pH 6.0) durante 30 minutos para recuperaci6n antig6nica. Posteriormente fueron incubados con el anticuerpo policlonal, anti-Fibromodulin rabbit/IgG, (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), a una diluci6n de 1:100, por 3 horas, a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario, Ultravision ONE

HRP polymer[®] (ThermoFisher Scientific, Rockford, IL, USA), fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la unión del mismo fue detectada usando DAB Plus Chromogen[®] (3-3'-diamino-benzidine) (Ultravision ONE Detection System[®] Kit, Thermo Scientific, Fremont, CA, USA). Los tejidos fueron contrateñidos con Hematoxilina, deshidratados y montados. En cada ensayo se incluyó un corte de tejido prostático como control negativo que fue incubado sin el anticuerpo primario, y un corte de tejido cerebral como control positivo, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

6.1.3 Procedimiento de IHQ para detección de expresión de CXXC5

A los bloques de tejido prostático se les tomaron cortes seriados que fueron sometidos a técnica de IHQ, usando anticuerpos dirigidos contra CXXC5 para determinar su expresión en TPB, PIA, HGPIN, y CaP.

La expresión de CXXC5 fue detectada por IHQ en cortes seriados adicionales de 4- μ m de espesor, que fueron montados en láminas Superfrost Plus adhesión[®] (Lomb Scientific, Sydney, Australia) y calentados en horno convencional a 60°C por 45 minutos. Los cortes fueron desparafinizados en xilol y rehidratados en alcohol de acuerdo con los procedimientos de rutina. Fueron colocados en olla de Pascal inmersos en buffer citrato 10mM (pH 6.0) durante 30 minutos para recuperación de los epítopes. Posteriormente fueron incubados en Hydrogen peroxide block y con Protein Block (abcam[®], Cambridge, MA, USA), e incubados con anticuerpo anti-CXXC5 rabbit/IgG, polyclonal, ab133191 (abcam[®], Cambridge, MA, USA) a una dilución de 1:200, a 4°C durante toda la noche. Fue usado el estuche comercial EXPOSE Mouse and Rabbit Specific HRP/DAB Detection IHC[®] (abcam[®], Cambridge, MA, USA) que usa DAB (3-3'-diamino-benzidine), para detectar la unión del anticuerpo, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Los tejidos fueron contrateñidos con Hematoxilina, deshidratados y montados. En cada ensayo se incluyó un corte de tejido prostático como control negativo que fue incubado sin el anticuerpo primario, y un corte de tejido pancreático como control positivo, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

6.1.4 Evaluación de IHQ en cortes de tejido prostático

Los cortes de tejido teñidos con cada anticuerpo fueron evaluados con microscopio óptico Nikon Eclipse 400[®] conectado a cámara digital Nikon DS-Fi1[®] (Nikon, Japón), las imágenes fueron analizadas y capturadas con magnificación final de 40X, 100X y 400X, usando el software NIS-Elements-3.0[®] (Nikon, Japón), determinando un valor individual para cada anticuerpo utilizado, en cada una de las lesiones estudiadas.

La intensidad de la tinción fue evaluada por separado en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y adenocarcinoma, usando el H-Score (histo-score), que toma en consideración la intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas, obteniendo valores entre 0 y 300: Fueron elegidos al azar 10 campos microscópicos a magnificación de 100X, la intensidad de la tinción en las células epiteliales lumbinales benignas y las células tumorales fue graduada como 0, 1, 2, o 3, correspondientes a tinción negativa, leve, moderada, y fuerte respectivamente. Fueron contadas el número total de células en cada campo y el número de células teñidas en cada nivel de intensidad de tinción. Se calculó el porcentaje promedio de células positivas, y se aplicó la siguiente fórmula: H-score = (% de células teñidas en categoría 1 x 1) + (% de células teñidas en categoría 2 x 2) + (% de células teñidas en categoría 3 x 3) (231).

Los valores de H-score obtenidos en tejido prostático benigno y adenocarcinoma fueron comparados entre sí por medio de prueba t y pruebas no paramétricas. Los valores de

H-score obtenidos en el TPB, PIA, HGPIN y CaP fueron comparados usando la prueba ANOVA y pruebas no paramétricas. Los niveles de expresión de CXXC5 y fibromodulina fueron también comparados entre los casos con CaP de bajo grado, grado intermedio y de alto grado, usando prueba t, ANOVA y pruebas no paramétricas, todas mediante el software GraphPad Prisma® v 5.00 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Se consideró un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

6.1.5 Diseño y construcción de microarreglo de tejido prostático (TMA, Tissue Microarray)

Para validar la expresión de CXXC5 y fibromodulina, se evaluó su expresión *in situ* a nivel de transcritos, y a nivel de proteína, en una cohorte independiente de pacientes (n=47), mediante un microarreglo de tejido prostático. En la construcción del TMA se usaron tejidos FFPE de especímenes de prostatectomía radical, RTU y prostatectomía transvesical, obtenidos del archivo del Departamento de Patología del Hospital Universitario del Caribe, de pacientes con diagnóstico de HPB y CaP quienes fueron sometidos a procedimiento quirúrgico, sin tratamientos previos.

El diseño y fabricación del TMA se hizo usando el programa TMAJ® en el laboratorio De Marzo Lab., en el Sidney Kimmel Cancer Comprehensive Center, Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA).

Para comprobar la antigenicidad de los tejidos escogidos se llevó a cabo inicialmente tinción de IHQ con el anticuerpo Ki67: Los cortes seriados de 4 μm de espesor del tejido prostático montados en láminas Superfrost Plus adhesión® (Lomb Scientific, Sydney, Australia), y calentados a 60°C por 15 minutos, fueron desparafinizados en xilol y rehidratados en alcohol de acuerdo con los procedimientos de rutina. Fueron colocados

en vapor inmersos en buffer citrato 10mM (pH 6.0) durante 45 minutos para recuperación antigénica. Posteriormente fueron incubados con un anticuerpo monoclonal Ki67 Mouse (ZYMED®), a una dilución de 1:4000, durante toda la noche, a temperatura de 4°C. Tras lo cual el anticuerpo secundario, Poly-HRP anti-Mouse IgG® fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la unión del mismo fue detectada usando DAB Plus Chromogen® (3-3'-diamino-benzidina).

Para detectar la expresión de p27 se llevó a cabo procedimiento similar de IHQ: Los cortes seriados de 4 um de espesor del tejido prostático montados en láminas Superfrost Plus adhesión® (Lomb Scientific, Sydney, Australia), y calentados a 60°C por 15 minutos. Fueron desparafinizados en xilol y rehidratados en alcohol de acuerdo con los procedimientos de rutina. Fueron colocados en vapor inmersos en buffer citrato 10 mM (pH 6.0) durante 25 minutos para recuperación antigénica. Posteriormente fueron incubados con un anticuerpo monoclonal p27 BD/Transduction -20®, a una dilución de 1:1000, durante 45 minutos, a temperatura ambiente. Tras lo cual el anticuerpo secundario, Poly-HRP anti-Mouse IgG® fue incubado durante 30 minutos a temperatura ambiente, y la unión del mismo fue detectada usando DAB Plus Chromogen® (3-3'-diamino-benzidina). Todos los tejidos fueron contrateñidos con Hematoxilina, deshidratados, y montados. Los controles negativos fueron incubados sin anticuerpo primario. Los controles positivos fueron incluidos para cada anticuerpo de acuerdo con las recomendaciones del fabricante.

Los tejidos mostraron tinción fuertemente positiva para p27 y para Ki67 en las células en proliferación, con lo cual se confirmó su antigenicidad y se continuó con el diseño y la elaboración del TMA (Figuras 9,10).

Una vez seleccionados los casos, se realizó una revisión patológica de los cortes coloreados con H&E de los bloques donantes, para determinar la presencia de las lesiones de interés, seleccionando áreas representativas de cada lesión. Para cada caso se utilizaron hasta cinco cilindros de tejido de 0.6 mm de diámetro conteniendo CaP, HGPIN, PIA o TPB, éste último fue seleccionado de áreas distantes por más de 3 mm de las zonas con las lesiones de interés. Las áreas seleccionadas fueron extraídas de cada bloque donante para la construcción del TMA, de acuerdo con la técnica descrita previamente (232), hasta terminar la construcción del bloque con el TMA (Figura 11).

Posteriormente, se tomaron cortes de 4 μ m del bloque del TMA. Un corte inicial fue coloreado con H&E, usado para verificar cada cilindro de tejido de acuerdo con el diseño previo realizado en el software TMAJ[®]. Todo el proceso fue llevado a cabo en el Johns Hopkins University Oncology Tissue Services Core, Regional Oncology Research Center, (Baltimore, MD, USA). La tabla 7 muestra el número de cilindros de tejido por cada lesión incluidos en el TMA.

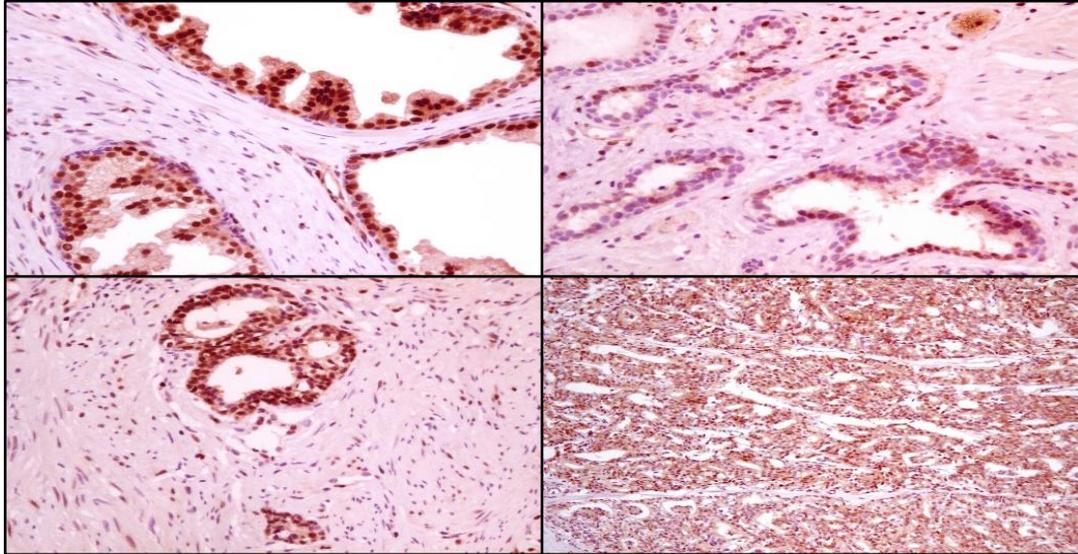


Figura 9. Tinción positiva para p27 en TPB y CaP. Los especímenes de tejido prostático seleccionados para elaboración del TMA fueron sometidos previamente a IHQ con p27 para comprobar su antigenicidad, IHQ, 100X. (Fotografías tomadas en Johns Hopkins University, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Baltimore, MD, USA).

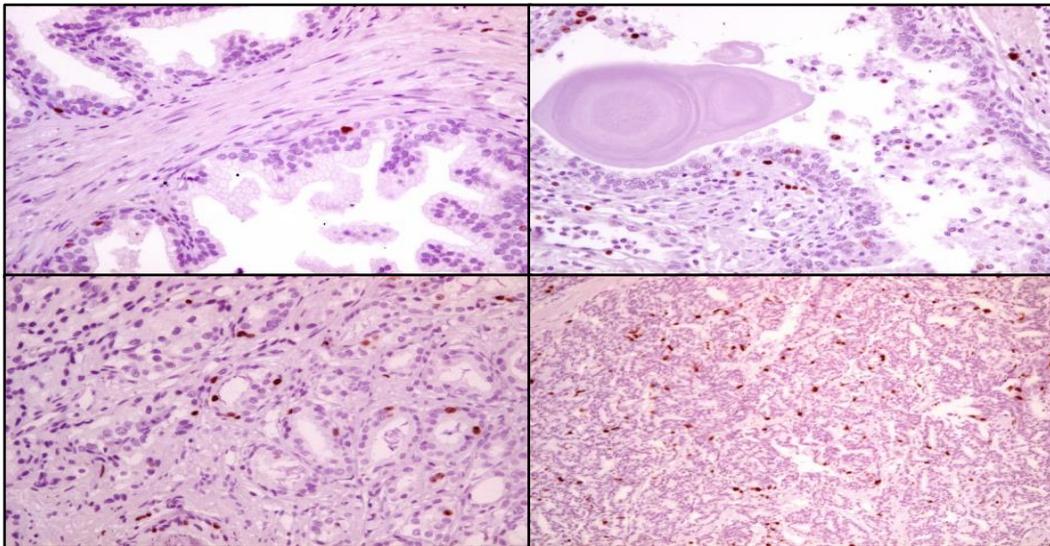


Figura 10. Tinción positiva para Ki67 en TPB y CaP. Los especímenes de tejido prostático seleccionados para elaboración del TMA fueron sometidos previamente a IHQ con Ki67 para comprobar su antigenicidad, IHQ, 100X. ((Fotografías tomadas en Johns Hopkins University, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, Baltimore, MD, USA).

Tabla 7. Número de cilindros por cada lesión, representados en el TMA

Tejido/Lesion	Número de cilindros
TPB	78
PIA	102
HGPIN	58
CaP	143

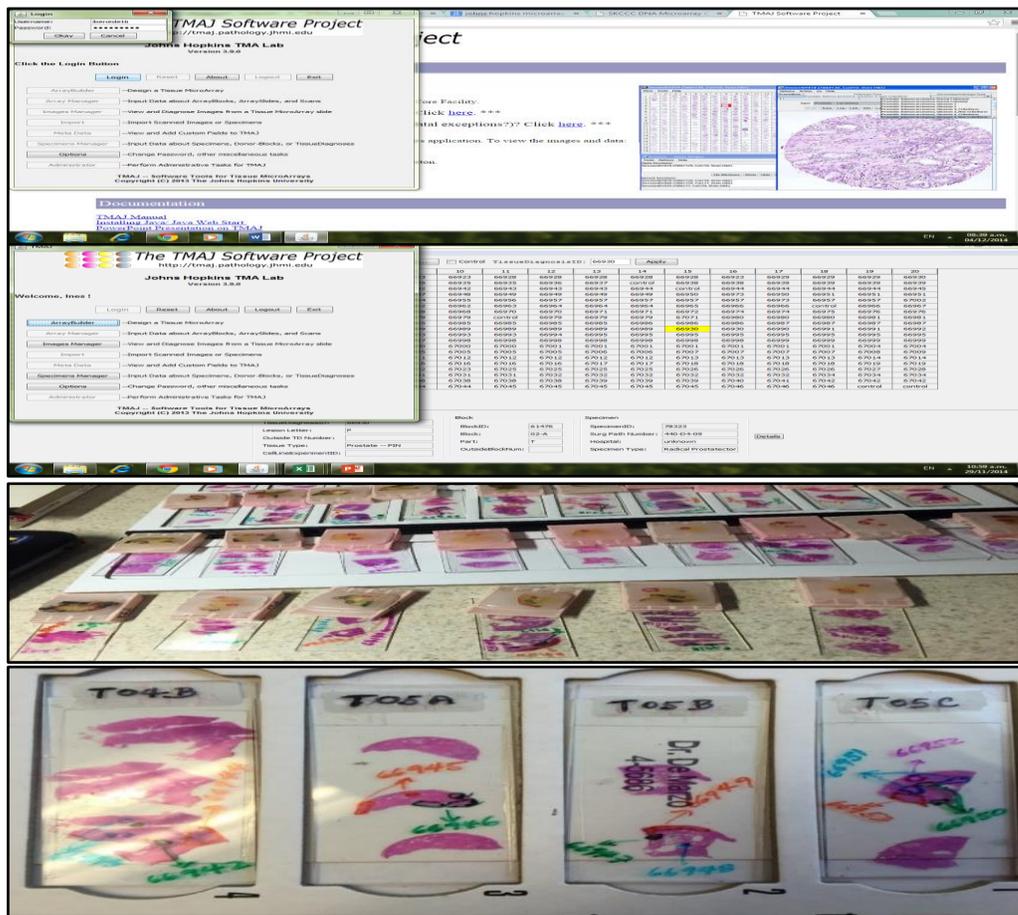


Figura 11, Evaluación de los cortes de tejido de los bloques de tejido prostático y diseño del TMA Los cortes histológicos de los bloques de tejido prostático FFPE seleccionados fueron evaluados y demarcados con las áreas a incluir. El TMA fue diseñado usando el programa TMAJ, del Departamento de Patología de Johns Hopkins University (Baltimore, MD, USA).

6.1.6 Procesamiento del TMA para estudio de expresión *in situ* de mRNA de CXXC5 y FMOD por hibridación cromogénica *in situ* (CISH)

Para evaluar la expresión de mRNA de los dos genes en estudio (CXXC5 y FMOD) en las muestras de tejido prostático humano incluidas en el TMA, se llevaron a cabo ensayos de hibridación cromogénica *in situ* (CISH, del inglés: Chromogenic In Situ Hybridization), usando RNAscope 2.5 HD Brown ISH®, en el TMA de tejido prostático. Los ensayos se llevaron a cabo a través de un servicio técnico realizado en el laboratorio de Advanced Cell Diagnostics (ACD, Hayward, CA, USA).

Se usaron las condiciones estándar del protocolo del ensayo RNAscope 2.5 HD Brown® con las siguientes condiciones pretratamiento: Recuperación de blancos: 15 minutos a 95°C. Proteasa Plus: 30 minutos a 40°C. Los cortes del TMA de 5 micras de espesor fueron desparafinizados en xylol, seguidos por deshidratación en una serie de etanol. Las láminas fueron incubadas en buffer citrato (10 nmol/L, pH 6), mantenidas a temperatura de 100°C a 103°C usando un plato caliente durante 15 minutos, enjuagadas en agua desionizada; e inmediatamente tratadas con 10 ug/mL de proteasa (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO) a 40°C, durante 30 minutos, en un horno de hibridación HybEZ® (Advanced Cell Diagnostics, Hayward, CA). La hibridación con las sondas diana, el preamplificador, el amplificador, la sonda marcada, y la detección cromogénica, fueron hechas secuencialmente a 40°C, con las siguientes soluciones: sonda diana en buffer de hibridación A, por 3 horas; preamplificador en buffer de hibridación B, por 30 minutos; amplificador en buffer de hibridación B a 40°C, por 15 minutos; y sonda marcada en buffer de hibridación C, por 15 minutos. Después de cada paso de hibridación las láminas

fueron lavadas tres veces con buffer de lavado a temperatura ambiente. Se realizó la detección cromogénica usando DAB seguido por contratinción con hematoxilina.

Para asegurar que los ensayos fuesen interpretables, se realizaron ensayos paralelos con controles positivos y negativos. Se usó el gen endógeno constitutivo Hs-PPIB (Human Peptidylprolyl Isomerase B) como control positivo para evaluar tanto la calidad e integridad del RNA de los tejidos, como el procedimiento del ensayo. Se consideró adecuada una tinción positiva con señales fácilmente visibles bajo microscopio con lente objetivo 10X. El gen bacteriano dapB (dihydrodipicolinate reductase) se usó como control negativo para medir la señal de fondo. Para determinar que la tinción fue satisfactoria se comparó la expresión de los genes diana con los controles negativo (dapB) y positivo (PPIB).

En los ensayos fueron corridas cuatro láminas del TMA de tejido prostático: una para cada gen diana (CXXC5, FMOD), una para el control positivo: Hs-PPIB, y una para el control negativo: gen bacteriano dapB. Se llevó a cabo optimización para establecer la mejor relación señal-ruído.

6.1.7 Evaluación de CISH de CXXC5 y FMOD en TMA de tejido prostático

RNAscope detecta moléculas individuales de RNA, que aparecen como puntos delimitados. Los datos de la tinción fueron registrados de acuerdo con la presencia y cantidad de la tinción punteada a nivel nuclear y citoplasmático, y de acuerdo con la intensidad de la señal.

El puntaje fue determinado contando el número de puntos por célula, el cual se correlaciona con el número de copias de mRNA. Para evaluar los resultados de la tinción se usó un método semi-cuantitativo. El conteo se realizó a un aumento de 100X en un

microscopio Eclipse 400, conectado a una cámara DS-Fi1 con el software NIS-Elements-3.01 (Nikon[®], Japón). Se contó el número de puntos por célula en diferentes campos de tejido prostático benigno, con PIA, con HGPIN y en áreas de tumor. Los parámetros usados fueron 0: Ausencia de tinción o <1 punto/10 células. 1: 1-3 puntos/célula, 2: 4-9 puntos/célula, ningún o muy pocos agregados de puntos, 3: 10-15 puntos/célula y <10% puntos formando agregados, 4: >15 puntos/célula y >10% de los puntos formando agregados. Si <5% de las células tenía un puntaje 1 y >95% de las células tenía puntaje de 0, se asignó un puntaje de 0. Si 5-30% de las células tenían puntaje 1 y >70% de las células tenían puntaje 0, se asignó un puntaje de 0.5.

6.1.8 Evaluación de IHQ de CXXC5 y Fibromodulina en TMA de tejido prostático

Se usaron cortes de 4 μ m del bloque del TMA para determinar por IHQ, la expresión de las proteínas CXXC5 y fibromodulina en las muestras de CaP, HGPIN, PIA, y en tejido prostático benigno, incluidas en el TMA. Para esto se siguió el mismo protocolo usado para la IHQ de los bloques de tejido.

Los niveles de expresión en el TMA fueron determinados en la misma forma descrita, la inmunotinción fue medida por evaluación microscópica del porcentaje de células epiteliales lumbinales en cada lesión, obteniendo un H-score para cada lesión de cada caso representado en el TMA. Los valores del H-score se compararon entre los grupos usando prueba t, prueba ANOVA, y pruebas no paramétricas, usando el software GraphPad Prisma[®] v5.00 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Se consideró un valor $p < 0.05$ como estadísticamente significativo.

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Expresión de CXXC5 a nivel de proteína en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP

La expresión de la proteína CXXC5 en el adenocarcinoma prostático fue evaluada mediante tinción IHQ. Se determinó inicialmente la expresión en tejidos obtenidos de especímenes de prostatectomía de 62 pacientes (CaP=50, HPB=12) con edades entre 50 y 81 años (Media = 69.5). Dentro de las 50 muestras de CaP, se evaluó la tinción IHQ en 7 CaP de bajo grado, 16 CaP de grado intermedio y 27 CaP de alto grado, los cuales fueron clasificados de acuerdo con el sistema de Gleason.

La expresión de la proteína CXXC5 se encontró aumentada en forma significativa en las células epiteliales cancerosas, comparadas con las células epiteliales benignas (Figura 12A). La tinción para CXXC5 fue débil en el TPB (Figura 12B), pero fue fuerte en el CaP, donde se observó tanto en el citoplasma como en el núcleo de las células tumorales (Figura 12C).

La determinación de la intensidad y extensión de la tinción se hizo usando el método del H-score, obteniendo un valor promedio de H-score de 139.3 (95% CI: 125-153.6), en las células epiteliales lumbinales benignas (de las glándulas benignas presentes tanto en los especímenes con hiperplasia prostática como en los especímenes con cáncer), mientras que este puntaje tuvo un valor promedio de 239.3 (95% CI: 227.3-251.2), en las células tumorales ($p < 0.0001$, prueba t) (Figura 12A). Hubo 30 casos en los que se estudiaron muestras de tejido prostático benigno y tejido tumoral del mismo paciente, para estos casos la intensidad de la inmunotinción fue más fuerte en los acinos malignos que en los acinos benignos, ($p < 0.0001$, $n=30$ prueba t). Mostrando que la expresión de CXXC5

estuvo incrementada en forma significativa en las células del adenocarcinoma, comparadas con las células epiteliales benignas.

Dentro del grupo de casos con cáncer, no se encontró una diferencia significativa ($p=0,481$, prueba ANOVA) en la expresión de CXXC5 entre los de bajo grado (245,6, IC 95%: 225.4 – 265.7, $n = 7$), de grado intermedio (228.7 IC 95%:203.2 – 254.1, $n=16$) y los de alto grado (243.9, IC 95%: 227.1 – 260.7, $n =27$), clasificados de acuerdo con el sistema de Gleason (Figura 13).

Para evaluar el patrón de expresión de CXXC5 a través de las diferentes lesiones prostáticas, la expresión de la proteína fue determinada en 17 casos que, en los bloques de tejido estudiados, presentaban en forma simultánea TPB, PIA, HGPIN y CaP Con una diferencia estadísticamente significativa en la tinción entre las lesiones ($p<0.0001$, prueba Kruskal-Wallis). Se encontró que la expresión de la proteína CXXC5 fue significativamente más alta en CaP (243.4, 95% CI: 222.1-264.6), seguida en orden decreciente por HGPIN (231.5, 95% CI: 207.2-255.9), PIA (169.9, 95% CI: 143.4-196.4), y el epitelio benigno (143.5, 95% CI: 122.1-165), (Figura 14). En el post-test, los puntajes de tinción fueron significativamente diferentes entre las lesiones, excepto entre el epitelio benigno y PIA, y, entre CaP y HGPIN.

Al comparar la expresión IHQ de CXXC5 entre el tejido prostático benigno y las lesiones postuladas en la progresión a cáncer, en todos los bloques de tejido incluidos, también se encontró que fue significativamente más alta en CaP, HGPIN y PIA, que la expresión media en las glándulas normales ($p<0.0001$, prueba Kruskal-Wallis), (Tabla 8).

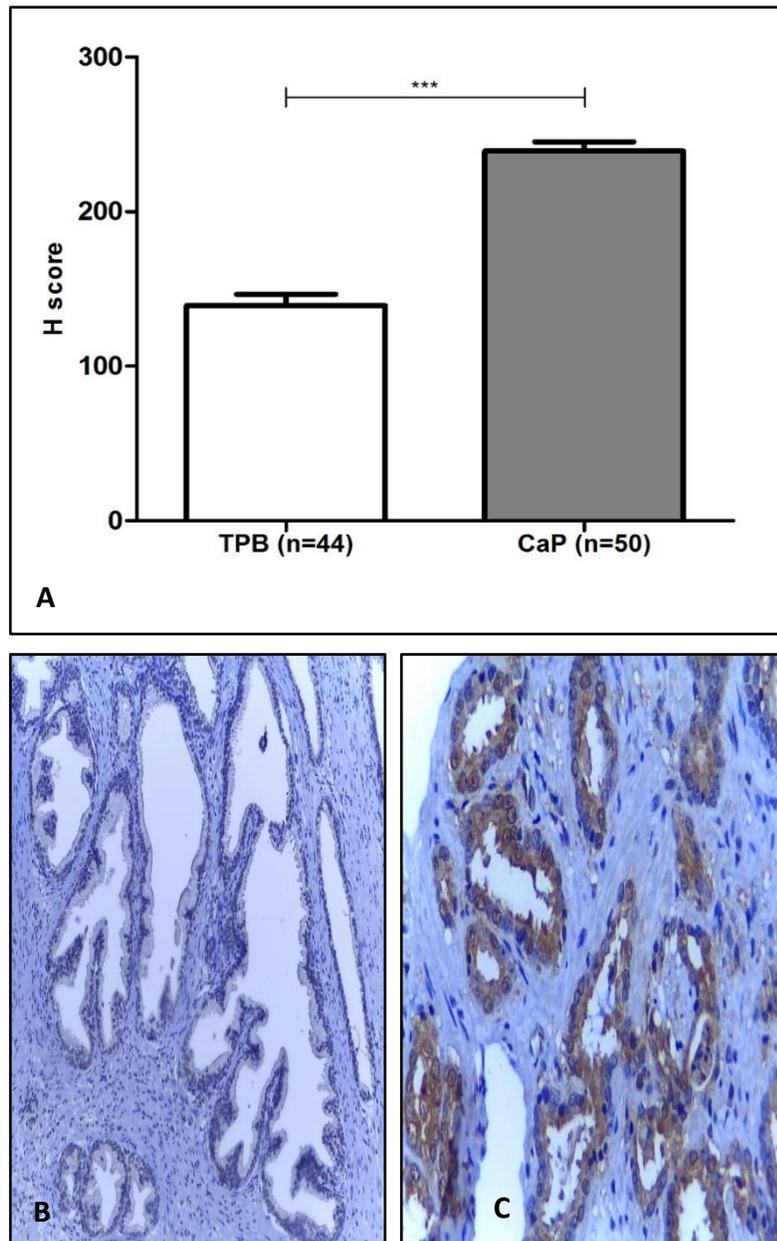


Figura 12. Expresión de proteína CXXC5 en tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático. A. La expresión de CXXC5 fue determinada por IHQ en tejido prostático con glándulas benignas (n=44), y tejido con adenocarcinoma (n=50, (*p: prueba t)). B. IHQ de CXXC5 en tejido prostático benigno con tinción ausente a leve. C. Adenocarcinoma prostático con tinción fuerte, IHQ, 100X. (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

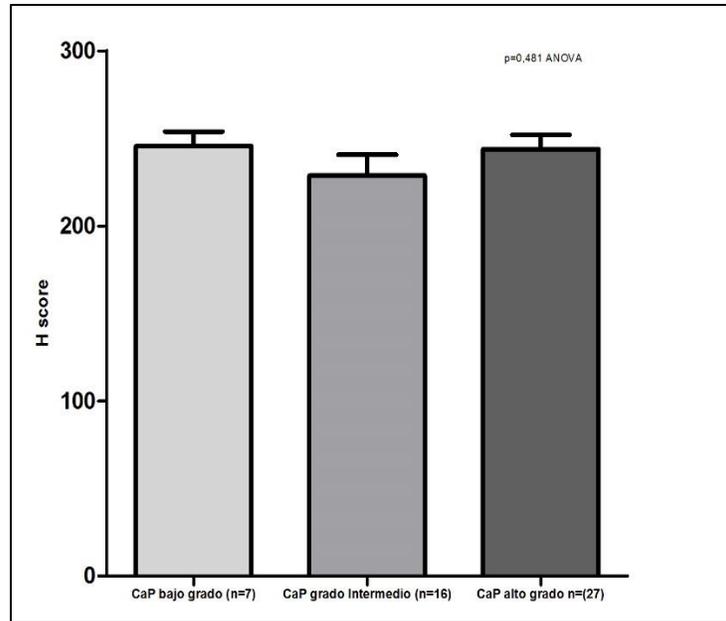


Figura 13. Expresión de proteína CXXC5 en glándulas tumorales de CaP según el grado histológico. La expresión de CXXC5 fue determinada por IHQ en tejido prostático con CaP de bajo, intermedio y alto-grado, sin encontrar diferencia significativa entre los grupos, ($p= 0,481$, prueba ANOVA).

Tabla 8. Niveles de expresión inmunohistoquímica de CXXC5 en las diferentes lesiones, en tejidos FFPE de especímenes de prostatectomía

	H-score, media (DE)				p
	TPB n=44	PIA n=42	HGPIN n=22	CaP n=50	
CXXC5	139,3 (47,03)	181,3 (56,32)	232,5 (47,13)	239,3 (42,01)	<0,0001*

* prueba ANOVA.

6.2.2 Expresión *In Situ* de RNA mensajero de CXXC5 en TMA de tejido prostático

La expresión *in situ* del mRNA de CXXC5 fue evaluada por medio de un ensayo de CISH, (RNAscope® 2.0 FFPE Assay, Advanced Cell Diagnostics, INC., Hayward, CA), en un TMA con 381 cilindros de tejido prostático benigno y con las diferentes lesiones, de 47 especímenes de prostatectomía (Tabla 7).

La calidad del RNA fue variable a lo largo de los cilindros de tejido del TMA, la mayoría de los cilindros mostraron tinción moderada a fuerte del control positivo con muy escasa tinción de fondo. Las condiciones del ensayo pretratamiento estándar de las muestras en este estudio fueron determinadas como óptimas.

La evaluación de la expresión de mRNA de CXXC5 en las lesiones estudiadas en los cilindros de tejido prostático mediante CISH, demostró que, en general su expresión fue mayor en CaP seguida en orden decreciente por HGPIN, PIA y TPB ($p < 0.0001$, prueba ANOVA), con una diferencia significativa en la expresión de mRNA de CXXC5 entre TPB y HGPIN ($p < 0.0001$, prueba t), y, entre TPB y CaP ($p < 0.0001$, prueba t). La diferencia en la expresión no fue significativa entre TPB y PIA ($p = 0.37$, prueba t), ni entre HGPIN y CaP ($p = 0.19$, prueba t), (Figura 15).

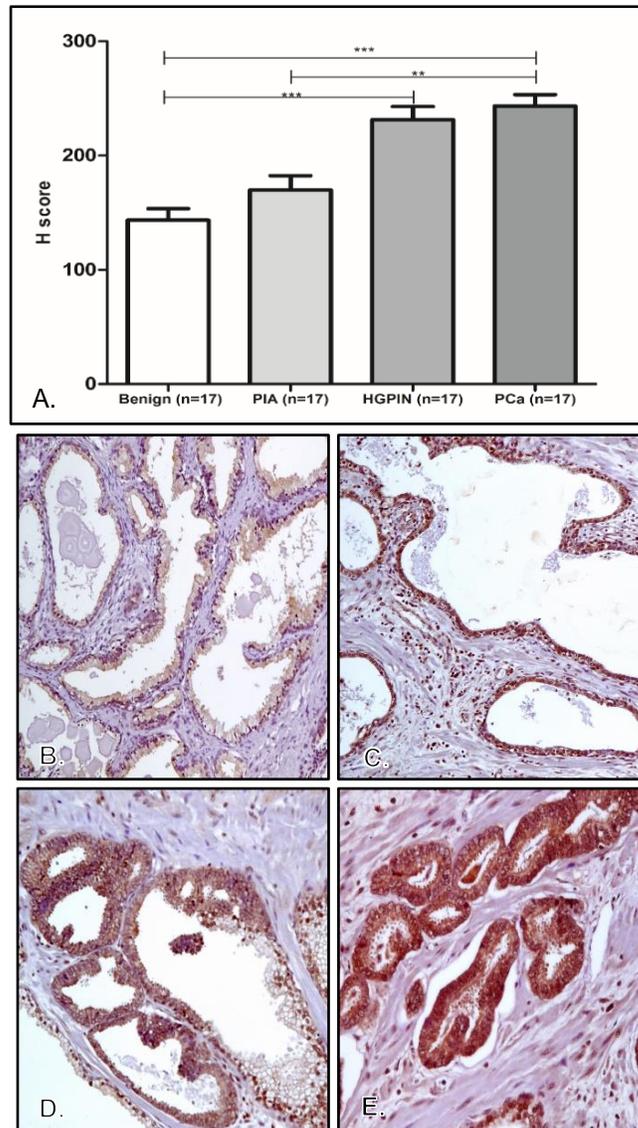


Figura 14. Expresión de proteína CXXC5 a través de las lesiones en tejidos de especímenes de prostatectomía. La expresión de la proteína CXXC5 fue determinada por IHQ, en tejidos de especímenes de prostatectomía con presencia de todas las lesiones involucradas en la progresión. A. Puntaje de IHQ a través de las lesiones en especímenes de prostatectomía (n=17), (*p: prueba ANOVA). B. Tinción inmunohistoquímica de CXXC5 ausente a débil en TPB. C. Tinción débil a moderada en PIA. D. Tinción débil a moderada en HGPIN. E. Tinción fuerte en CaP. IHQ, 100X. (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

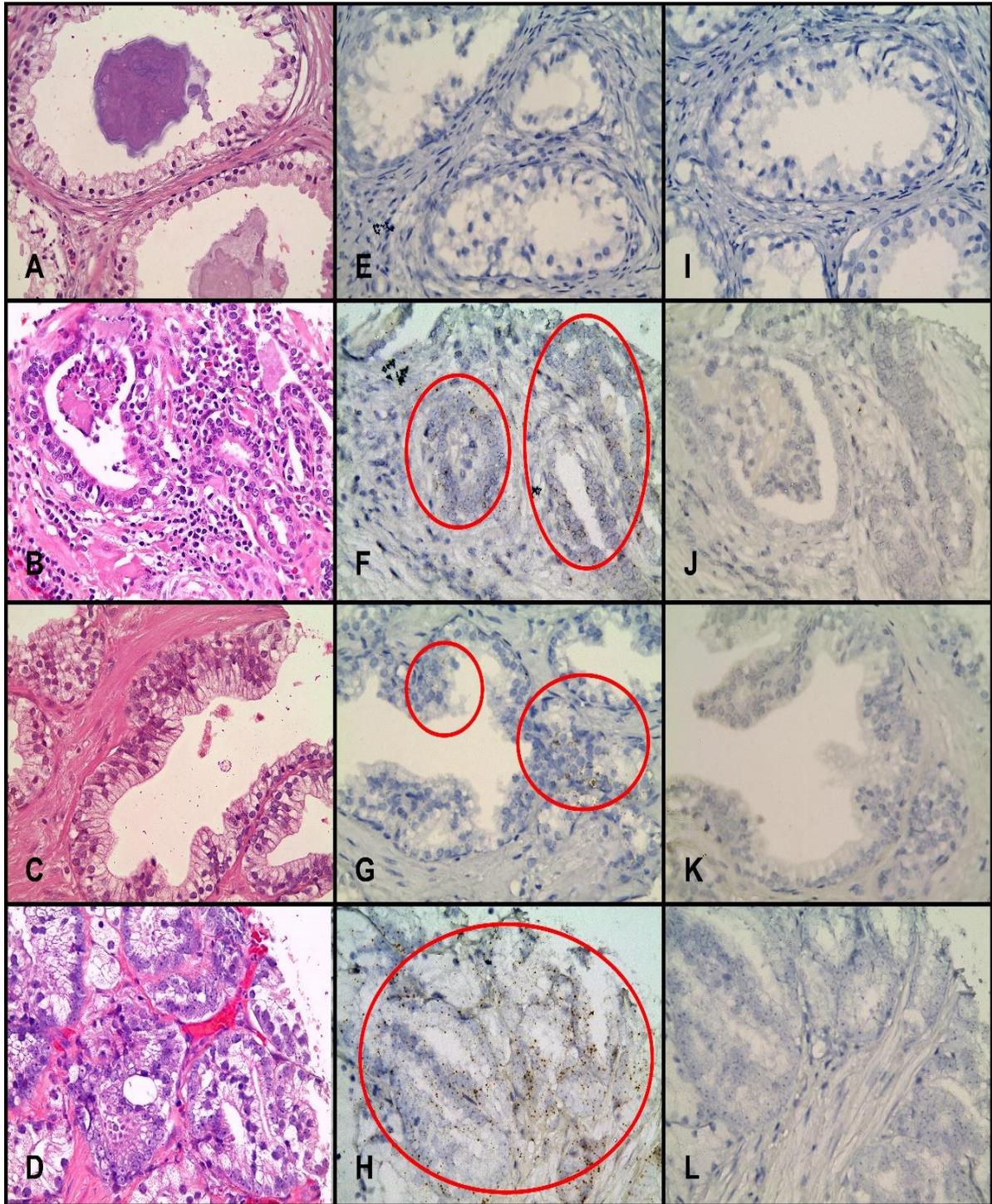


Figura 15. Expresión de mRNA de CXXC5 a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático. La expresión de mRNA de CXXC5 fue determinada por CISH en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP **A, E, I:** El mismo cilindro de tejido prostático benigno, tinción con H&E (A), señal negativa para mRNA de CXXC5 (E), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (I). **B, F, J:** El mismo cilindro de tejido prostático con PIA, tinción con H&E (B), la señal para mRNA de CXXC5 se encontró predominantemente en el núcleo, con 2–3 puntos/célula, como indican los círculos rojos, (F), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (J). **C, G, K:** El mismo cilindro de tejido prostático con HGPIN, tinción con H&E (G), la señal para mRNA de CXXC5 se encontró predominantemente en el compartimiento epitelial, con 3–4 puntos/célula, como indican los círculos rojos (H, I), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (K). **D, H, L:** El mismo cilindro de tejido prostático con CaP, tinción con H&E (J), la señal de mRNA de CXXC5 se localiza en el compartimiento tumoral, en patrón en grumos como indican los círculos rojos (H), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (L). (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

6.2.3 Expresión de la proteína CXXC5 en TMA de tejido prostático

La expresión de la proteína CXXC5 fue evaluada por IHQ en el mismo TMA usado para el análisis de CISH, con 381 cilindros de tejido prostático benigno y con las diferentes lesiones, de 47 especímenes de prostatectomía, estudiándola en cada cilindro con su respectiva lesión.

Los resultados mostraron que la proteína CXXC5 fue expresada con mayor intensidad en las células tumorales de adenocarcinoma prostático comparadas con las células epiteliales prostáticas benignas ($p < 0.0001$, prueba U Mann Whitney).

Se observó un incremento en la expresión de CXXC5 a lo largo de las lesiones planteadas como involucradas en el modelo de progresión del CaP (Figura 16). El valor de la inmunotinción en los cilindros de tejido prostático benigno (99.7, IC: 90.5 - 108.9), fue significativamente más bajo que el valor promedio de la inmunotinción en los cilindros con: PIA (195.2, IC 95%: 184.4 - 206.1), HGPIN (214.2, IC 95%: 198.8 – 229.7), y CaP (242.2, IC 95%: 235,4 – 249.1), ($p < 0.0001$, prueba ANOVA). Los datos demuestran un incremento estadísticamente significativo en la expresión de CXXC5 desde el tejido prostático benigno hasta las lesiones postuladas como precancerosas y finalmente el CaP (Figura 17).

La expresión media de CXXC5 en los cilindros con cáncer fue más alta que la de los cilindros con HGPIN ($p = 0.0006$, prueba t), y que la de los cilindros con PIA ($p < 0.0001$, prueba t). No hubo una diferencia significativa en la expresión media de CXXC5 entre los cilindros con HGPIN y los cilindros con PIA ($p = 0,0839$, prueba t) (Figura 18).

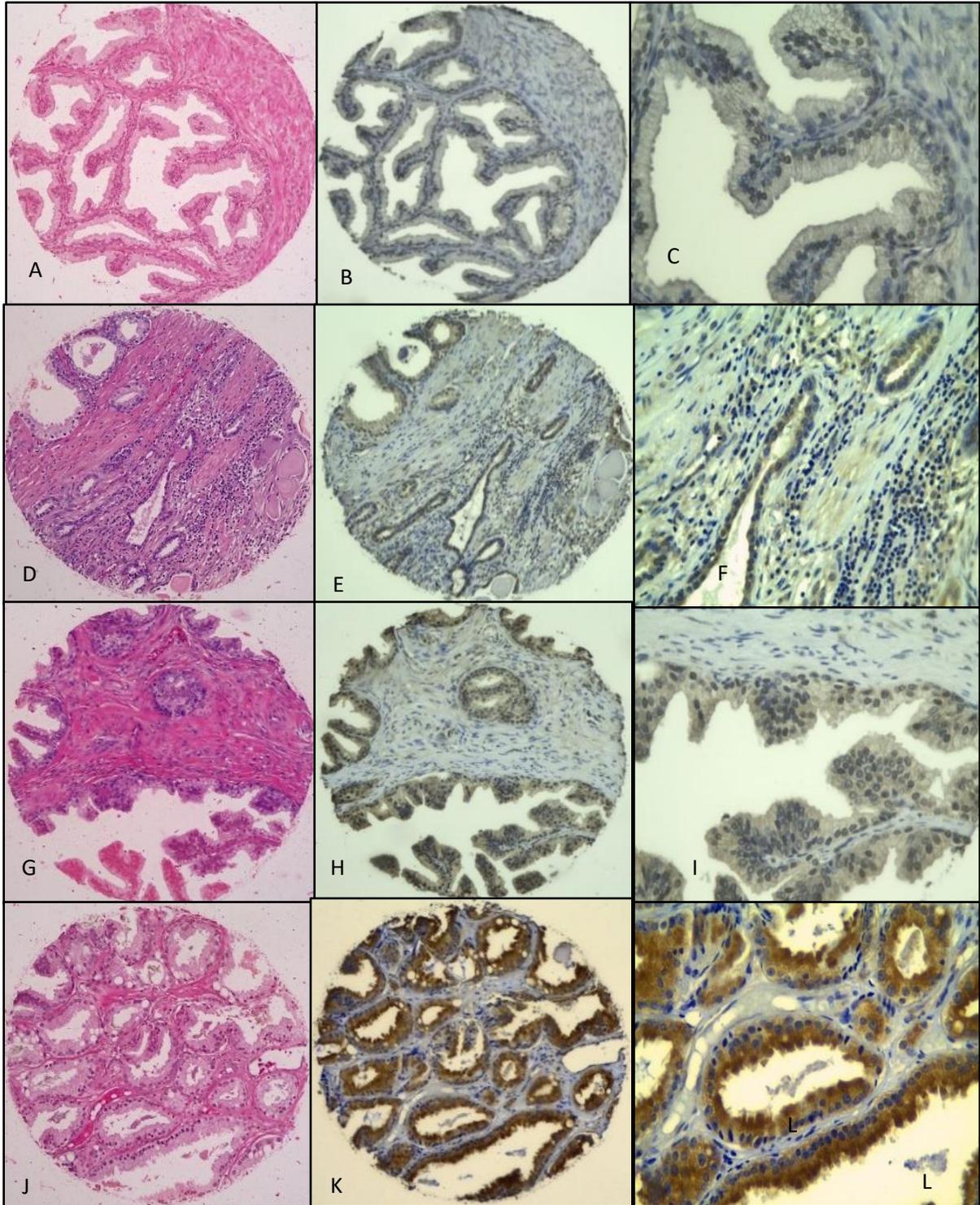


Figura 16. Expresión de proteína CXXC5 a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático. La expresión de la proteína CXXC5 fue determinada por IHQ en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP. **A, B, C:** El mismo cilindro de tejido prostático benigno, tinción con H&E, 100X (A), tinción leve o ausente para CXXC5 en el compartimiento epitelial, 100X, 400X (B, C). **D, E, F:** El mismo cilindro de tejido prostático con PIA, tinción con H&E, 100X (D), tinción leve a moderada para CXXC5 en el compartimiento epitelial, 100X, 400X (E, F). **G, H, I:** El mismo cilindro de tejido prostático con HGPIN, tinción con H&E, 100X (G), tinción leve a moderada para CXXC5 en el compartimiento epitelial, 100X, 400X (H, I). **J, K, L:** El mismo cilindro de tejido prostático con CaP, tinción con H&E, 100X (J), tinción fuerte para CXXC5 en el tumor, 100X, 400X (K, L). (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

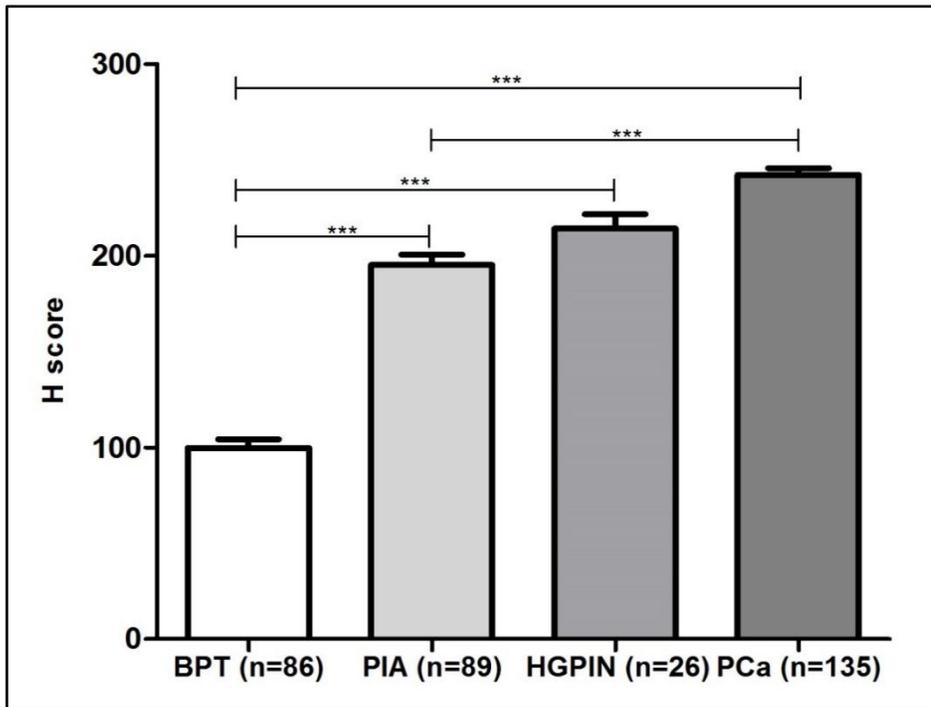


Figura 17. Puntajes de expresión de la proteína CXXC5 a través de las lesiones en TMA de tejido prostático. H-score de la tinción inmunohistoquímica de CXXC5 a través de las lesiones en la progresión del CaP, (*p: prueba ANOVA).

Los niveles de expresión de CXXC5 a nivel de proteína determinados por IHQ, fueron consistentes con los niveles de expresión a nivel de transcritos observados mediante CISH. De acuerdo con los resultados observados en la expresión a nivel de transcrito, la expresión de proteína aumentó a lo largo de las lesiones postuladas en la progresión de esta neoplasia (Figura 18).

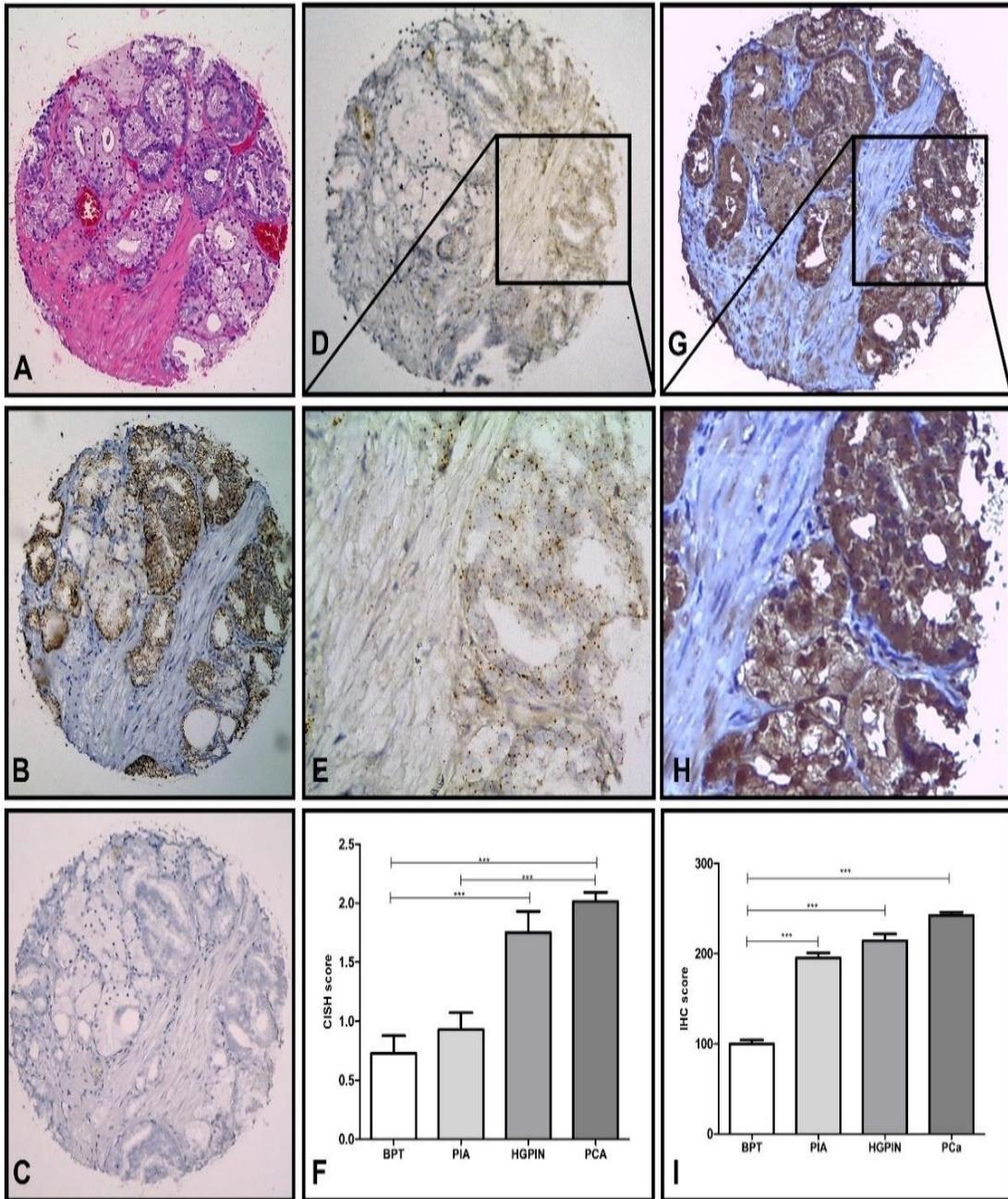


Figura 18. Comparación de expresión de mRNA y de proteína CXXC5 en tejido con adenocarcinoma prostático, y a través de la progresión del adenocarcinoma prostático. El mismo cilindro de tejido con CaP, A: tinción con H&E, B: CISH con tinción positiva para PPIB (control positivo), C: CISH con tinción negativa para DapB (control negativo), D, E: CISH con tinción positiva para CXXC5, G, H: IHQ con tinción positiva para CXXC5. F: Expresión diferencial de mRNA de CXXC5 a través de la progresión del CaP, determinada por CISH, (*p prueba ANOVA), I: Expresión diferencial de la proteína CXXC5 a través de la progresión del CaP, determinada por IHQ (*p: prueba ANOVA). (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

6.2.4 Expresión de Fibromodulina en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP, en muestras de tejido prostático

La expresión de la proteína fibromodulina en la progresión del adenocarcinoma prostático fue evaluada mediante tinción IHQ. Se determinó inicialmente la expresión en tejido prostático obtenido de especímenes de prostatectomía de 42 pacientes con edades entre 55 y 83 años (Media = 69.9), dentro de los cuales 35 corresponden a casos de CaP, 6 de bajo grado, 14 CaP de grado intermedio y 15 de alto grado, clasificados de acuerdo con el sistema de Gleason.

La determinación de la intensidad y extensión de la tinción se hizo mediante el H-score, de la misma forma descrita anteriormente. El valor promedio del H-score de las células epiteliales luminales benignas (35 grupos de glándulas benignas) presentes tanto en los especímenes con HPB, como en los especímenes con CaP, fue de 66.9, (95% CI: 52.5-81.3), mientras que el valor promedio del H-score en las células tumorales (35 muestras con CaP) fue de 137.6 (95% CI: 119.1-156.1), ($p < 0.0001$, prueba t). Estos resultados indican una expresión significativamente incrementada en las células del adenocarcinoma, en relación con las células epiteliales benignas (Figura 19).

Al comparar los niveles de expresión de fibromodulina en las glándulas benignas de los casos con CaP, con los de las glándulas benignas de los casos con HPB, no se encontró una diferencia significativa ($p = 0,347$, prueba t).

Dentro del grupo con cáncer, no se encontró una diferencia significativa ($p = 0.064$, prueba ANOVA) en la expresión de fibromodulina entre los tumores de bajo grado (121,0, IC 95%: 76.6 -165.3, $n = 6$), de grado intermedio (162.4, IC 95%:130.7-194, $n=14$) y los

tumores de alto grado (117.7, IC 95%: 88.9-146.5, n =15), clasificados de acuerdo con el sistema de Gleason (Figura 20).

Para evaluar el patrón de expresión de fibromodulina a través de las diferentes lesiones prostáticas, la expresión de la proteína fue determinada en 7 casos que, en los bloques de tejido estudiados, presentaban en forma simultánea TPB, PIA, HGPIN y CaP, encontrándose una diferencia estadísticamente significativa en la tinción entre las lesiones ($p < 0,0053$, prueba ANOVA). El puntaje de la expresión de la proteína fibromodulina fue significativamente más alto en CaP (148,1, 95% CI: 105.1-191.2) seguido en orden decreciente por el puntaje obtenido en la tinción en HGPIN (126,1, 95% CI: 80.1-171.7), PIA (74,29, 95% CI: 42.6-105.9), y en el epitelio benigno (80,86, 95% CI: 55.3-106.3). Sin embargo, en el post-test, los puntajes de tinción fueron significativamente diferentes solo entre TPB y CaP, y entre PIA y CaP (Figura 21).

Al comparar la expresión IHQ de fibromodulina entre el tejido prostático benigno y las lesiones postuladas en la progresión a cáncer, en todos los bloques de tejido incluidos, se encontró que fue significativamente más alta en CaP, HGPIN y PIA, que la expresión media en las glándulas normales ($p < 0.0001$, prueba ANOVA), (Tabla 9).

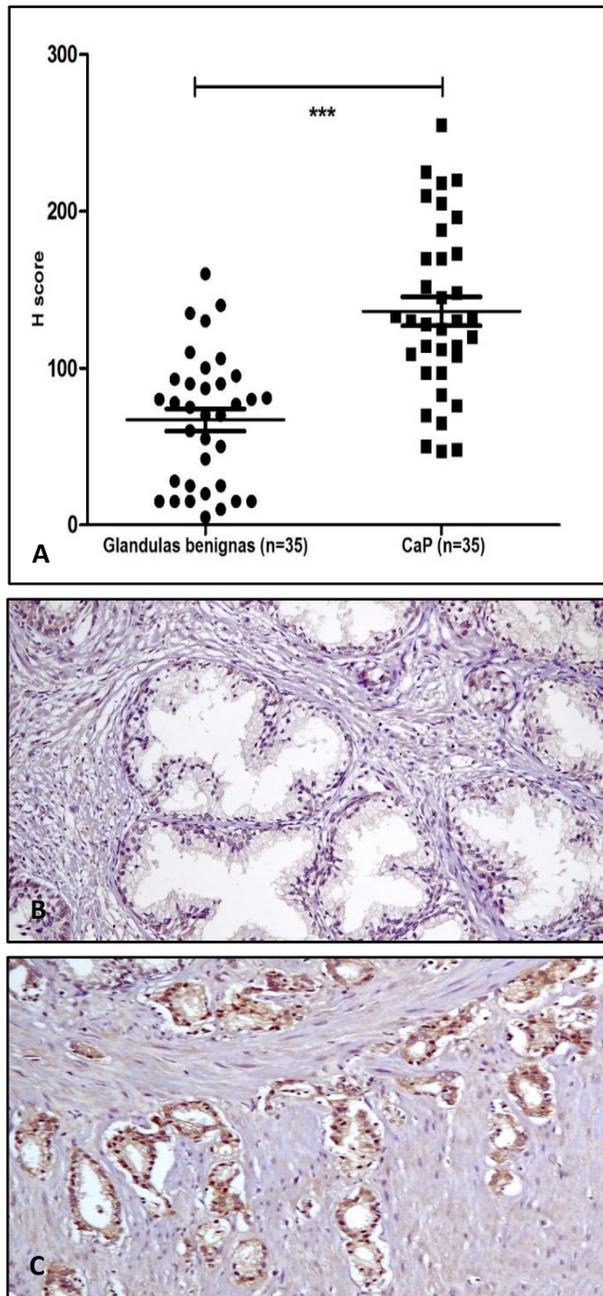


Figura 19. Expresión de fibromodulina en glándulas prostáticas benignas en comparación con adenocarcinoma prostático. A. Se comparó el puntaje de H-score de la tinción IHQ de fibromodulina en las glándulas benignas presentes en todos los casos, con la de las glándulas tumorales presentes en los casos con CaP. (* $p < 0.0001$, prueba t). B. TPB, C. CaP (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

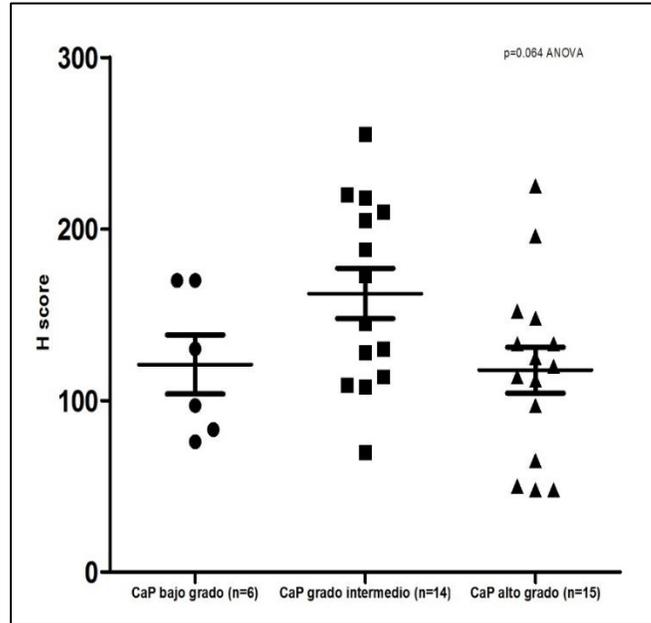


Figura 20. Expresión de fibromodulina en adenocarcinoma según el grado histológico. Se determinó la expresión de fibromodulina mediante IHQ, en tejido con CaP de bajo grado, CaP de grado intermedio y CaP de alto grado, la diferencia no fue significativa ($p = 0.64$, prueba ANOVA).

Tabla 9. Niveles de expresión inmunohistoquímica de fibromodulina en las diferentes lesiones, en tejidos FFPE de especímenes de prostatectomía

	H-score, media (DE)				p
	TPB n=35	PIA n=24	HGPIN n=11	CaP n=35	
Fibromodulina	66.91 (41,93)	82.21 (54.81)	136.4 (50,41)	137.6 (53.76)	<,0001*

* prueba ANOVA.

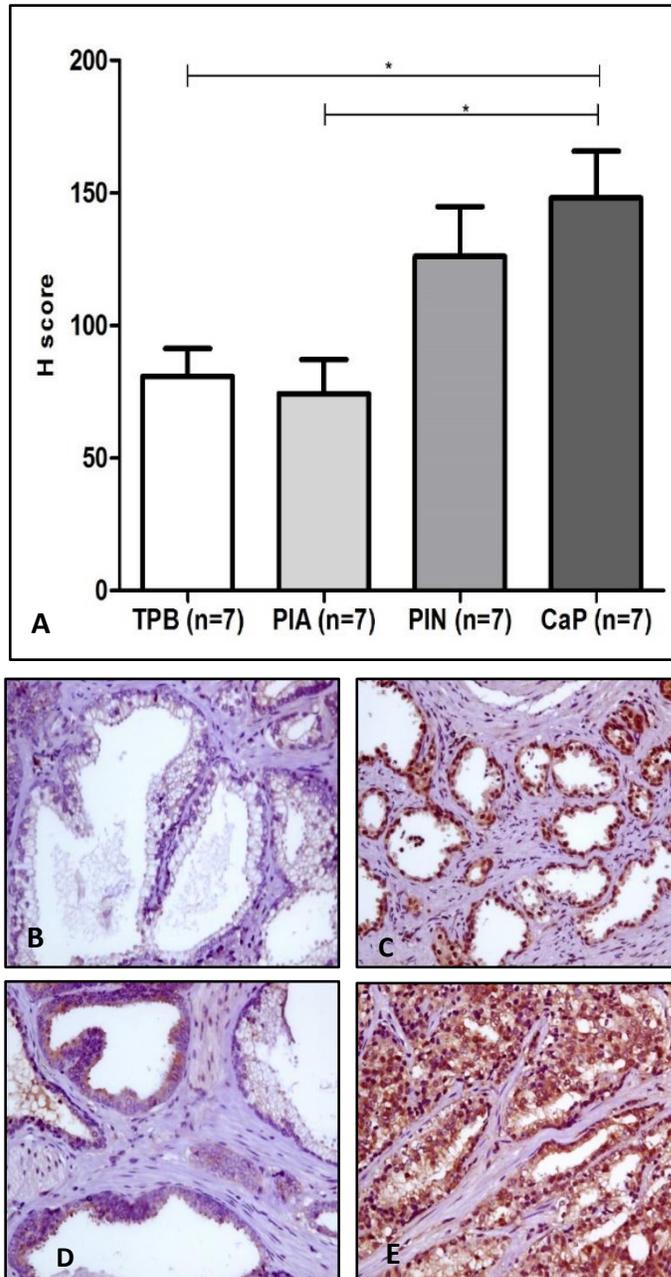


Figura 21. Expresión de la proteína fibromodulina a través de las lesiones en tejidos de especímenes de prostatectomía. La expresión de la proteína fibromodulina fue determinada por IHQ, en tejidos de especímenes de prostatectomía con presencia de todas las lesiones involucradas en la progresión. A. Puntaje de IHQ a través de las lesiones en especímenes de prostatectomía (n=7), (*p: prueba ANOVA). B. Tinción IHQ de fibromodulina ausente a débil en TPB. C. tinción débil a moderada en PIA. D. tinción débil a moderada en HGPIN. E. Tinción fuerte en CaP (E). IHQ, 100X. (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena) 2016) 2016).

6.2.5 Expresión *In Situ* de RNA mensajero de FMOD en TMA de tejido prostático

La expresión *in situ* del mRNA de FMOD fue evaluada por medio de un ensayo de CISH, (RNAscope® 2.0 FFPE Assay, Advanced Cell Diagnostics, INC., Hayward, CA), en el mismo TMA descrito previamente, con 381 cilindros de tejido prostático benigno y con las diferentes lesiones (Tabla 7).

La calidad del RNA fue variable a lo largo de los cilindros de tejido del TMA, la mayoría de los cilindros mostraron tinción moderada a fuerte del control positivo con muy escasa tinción de fondo. Las condiciones del ensayo pretratamiento estándar de las muestras en este estudio fueron determinadas como óptimas. La evaluación de la expresión de mRNA de FMOD en las lesiones estudiadas en los cilindros de tejido prostático mediante CISH, demostró que, en general su expresión aumentó del tejido prostático benigno hasta PIA, HGPIN, y CaP ($p < 0.0001$, prueba ANOVA), con una diferencia significativa en la expresión de mRNA de FMOD entre TPB y HGPIN ($p = 0.0001$, prueba t), entre TPB y CaP ($p = 0.0001$, prueba), entre TPB y PIA ($p = 0.0005$, prueba t), y entre HGPIN y CaP ($p = 0.026$, prueba t). (Figuras 22, 23).

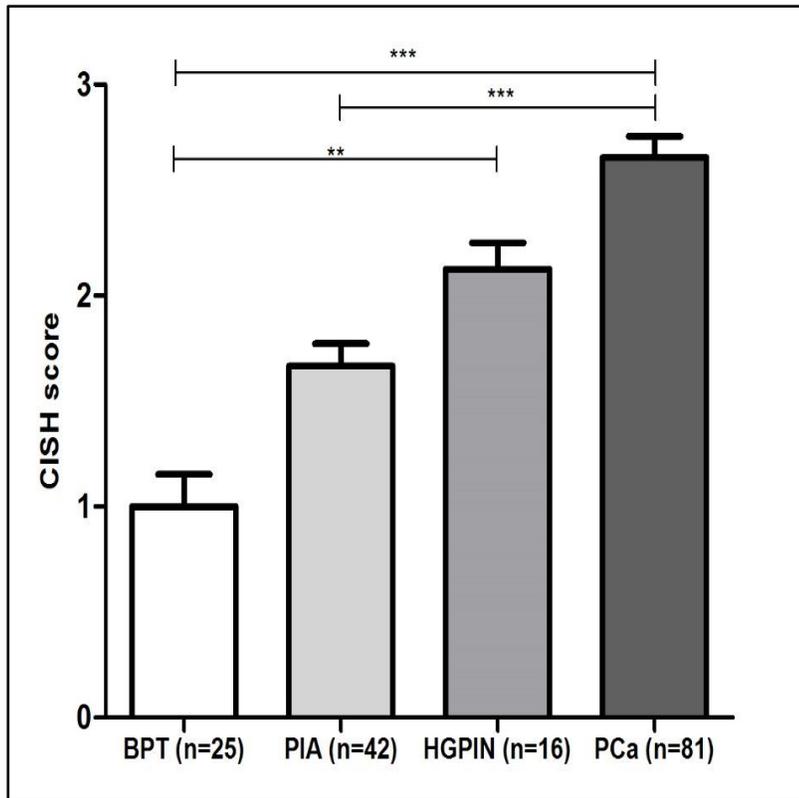


Figura 22. Puntajes de expresión de mRNA de FMOD a través de las lesiones en TMA de tejido prostático. La expresión *in situ* del mRNA de FMOD fue determinada por CISH en tejidos de TMA de tejido prostático con todas las lesiones involucradas en la progresión. (*p: Prueba ANOVA).

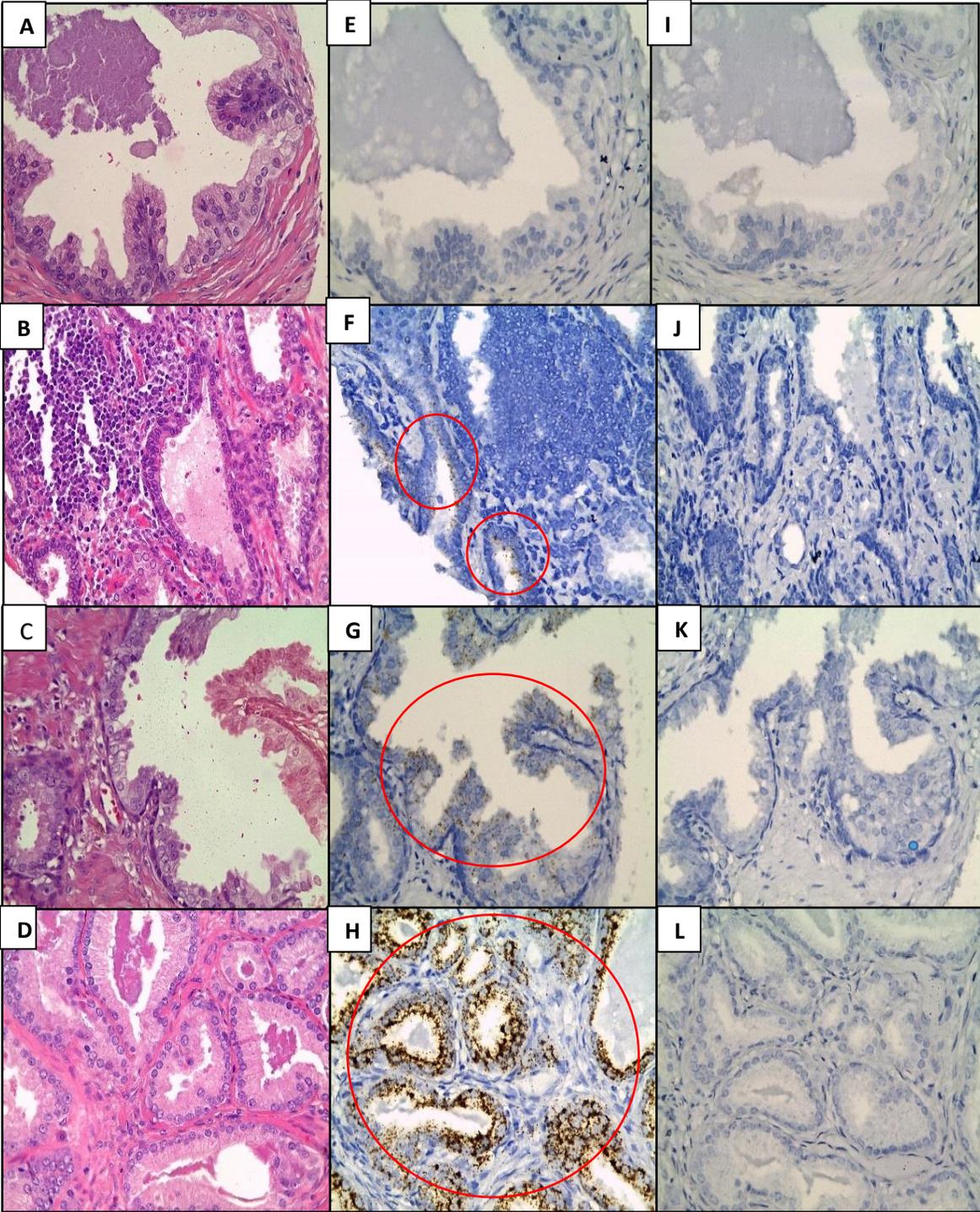


Figura 23. Expresión de mRNA de FMOD a través de las lesiones, en TMA de tejido prostático. La expresión de mRNA de FMOD fue determinada por CISH en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP. **A, E, I:** El mismo cilindro de tejido prostático benigno, tinción con H&E (A), señal negativa para mRNA de FMOD (E), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (I). **B, F, J:** El mismo cilindro de tejido prostático con PIA, tinción con H&E (B), la señal para mRNA de FMOD se encontró predominantemente en el núcleo, con 2–3 puntos/célula, como indican los círculos rojos, (F), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (J). **C, G, K:** El mismo cilindro de tejido prostático con HGPIN, tinción con H&E (G), la señal para mRNA de FMOD se encontró predominantemente en el compartimiento epitelial, con 3–4 puntos/célula, como indican los círculos rojos (H, I), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (K). **D, H, L:** El mismo cilindro de tejido prostático con CaP, tinción con H&E (J), la señal de mRNA de FMOD se localiza en el compartimiento tumoral, en patrón en grumos como indican los círculos rojos (H), señal negativa para mRNA de DapB (control negativo) (L). (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

6.2.6 Expresión de Fibromodulina en tejido prostático benigno, PIA, HGPIN y CaP en TMA de tejido prostático

La expresión de la proteína fibromodulina también fue evaluada en el mismo TMA con 381 cilindros con TPB, PIA, HGPIN y CaP, de 47 pacientes, estudiándola en cada cilindro con su respectiva lesión (Tabla 7).

Los resultados mostraron que la proteína fibromodulina fue expresada en forma diferencial al comparar las células epiteliales prostáticas benignas y las células tumorales de adenocarcinoma prostático ($p < 0.0001$, prueba U Mann Whitney).

Se observó un incremento en la expresión de fibromodulina a lo largo de las lesiones planteadas como involucradas en el modelo de progresión del CaP (Figura 24, 25). El valor de la inmunotinción en los cilindros de tejido prostático benigno (33.38, IC 95%: 27.81-38.96) fue significativamente más bajo que el valor promedio de la inmunotinción en los cilindros con: PIA (128.0, IC 95%: 117.1- 138,8), HGPIN (131.4, IC 95%: 109.4-153.4), y CaP (155.0 IC 95%: 143.4,- 166.7). Las medias fueron significativamente diferentes ($p < 0.0001$, prueba ANOVA). Los datos demuestran un incremento estadísticamente significativo en la expresión de fibromodulina desde el tejido prostático benigno hasta las lesiones postuladas como precancerosas y finalmente el CaP.

La expresión media de fibromodulina en los cilindros con cáncer fue más alta que la de los cilindros con PIA ($p < 0,0013$, prueba t), mientras que no hubo una diferencia significativa en la expresión media de fibromodulina entre CaP y HGPIN ($p = 0,0593$, prueba t), ni tampoco entre HGPIN y PIA ($p = 0,7748$, prueba t).

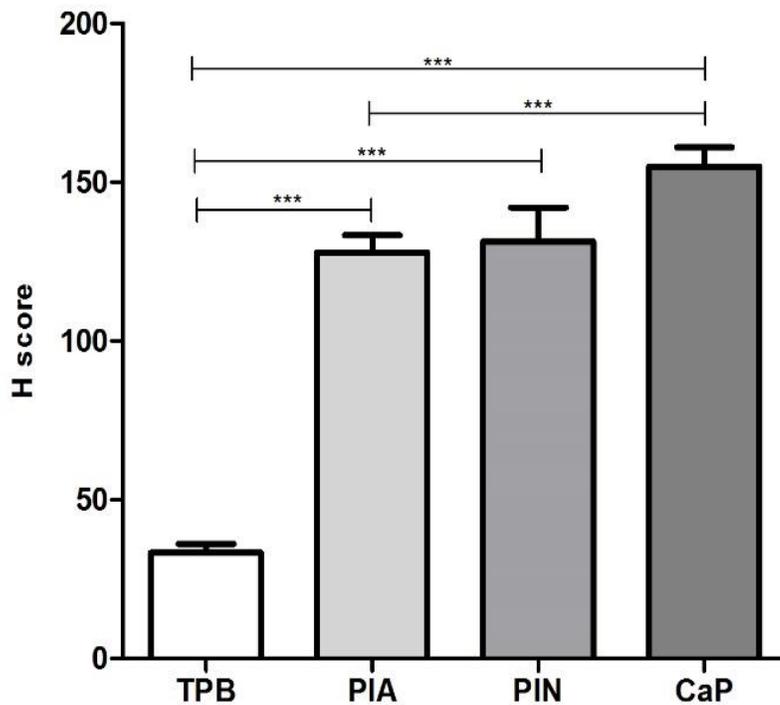


Figura 24. Puntajes de expresión de la proteína Fibromodulina a través de las lesiones en TMA de tejido prostático. H-score de la tinción IHQ a través de las lesiones en la progresión del CaP, (*p: prueba ANOVA).

Los niveles de expresión de FMOD a nivel de proteína determinados por IHQ, fueron consistentes con los niveles de expresión a nivel de transcritos observados mediante CISH. De acuerdo con los resultados observados en la expresión a nivel de transcrito, la expresión de proteína aumentó a lo largo de las lesiones postuladas en la progresión de esta neoplasia (Figura 26).

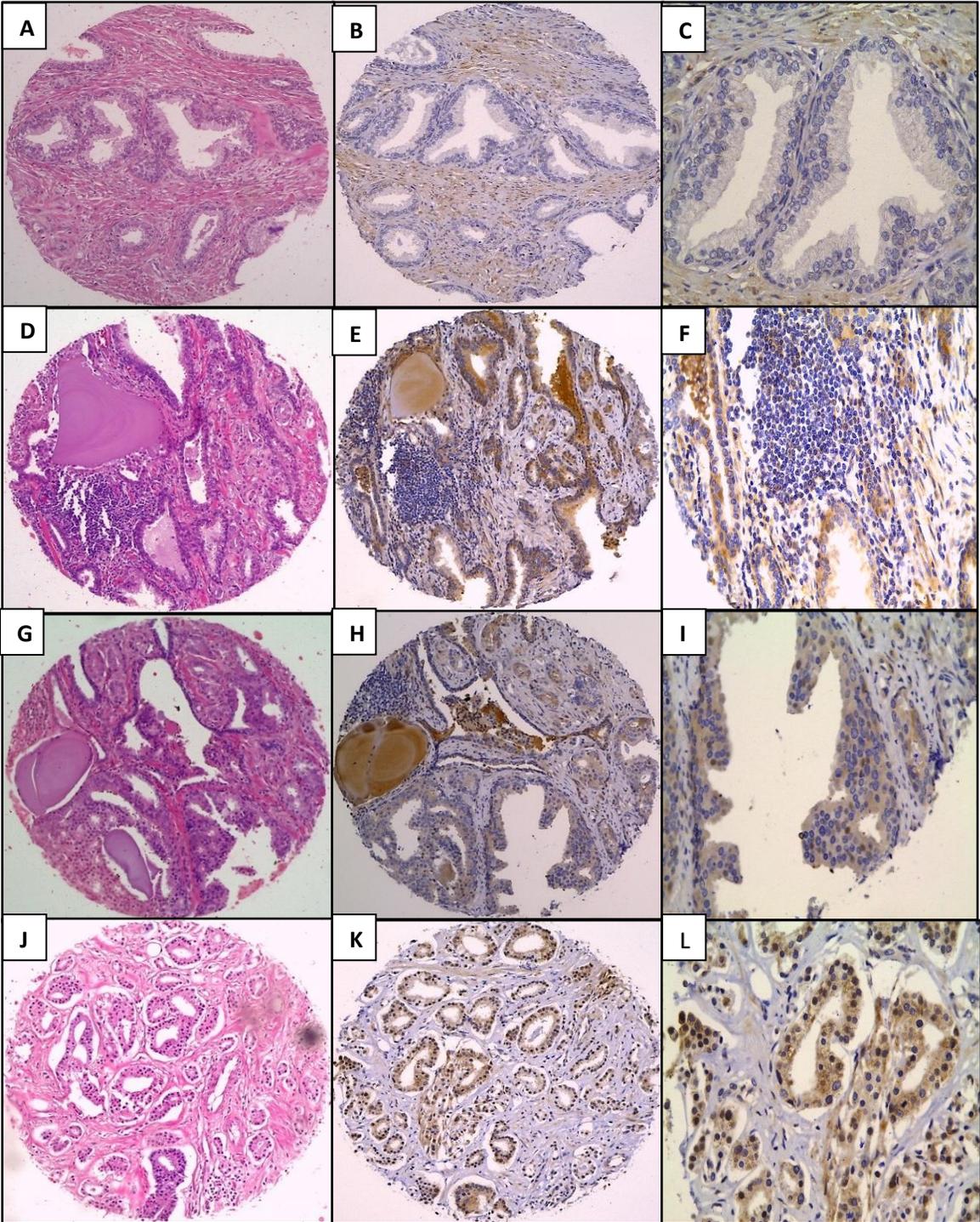


Figura 25. Expresión de proteína fibromodulina en las lesiones, en TMA de tejido prostático. La expresión de la proteína fibromodulina fue determinada por IHQ en tejido prostático benigno, PIA, PIN y CaP. **A, B, C:** El mismo cilindro de tejido prostático benigno, tinción con H&E, 100X (A), tinción leve o ausente para fibromodulina en el compartimiento epitelial, 100X, 400X (B, C). **D, E, F:** El mismo cilindro de tejido prostático con PIA, tinción con H&E, 100X (D), tinción leve a moderada para fibromodulina en el compartimiento epitelial, 100X, 400X (E, F). **G, H, I:** El mismo cilindro de tejido prostático con PIN, tinción con H&E, 100X (G), tinción leve a moderada para fibromodulina en el compartimiento epitelial, 100X, 400X (H, I). **J, K, L:** El mismo cilindro de tejido prostático con CaP, tinción con H&E, 100X (J), tinción fuerte para fibromodulina en el tumor, 100X, 400X (K, L). (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

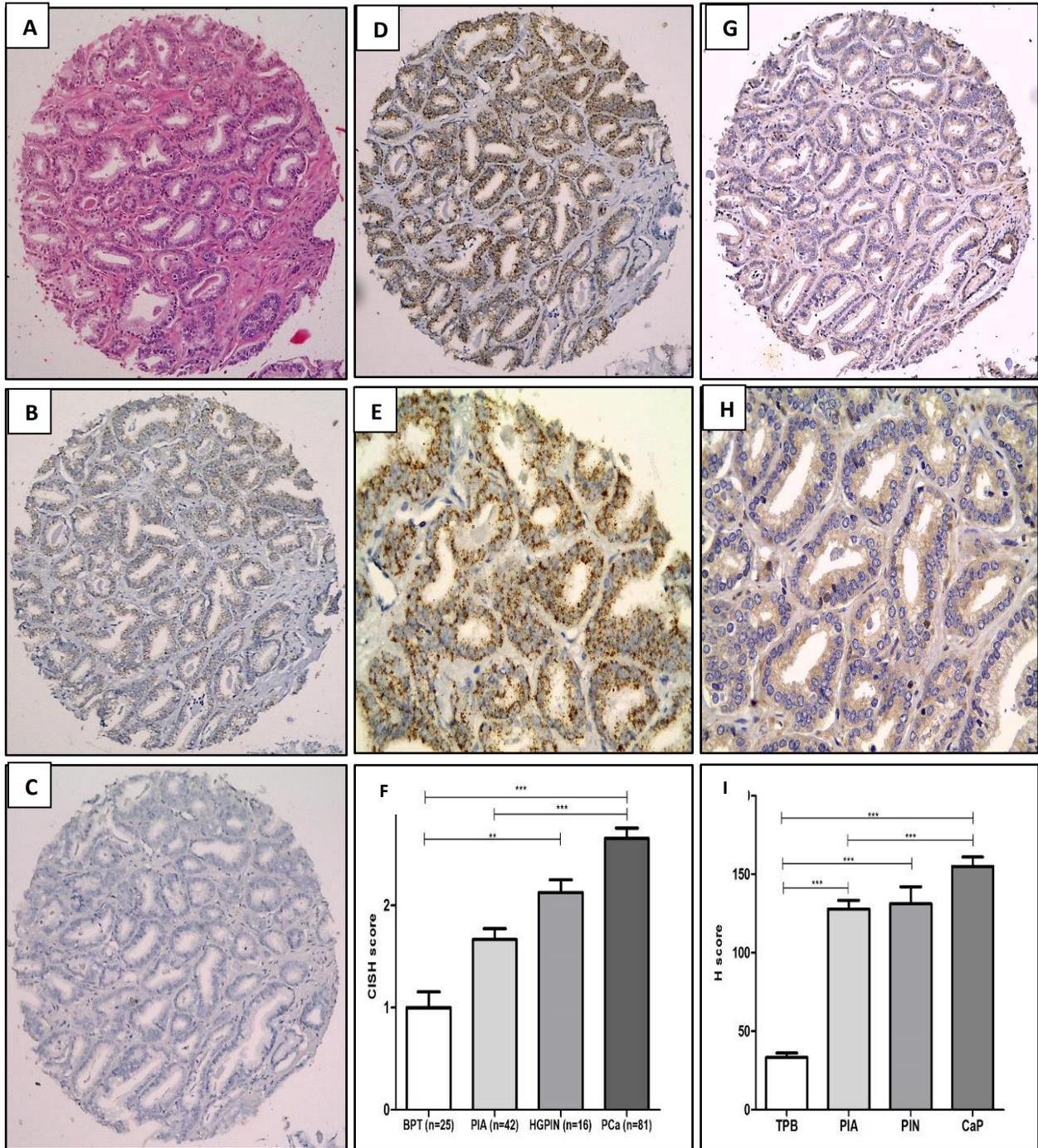


Figura 26. Comparación de expresión de mRNA de FMOD y de proteína fibromodulina en tejido con adenocarcinoma prostático, y a través de la progresión del adenocarcinoma prostático. El mismo cilindro de tejido con CaP, A: tinción con H&E, B: CISH con tinción positiva para PPIB (control positivo), C: CISH con tinción negativa para DapB (control negativo), D, E: CISH con tinción positiva para FMOD, G, H: IHQ con tinción positiva para fibromodulina. F: Expresión diferencial de mRNA de FMOD a través de la progresión del CaP, determinada por CISH, (*p prueba ANOVA), I: Expresión diferencial de la proteína fibromodulina a través de la progresión del CaP, determinada por IHQ, (*p prueba ANOVA). (Fotografías tomadas en el Laboratorio de Histopatología, Universidad de Cartagena, 2016).

7. EVALUACIÓN POR PCR CUANTITATIVA EN TIEMPO REAL, EN MUESTRAS DE PRÓSTATA CON TEJIDO PROSTÁTICO BENIGNO Y CON ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO, DE LA EXPRESIÓN DE UN GRUPO DE MICRORNAS Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DEL ADENOCARCINOMA DE PRÓSTATA.

Se evaluó la expresión de un grupo de microRNAs en las diferentes lesiones prostáticas mediante RT-qPCR, usando muestras obtenidas mediante LCM y mediante disección manual de bloques de tejido prostático FFPE.

7.1 MATERIALES Y METODOS

7.1.1 Selección de microRNAs a estudiar

Estudios previos de nuestro grupo de investigación en los que se analizó la expresión de un grupo de microRNAs en líneas celulares de CaP (PWR-1E, LNCaP y PC3), identificaron varios de ellos diferencialmente expresados en estas líneas celulares (Datos en proceso de publicación). Dos de estos microRNAs fueron seleccionados para evaluar su expresión en las diferentes lesiones en el tejido prostático. Específicamente evaluamos la expresión de miR-155 y miR-9 en muestras obtenidas mediante LCM, y mediante disección manual de las diferentes lesiones presentes en tejido prostático.

7.1.2 Muestras de tejido prostático

La expresión de microRNAs se evaluó en dos tipos de muestras:

- Muestras pareadas de tejido prostático benigno, PIA, HGPIN, y CaP obtenidos mediante LCM, a partir de tejido prostático proveniente de prostatectomías

radicales. Se evaluaron muestras obtenidas de un grupo de 3 casos con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma prostático con rango de edad entre 58 y 72 años.

- Muestras pareadas de tejido prostático benigno, PIA y CaP, disecadas manualmente de bloques de tejidos FFPE, los cuales fueron obtenidos de especímenes de prostatectomía radical y RTU de próstata. Se incluyeron 22 casos con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma prostático con rango de edad entre 50 y 82 años.

7.1.3 Microdissección láser para obtención de tejido prostático benigno, con PIA, HGPIN y CaP

Se realizó LCM para obtener de forma aislada grupos de células epiteliales de: a) glándulas benignas de morfología habitual, b) glándulas con PIA, c) glándulas con HGPIN y d) focos de adenocarcinoma. Los tejidos obtenidos fueron almacenados y posteriormente procesados para análisis de expresión génica mediante RT-qPCR.

Las muestras fueron microdisecadas a partir de tres especímenes de prostatectomía radical FFPE, archivados durante un tiempo promedio de un año, con adenocarcinoma Gleason 7, obtenidas respectivamente de tres pacientes a los que se les practicó prostatectomía radical como tratamiento de CaP localizado, las variables clínicas se presentan en la tabla 10 (Tabla 10). Los cortes histológicos coloreados con H&E fueron previamente revisados, seleccionándose dos bloques de tejido de cada caso (seis en total de tres pacientes) en los que se encontraron suficientes áreas representativas de glándulas benignas, PIA, HGPIN, y adenocarcinoma.

7.1.3.1 Procedimiento de LCM

Todo el procedimiento se llevó a cabo en Johns Hopkins University, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center (Baltimore, MD, USA) utilizando un equipo de microdissección por captura láser (Leica LMD 6000®). Los bloques de tejido seleccionados fueron procesados en el Johns Hopkins University Oncology Tissue Services Core, Regional Oncology Research Center.

A cada bloque seleccionado se le tomaron dos cortes de 12 µm de espesor, cada uno de los cuales fue montado en una membrana especial de naftalato de polietileno (PEN: polyethylene naphthalate) unida a una lámina portaobjetos Leica RNasefree PEN® (Leica®, Bannockburn, IL, USA) para microdissección laser.

Los cortes fueron desparafinizados y rehidratados mediante lavados en xilol, seguido por alcohol y agua, levemente teñidos con hematoxilina para asegurar la visualización de las estructuras del tejido y llevar a cabo en forma precisa la microdissección. Las láminas se colocaron en forma invertida en el dispositivo porta-especímenes.

La calibración inicial del control de movimientos del software se hizo en un área del tejido distinta a las señaladas para la microdissección de interés.

Para efectuar la disección precisa de cada lesión a analizar, se delimitaron manualmente las áreas de interés con ayuda de la herramienta de selección del software, la cual permite definir el tamaño y delimitar en forma precisa el contorno del área a microdisecar.

Tabla 10. Muestras de tejido prostático disecadas por LCM, y RNA obtenido

	Edad	Puntaje de Gleason (Patrón primario+Patrón secundario)	Concentración RNA (ng/ μ L)	Relación 260/280
Caso 1	58	7 (4+3)		
TPB			8,60	1,69
PIA			11,45	1,58
HGPIN			11,80	1,62
CaP			24,60	1,76
Caso 2	62	7 (4+3)		
TPB			6,70	1,67
PIA			19,50	1,71
HGPIN			21,00	1,66
CaP			52,80	1,54
Caso 3	72	7 (3+4)		
TPB			47,60	1,88
PIA			91,10	1,95
HGPIN			25,70	1,70
CaP			122,50	1,90

A continuación, se activó el láser vaporizando la membrana junto con el espécimen adherido a ella, recolectándose en tubos de microcentrífuga las diferentes poblaciones celulares específicas de cada lesión. Se recolectaron entre 60-100 acinos de: a) glándulas prostáticas de morfología habitual (TPB), b) acinos formando parte de áreas de PIA, c) acinos con HGPIN y d) áreas extensas de adenocarcinoma, abarcando todos los focos disponibles en cada lámina. Los tejidos microdisecados fueron recolectados en tubos de microcentrífuga debidamente rotulados para cada lesión y almacenados a -80 °C hasta la extracción de RNA total. Para cada caso clínico se usaron dos laminas

portaobjetos con cortes de tejido, de modo que se obtuvo tejido microdisecado de la misma lesión del mismo caso en dos tubos independientes de microcentrífuga. Se tomaron imágenes antes y después de la microdissección para validar la exactitud en la obtención del tejido de cada una de las lesiones. (Figura 27).

7.1.3.2 Obtención de RNA del tejido microdisecado

El RNA total de las muestras de tejido microdisecadas con tejido prostático benigno, HGPIN, PIA y adenocarcinoma, respectivamente, se obtuvo usando el estuche comercial: Arcturus "Paradise" PLUS Reagent System® (Applied Biosystems), diseñado para estudios de expresión génica en tejidos FFPE, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

A cada una de las muestras de tejido microdisecadas, recolectadas y almacenadas en la tapa de los tubos de microcentrífuga se le agregó 50 µL de proteinasa K, se agitó en vortex y se incubó a 37°C durante 16 horas. Posteriormente el extracto celular se mezcló con 53 µL del buffer de unión (BB) y con 103 µL de la solución de etanol.

Para cada una de las muestras de lesiones obtenidas por microdissección, se asignó una de las columnas de purificación del estuche comercial, previamente tratadas con el buffer de acondicionamiento. Seguidamente se agregó la mezcla del extracto celular en la columna de purificación pre-acondicionada, la columna fue centrifugada por 2 minutos a 100 g para unir el RNA a la membrana de la columna.

Este procedimiento se repitió hasta cargar el extracto celular de los dos tubos de tejido de cada lesión en la columna respectiva, se centrifugó la columna por 1 minuto a 16000 g para decantar detritus.

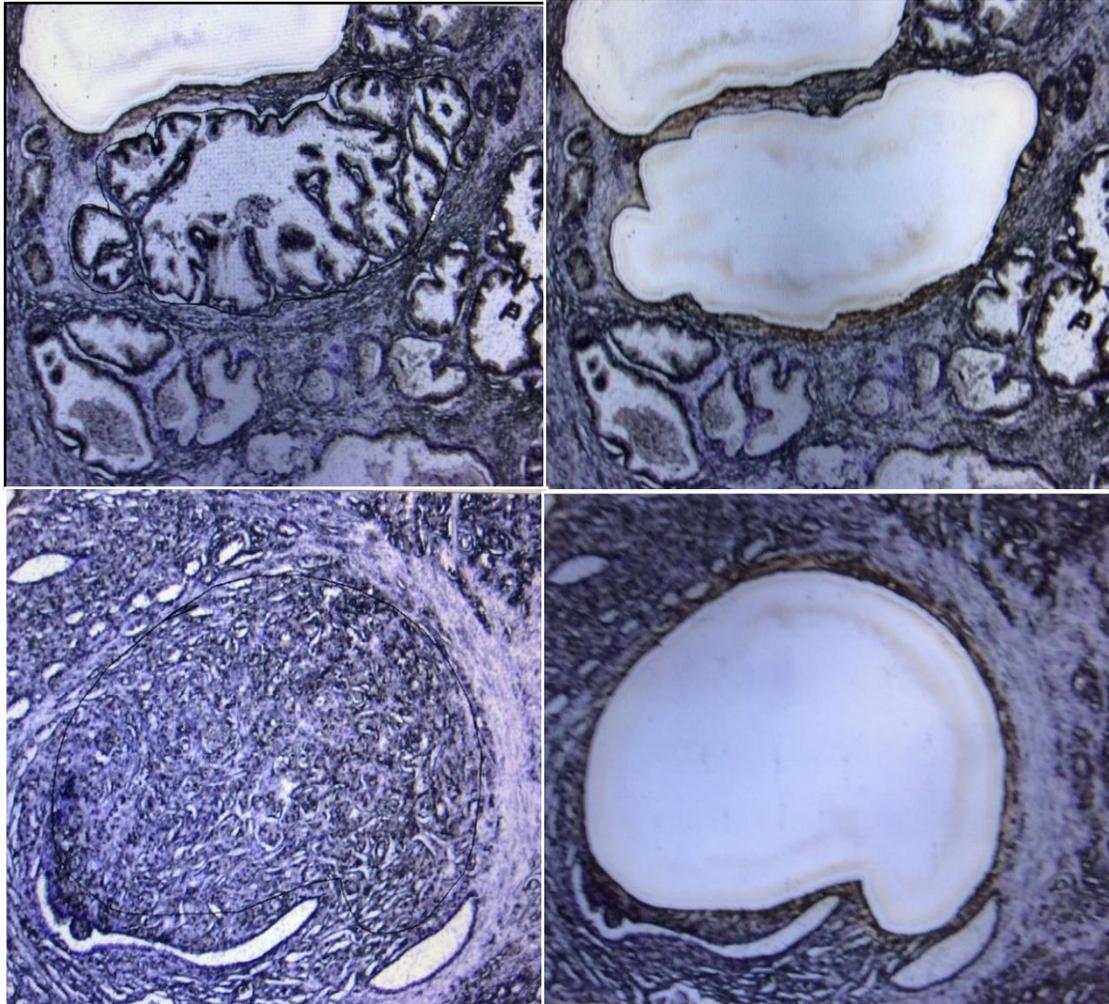


Figura 27. Tejido prostático benigno y con adenocarcinoma antes y después de la LCM. Fueron tomadas microfotografías durante la microdissección para validar la exactitud en la obtención del tejido de cada una de las lesiones. Arriba, izquierda: TPB con acino prostático y espacio dejado por acino vecino microdisecado. Arriba, derecha: TPB con espacios dejados por dos acinos microdisecados. Abajo, izquierda: foco tumoral de CaP Abajo, derecha: espacio dejado por el foco tumoral microdisecado. (Fotografías tomadas durante el procedimiento en Johns Hopkins University, Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center, (Baltimore, MD, USA)).

Luego, se procedió a hacer un primer lavado con el buffer de lavado 1. Para eliminar el DNA se adicionó a la columna una mezcla de 2 μL de DNAsa con 18 μL del buffer de DNAsa, y se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente. Se agregó de nuevo el buffer de lavado 1, se centrifugó, se agregó en dos ocasiones el buffer de lavado 2, y tras centrifugar se transfirió la columna a un tubo de 0.5 μL . Se agregaron 12 μL de buffer de elución directo en la membrana de purificación para asegurar máxima absorción del buffer por la membrana, se incubó por 1 minuto a temperatura ambiente y se centrifugó a 100 g por 1 minuto, y luego, a 16000 g por 1 minuto. El RNA eluido se almacenó a -80°C . La concentración y calidad del RNA total obtenido de los tejidos microdisecados fue determinada por espectrofotometría a una relación OD260/OD280 usando NanoDrop 2000[®] (Thermo Scientific). Las muestras contenían entre 6.7 y 122.5 ng/ μL de RNA (Tabla 10).

7.1.4 Bloques de tejidos fijados en formol e incluidos en parafina

La expresión de microRNAs se evaluó también en muestras de TPB, PIA y CaP disecadas manualmente a partir de bloques de tejido FFPE de pacientes con diagnóstico histopatológico de adenocarcinoma prostático. A partir de estos bloques FFPE se obtuvo tejido con CaP, con PIA, y tejido prostático benigno.

Todos los casos fueron clasificados como adenocarcinoma localizado, con puntajes de Gleason entre 6 y 9, sin evidencia de metástasis, por lo que habían sido manejados con resección quirúrgica. Las variables clínicas se presentan en la tabla 11 (Tabla 11).

Inicialmente se revisaron los cortes histológicos teñidos con coloración de rutina (H&E) para determinar las áreas a escoger y se seleccionaron áreas representativas de CaP, PIA, y de tejido prostático benigno para evaluar la expresión de los microRNAs.

7.1.4.1 Obtención de tejido disecado manualmente a partir de los bloques de tejido prostático FFPE

La preparación de los bloques de tejido FFPE y los cortes de estos, fue realizada en el Laboratorio de Histopatología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Cartagena, con la participación de una Citohistotecnóloga debidamente capacitada. A los bloques de tejido FFPE se les retiró el exceso de parafina, se dibujó el área de interés, (acinos prostáticos benignos, acinos prostáticos con PIA, o áreas de CaP), en el corte con H&E, y en el bloque correspondiente, de modo que los bloques fueron tallados manualmente para cortar solo dicha área. Los bloques de tejido fueron colocados en un micrótopo Leica® para tomar nuevos cortes, el cual se limpió previamente, y se le instaló una nueva cuchilla desechable. Tras descartar los primeros tres cortes, se tomaron de dos a seis cortes con espesor entre 10 y 15 μm (dependiendo del área de tejido escogida para la extracción de RNA), que se depositaron directamente a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, previamente rotulado con el número del caso y el tipo específico de lesión seleccionada en el bloque. El porcentaje de tumor en las áreas de tejido con CaP escogidas fue mayor de 80%. De forma similar, el porcentaje de acinos prostáticos de morfología habitual en las áreas de tejido prostático benigno escogidas fue mayor de 80%.

Tabla 11. Muestras de bloques de tejido prostático FFPE disecadas manualmente, y RNA obtenido

Edad	
Media (\pm DE)	68,05 (9,010)
n=22	
Volumen de tejido (mm ³)	
Media (\pm DE)	1,38 (0,792)
n=50	
Concentración de RNA (ng/ μ L)	
Media (\pm DE)	221,8 (214,3)
n=50	
Relación 260/280 nm	
Media (\pm DE)	1,76 (0,115)
n=50	
Muestras de TPB	21
Muestras de PIA	8
Muestras de CaP	21
CaP de bajo grado	9
CaP grado intermedio	7
CaP de alto grado	5

7.1.4.2 Obtención de RNA de los cortes de tejido prostático FFPE

El RNA total de las muestras respectivas de TPB, PIA y adenocarcinoma, fue extraído usando el estuche comercial miRNeasy FFPE[®] (Qiagen). Cada corte de tejido fue depositado en un tubo de microcentrífuga con 160 μ L de solución de desparafinización[®] (Qiagen) e incubado por 15 minutos a 56°C para fundir la parafina. Se agregaron 150 μ L

de buffer de lisis (PKD), se centrifugó por 1 minuto a 11.000 g, se extrajo la fase clara inferior y se le agregó 10 μ L de proteinasa K y se incubó primero por 60 minutos a 56°C para liberar el RNA de las muestras de tejido, y seguidamente por 15 minutos a 80°C para revertir las modificaciones al RNA producidas por el formaldehído. Se transfirió la fase inferior clara a otro tubo y se centrifugó por 15 minutos a 20.000 g; el sobrenadante fue transferido a otro tubo e incubado a temperatura ambiente durante 15 minutos con DNAsa y buffer DNase booster para eliminar el DNA genómico. Posteriormente las muestras fueron mezcladas con 320 μ L de buffer RBC, y 1120 μ L de etanol, colocadas en la columna de elución, lavadas dos veces con buffer RPE, y finalmente el RNA fue eluido con 20 μ L de agua libre de RNAsas. La concentración y calidad del RNA total de los tejidos microdisecados fue evaluada por espectrofotometría, por relación 260/280 usando NanoDrop 2000c[®] (Thermo Scientific[®]).

7.1.5 Síntesis de cDNA

Para evaluar la expresión de los microRNAs se utilizó el estuche miScript PCR[®] (Qiagen), que permite la detección de múltiples microRNAs a partir de un único cDNA. Para cada muestra a analizar se obtuvo cDNA a partir de 2 μ g de RNA total aislado de las diferentes lesiones prostáticas provenientes tanto de las muestras obtenidas por microdisección por captura láser, como de las muestras obtenidas manualmente de los tejidos FFPE. La síntesis de cDNA se realizó con el estuche comercial miScript II RT[®] (Qiagen), mediante el cual los microRNAs maduros son poliadenilados por una poli-A polimerasa y luego transcritos inversamente en cDNA usando cebadores oligo-dT. Para esto se usó el buffer 5X miScript HiSpec incluido en el estuche, específico para preparar cDNA para la cuantificación subsecuente de microRNAs maduros. En detalle, se tomaron 2 μ g de RNA

de cada muestra para preparar la master mix de transcripción reversa: 4 µL de 5X miScript HiSpec Buffer, 2 µL de 10X miScript Nucleics Mix, 2 µL de miScript Reverse Transcriptase Mix, volumen de RNA equivalente a 2 µg, y volumen variable de agua, para un volumen final de reacción de 20 µL. Se procedió a incubar a 37°C por 60 minutos, y luego se incubó a 95°C por 5 minutos para inactivar la miScript Reverse Transcriptase Mix. El cDNA fue almacenado a -20 °C hasta su utilización en los ensayos de RT-qPCR.

7.1.6 PCR cuantitativa en tiempo real

La expresión de microRNAs se evaluó con el estuche comercial miScript SYBR Green PCR® (Qiagen®), con RNA total aislado de cada lesión y con cebadores específicos previamente diseñados para los microRNAs escogidos (Tabla 12). Los niveles de expresión de los microRNAs fueron normalizados a los niveles de expresión del gen de referencia RNA nuclear pequeño U6, y se adquirieron curvas de fusión para monitorear la calidad de la reacción. Cada muestra fue analizada en duplicado y se usó un blanco en cada reacción y como calibrador el tejido prostático benigno previamente seleccionado.

Tabla 12 Tabla de cebadores de microRNAs

microRNA	SECUENCIA DEL CEBADOR
hsa-miR-155	5- GTG GGTTAATGC TAATCG TGA T -3
hsa-mir-9	5- TCTTTGGTTATCTAGCTGTATGA -3

7.1.7 Análisis de expresión de microRNAs

El cálculo de la expresión se llevó a cabo utilizando el método comparativo $\Delta\Delta C_t$ ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Para las muestras de adenocarcinoma, HGPIN y PIA obtenidas por microdissección por captura láser, las diferencias de expresión para cada microRNA se determinaron comparativamente con los niveles de expresión del tejido prostático benigno. Para las muestras de adenocarcinoma y PIA obtenidas manualmente a partir de tejido FFPE, las diferencias de expresión para cada microRNA se determinaron comparativamente con los niveles de expresión del tejido prostático benigno.

7.2 RESULTADOS

7.2.1 Características del RNA obtenido

7.2.1.1 RNA extraído de las muestras de tejido prostático obtenidas por LCM

Los niveles de expresión de los microRNAs se evaluaron en muestras obtenidas a partir de 6 bloques de tejido FFPE, provenientes de tres especímenes de prostatectomía radical de pacientes con diagnóstico de CaP, los cuales contaban con un tiempo medio de almacenamiento de 12 meses. Durante el procedimiento de microdissección laser se obtuvieron cuatro tipos de muestras correspondientes al componente epitelial de: acinos prostáticos benignos (TPB), PIA, HGPIN y CaP. En la figura 27 se muestran ejemplos de las muestras microdissecadas (Figura 27). El valor medio de las relaciones de absorbancia a longitudes de onda 260/280 fue de 1,71 (IC 95% 1,603- 1,817). La concentración del RNA obtenido estuvo entre 6.7 y 122.5 ng/ μ L de RNA, el valor medio fue de 40,16 ng/ μ L (IC 95% 8,798 - 71,52).

7.2.1.2 RNA extraído de las muestras de tejido prostático obtenidas por disección manual

De los bloques disecados manualmente se obtuvieron tres tipos de muestras correspondientes al componente epitelial de: acinos prostáticos benignos (TPB), PIA, y CaP. Se obtuvo RNA de muestras provenientes de 50 bloques de tejido FFPE los cuales contaban con un tiempo medio de almacenamiento de 30 meses (\pm DE 12,07). El valor medio de las relaciones de absorbancia a longitudes de onda 260/280 fue de 1,75 (IC 95% 1,72-1,78). Se observó una diferencia significativa en las relaciones de absorbancia a longitudes de onda 260/280 entre el RNA obtenido de los bloques almacenados por menos de 18 meses, y las obtenidas de los bloques almacenados por más de 43 hasta 48 meses (Prueba ANOVA) (Tabla 13).

La concentración del RNA obtenido estuvo entre 15.5 y 1008 ng/ μ L de RNA, en promedio fue de 139,5 ng/ μ L (IC 95% 160,91-282,72). No se encontró una diferencia significativa en la concentración del RNA obtenido de los bloques almacenados durante diferentes periodos de tiempo comprendidos entre menos de 12 meses, hasta 48 meses (Prueba ANOVA) (Tabla 13).

La correlación entre la concentración del RNA, y la calidad del RNA, determinada por la relación de absorbancias a longitudes de onda 260/280, con el tiempo de almacenamiento de las muestras, y el volumen de tejido estudiado, fueron determinadas mediante correlación de Spearman (Tabla 14). Los resultados muestran una clara asociación directa y estadísticamente significativa entre la concentración de RNA y la calidad del RNA obtenido (Figura 28).

Tabla 13. Características del RNA obtenido en relación con el tiempo de almacenamiento (en meses) de los bloques de tejido prostático FFPE

		Tiempo de almacenamiento de los bloques de tejido prostático FFPE						Valor p
		< 18 meses	18-24 meses	25-30 meses	31-36 meses	37-42 meses	43-48 meses	
		(n=9)	(n=6)	(n=10)	(n=8)	(n=5)	(n=12)	
Características del RNA								
Relación 260/280	Media (±DE)	1,848 (0,051)	1,732 (0,061)	1,757 (0,103)	1,809 (0,135)	1,694 (0,061)	1,680 (0,127)	0,0076*
	IC 95%	(1,808-1,888)	(1,668-1,796)	(1,683-1,831)	(1,695-1,922)	(1,617-1,771)	(1,599-1,761)	
Concentración ng/μL	Media (±DE)	297,6 (131,1)	75,11 (46,25)	260,5 (208,8)	291,0 (320,3)	77,26 (44,3)	220,3(242,2)	0,1918*
	IC 95%	(196,8-398,3)	(26,57-123,7)	(111,1-409,9)	(23,15-558,8)	(22,14-132,4)	(66,41-374,1)	

* Prueba ANOVA

Tabla 14. Correlación entre tiempo de almacenamiento de los bloques, volumen de tejido estudiado, calidad del RNA, y concentración del RNA obtenido

		Tiempo de almacenamiento del bloque (años) Media: 30,90 (IC95%: 27,47- 34,33)	Volumen de tejido (mm ³) Media: 1,38 (IC95%: 1,15- 1,60)	Relación de absorbancia 260/280 Media: 1,76 (IC95%: 1,72- 1,79)	Concentración de RNA (ng/μl) Media: 221,8 (IC95%: 160,9- 282,7)
Tiempo de almacenamiento del bloque (años)	Rho	1,000	0,210	- 0,393**	- 0,173
	p	.	0,144	0,005	0,228
Volumen de tejido	Rho	0,210	1,000	-0,053	0,007
	p	0,144	.	0,715	0,960
Relación de absorbancia 260/280	Rho	-0,393**	-0,053	1,000	0,612**
	p	0,005	0,715	.	0,000
Concentración de RNA (ng/μL)	Rho	-0,173	-,043	0,612**	1,000
	p	0,228	,765	0,000	.

Se demostró una asociación inversa y estadísticamente significativa entre el tiempo de almacenamiento del bloque y la calidad del RNA. Mientras que la cantidad de tejido estudiado no estuvo asociada con la calidad del RNA. Estos resultados indican una pérdida de la calidad de los transcritos que aumenta con el paso del tiempo. La concentración de RNA obtenido no fue afectada por el tiempo de almacenamiento del bloque, ni por el volumen de tejido estudiado (Figura 29).

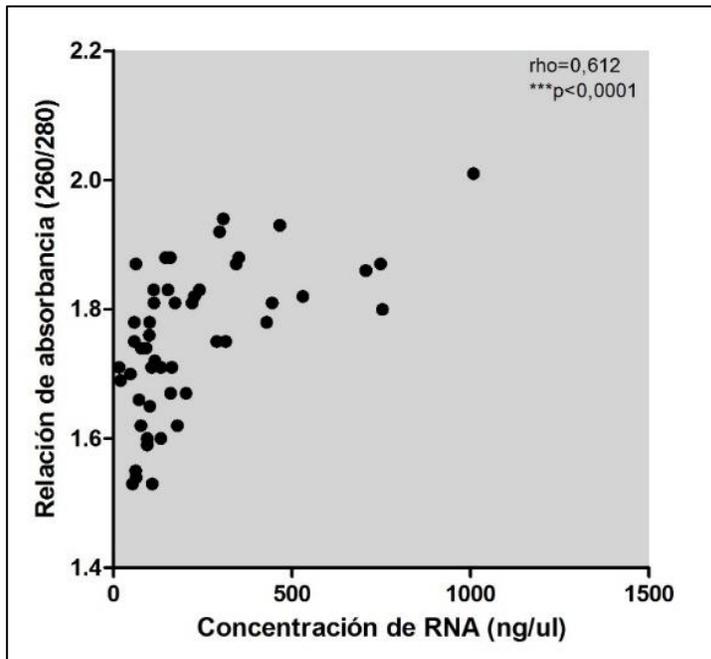


Figura 28. Asociación entre concentración y calidad del RNA obtenido. Se determinó la correlación entre la calidad del RNA (relación de absorbancia 260/280), y la concentración de RNA obtenida, encontrándose que estuvieron directamente asociadas. Se indican los coeficientes de correlación (rho), la significancia estadística se representa con asteriscos, (correlación de Spearman).

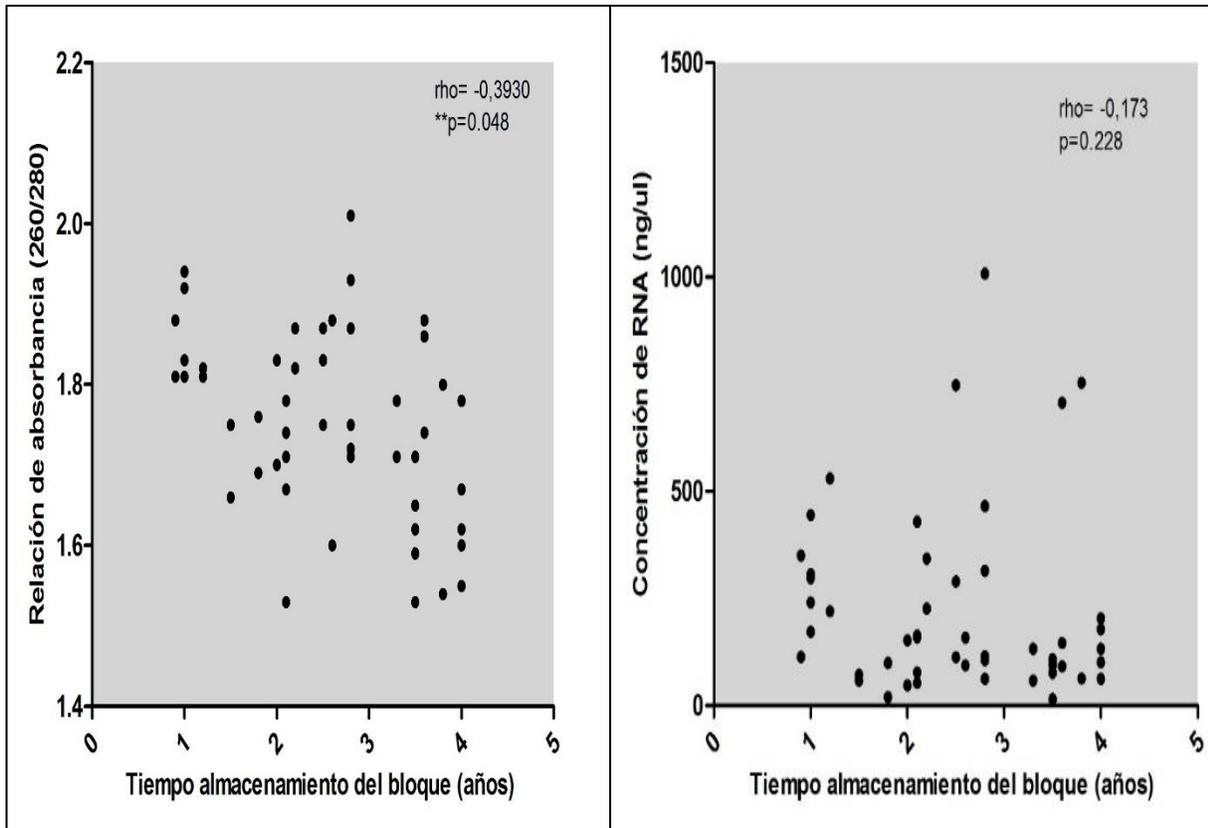


Figura 29. Asociación entre tiempo de almacenamiento del bloque de tejido, y calidad y concentración del RNA. Se determinó la calidad del RNA (relación de absorbancia 260/280), y la concentración de RNA obtenida, en especímenes de prostatectomía almacenados por 1 a 4 años en bloques de parafina, y se correlacionaron con el tiempo de almacenamiento, mediante correlación de Spearman. Las relaciones de absorbancia 260/280 estuvieron inversamente asociadas con el tiempo de almacenamiento del bloque, mientras que la concentración no fue afectada por el tiempo. Se indican los coeficientes de correlación (ρ), la significancia estadística se representa con asteriscos.

7.2.2 Expresión de RNU6 en las muestras de tejido prostático estudiadas

Para estudiar la influencia del tipo de muestra, la calidad del RNA, la concentración de RNA obtenida, y el tiempo de almacenamiento de los bloques, en el nivel de expresión observado de RNU6, se determinó la correlación entre el Ct de RNU6 y estos parámetros, mediante correlación de Spearman. No hubo una diferencia significativa entre el nivel de expresión de RNU6 y el tipo de lesión en los tejidos estudiados ($p=0,4711$, prueba ANOVA) (Figura 30). Las relaciones de absorbancia a 260/280 estuvieron inversamente asociadas con el Ct de RNU6, indicando que la calidad del RNA influyó en forma directa con el nivel de expresión de RNU6. El tiempo de almacenamiento del bloque se asoció en forma directa con el Ct de RNU6, lo que indica que a mayor tiempo de almacenamiento del bloque se obtuvo menor nivel de expresión de RNU6. Mientras que la concentración no influyó en el nivel de expresión de RNU6 (Figura 31).

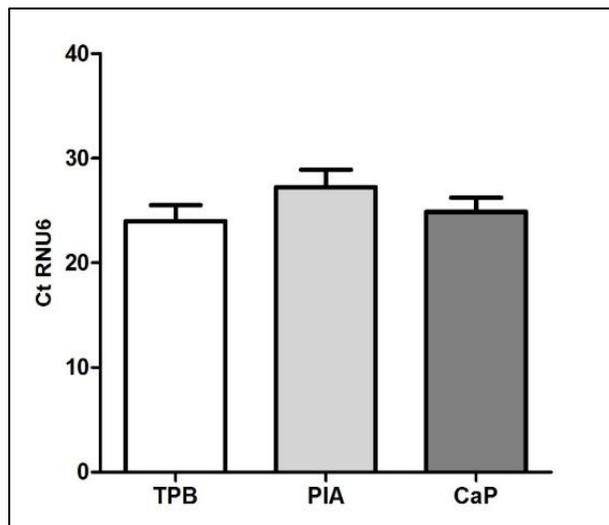


Figura 30. Niveles de expresión de RNU6 en las diferentes lesiones en tejido prostático. Se compararon los niveles medios de expresión de RNU6, sin encontrarse diferencia significativa entre los grupos, ($p=0,471$, prueba ANOVA).

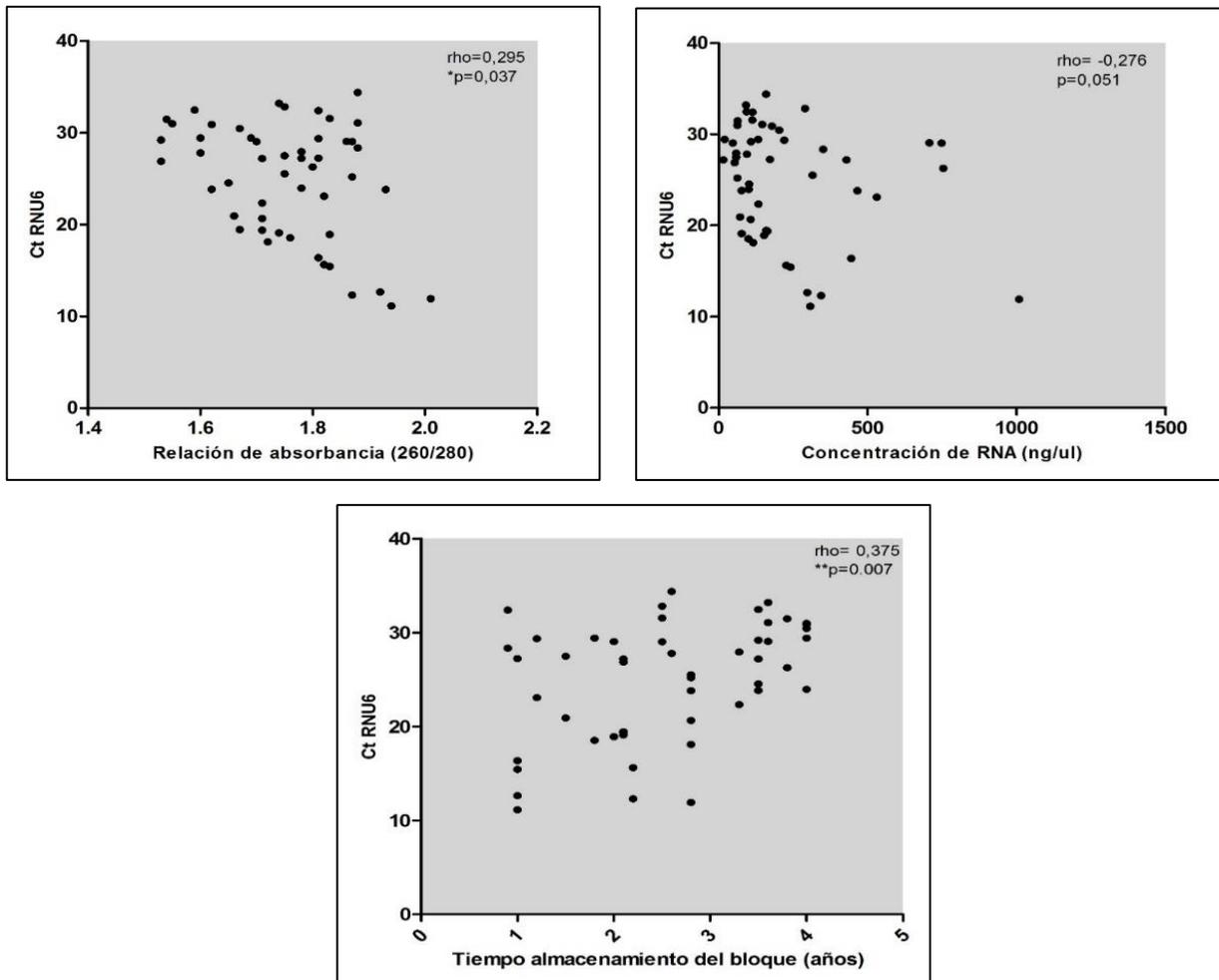


Figura 31. Asociación entre tiempo de almacenamiento del bloque de tejido, calidad, y concentración del RNA, con niveles de expresión de RNU6. Se determinó la correlación entre el Ct de RNU6, con la calidad del RNA (relación de absorbancia 260/280), la concentración de RNA obtenida, y el tiempo de almacenamiento de los bloques de tejido FFPE, mediante correlación de Spearman. Las relaciones de absorbancia 260/280 estuvieron inversamente asociadas con el Ct de RNU6, el tiempo de almacenamiento del bloque se asoció en forma directa con el Ct de RNU6, mientras que la concentración de RNA no influyó en el Ct de RNU6. Se indican los coeficientes de correlación (rho), la significancia estadística se representa con asteriscos.

7.2.3 Análisis de expresión a nivel de transcritos de los microRNAs expresados diferencialmente en las líneas celulares de CaP

Se llevó a cabo el análisis de la expresión génica, mediante RT-qPCR, de los dos microRNAs seleccionados entre el grupo de microRNAs encontrados expresados diferencialmente en las líneas celulares: miR-9 y miR-155. Se realizó, en el grupo de muestras de TPB, PIA y CaP obtenidas por disección manual de los bloques de tejidos, y en las muestras de TPB, PIA, HGPIN y CaP obtenidas por LCM.

7.2.3.1 Expresión de microRNAs a nivel de transcritos en muestras de TPB, PIA y CaP obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE

Para evaluar la expresión de ambos microRNAs se incluyeron 22 casos con diagnóstico histopatológico de CaP, con rango de edad entre 50 y 82 años. De estos casos se seleccionaron y se disecaron manualmente un total 50 muestras de tejido prostático, compuestas por 21 muestras de TPB, 8 muestras de PIA, y 21 muestras de CaP que incluyeron: 9 muestras de CaP de bajo grado, 7 muestras de CaP de grado intermedio y 5 muestras de CaP de alto grado, respectivamente (Tabla 11).

Sin embargo, hubo un grupo de muestras que mostraron niveles altos de expresión de RNU6, por lo que se escogieron las muestras con mejor calidad del RNA y menores valores de Ct de RNU6 para llevar a cabo el análisis. De modo que el análisis final de la expresión de los microRNAs en las muestras de tejido obtenidas por disección manual se llevó a cabo en 18 muestras compuestas por: 11 muestras de TPB, 2 muestras de PIA, y 5 muestras de CaP que incluyeron: 3 muestras de CaP de bajo grado, y 2 muestras de CaP de alto grado, respectivamente. Sólo dos muestras del grupo de PIA cumplieron con los requisitos establecidos para el análisis, por lo que no se pudo incluir esta lesión

en las pruebas estadísticas para comparación de los niveles medios de expresión de los microRNAs, en las muestras de tejido disecadas manualmente.

7.2.3.1.1 Expresión de miR-9 a nivel de transcritos en muestras de TPB y CaP obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE

Los niveles de expresión de miR-9 mostraron tendencia a mayor expresión en las muestras de CaP en general, comparadas con las muestras de TPB, sin embargo, la diferencia no alcanzó un nivel de significancia estadística ($p=0,496$, prueba t), tal vez debido a heterogeneidad en la expresión de miR-9 en estas muestras. (Tabla 15; Figura 32). Debido al número de casos analizados no fue posible comparar la expresión de miR-9 entre las muestras de TPB, y las de CaP de bajo grado, intermedio y alto grado,

7.2.3.1.2 Expresión de miR-155 a nivel de transcritos en muestras de TPB y CaP obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE

Los niveles de expresión de miR-155 mostraron tendencia a menor expresión en las muestras de CaP en general, comparadas con las muestras de TPB, sin embargo, la diferencia no alcanzó un nivel de significancia estadística ($p= 0,582$, prueba t), tal vez debido a heterogeneidad en la expresión de miR-155 en estas muestras. (Tabla 16; Figura 33). Igual que en el análisis de la expresión de miR-9, debido al bajo número de muestras analizadas no fue posible comparar la expresión de miR-155 entre las muestras de TPB, y las de CaP de bajo grado, intermedio y alto grado.

Tabla 15. Niveles de transcritos de miR-9 en muestras de TPB y CaP obtenidas por disección manual de bloques de tejido prostático FFPE

Tipo de muestra	CT medio (SD) del miRNA blanco y de RNU6		Fold change (Media)	p
	miR-9	RNU6	miR-9	
TPB (11)	27,22 (\pm 3,85)	19,76 (\pm 3,71)	9,01	
CaP (5)	23,81 (\pm 5,42)	17,76 (\pm 5,08)	47,99	0,1841*

*valor p de prueba t entre CaP y TPB

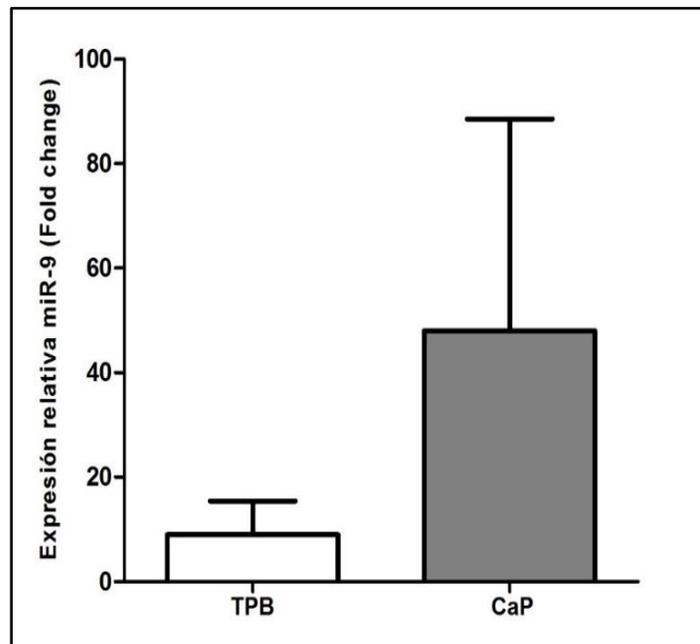


Figura 32. Perfil de expresión de miR-9 en muestras de tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático, obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE. Los niveles de expresión de miR-9 fueron cuantificados por RT-qPCR, en muestras de TPB (n = 11) y CaP (n = 5). La diferencia de expresión de miR-9 entre TPB y CaP se determinó por comparación con los niveles de expresión del RNU6 en cada grupo de muestras, usando el método Ct. (Valor p= 0,4967, prueba t).

Tabla 16. Niveles de transcritos de miR155 en muestras de TPB y CaP obtenidas por disección manual de bloques de tejido prostático FFPE

Tipo de muestra	CT medio (SD) del miRNA blanco y de RNU6		Fold change (Media)	p
	miR-155	RNU6	miR-155	
TPB (12)	22,92 (±4,05)	20,11 (±3,74)	5,39	0,582*
CaP (7)	24,07 (±4,84)	19,38 (±4,99)	3,79	

*valor p de prueba t entre CaP y TPB.

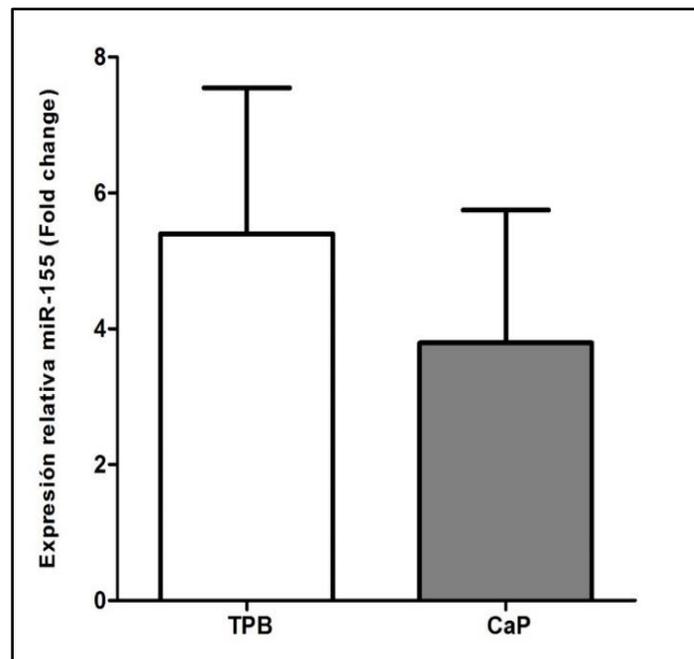


Figura 33. Perfil de expresión de miR-155 en muestras de tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático, obtenidas por disección manual de tejido prostático FFPE. Los niveles de expresión de miR-155 fueron cuantificados por RT-qPCR en muestras de TPB (n = 12) y CaP (n = 7). La diferencia de expresión de miR155 se determinó por comparación con los niveles de expresión del RNU6 en cada grupo de muestras, usando el método Ct, (p= 0,5828, prueba t).

7.2.3.2 Expresión de microRNAs a nivel de transcritos en muestras de TPB, PIA HGPIN y CaP obtenidas por LCM

Para evaluar la expresión de miR-9 y miR-155 en forma específica en el tejido epitelial benigno prostático y el componente epitelial de las lesiones planteadas en la progresión del CaP, se analizaron los datos de los “Fold changes” obtenidos por RT-qPCR, para cada uno de los dos microRNAs estudiados, en cada una de las de 12 muestras obtenidas durante el procedimiento de microdissección laser. Las 12 muestras correspondían a 3 muestras de TPB, 3 muestras de PIA, 3 muestras de HGPIN, y 3 muestras de CaP, obtenidas del componente epitelial de: acinos prostáticos benignos, PIA, HGPIN y CaP de cada uno de los 3 casos procesados (Tabla 10).

7.2.3.2.1 Expresión de miR-9 a nivel de transcritos en muestras de TPB, PIA HGPIN y CaP obtenidas por LCM

Los Ct obtenidos para este microRNA fueron indeterminados en algunas muestras, y en otras se observó doble pico en la curva de fusión, por lo cual no se pudo realizar la comparación en los niveles de expresión de miR-9 entre el TPB y las lesiones estudiadas.

7.2.3.2.2 Expresión de miR-155 a nivel de transcritos en muestras de TPB, PIA HGPIN y CaP obtenidas por LCM

La diferencia de expresión de miR155 en PIA, HGPIN y CaP se determinó por comparación con los niveles de expresión del RNU6, y se usó como calibrador su nivel de expresión en las muestras de TPB.

Los niveles de expresión de miR-155 mostraron tendencia a menor expresión en las muestras de PIA, HGPIN y CaP, comparadas con las muestras de TPB, sin embargo, la diferencia no alcanzó un nivel de significancia estadística ($p= 0,0645$, prueba ANOVA),

tal vez debido a heterogeneidad en la expresión de miR-155 en estas muestras. (Tabla 17; Figura 34).

Se encontró una tendencia a menor expresión de miR-155, en las muestras de CaP, comparadas con las muestras de TPB, sin embargo, para ninguno de los dos microRNAs estudiados se alcanzó un nivel de significancia estadística, tal vez debido a heterogeneidad en la expresión de estos microRNAs, a un nivel muy bajo de expresión, o a características propias del tipo de tejido del que se obtuvieron las muestras (Figura 35).

Tabla 17. Niveles de transcritos de miR155 en muestras de TPB, PIA, HGPIN y CaP obtenidas por LCM

Tipo de muestra	Fold change miR-155 Media, (\pmDE)	Valor p
TPB (3)	2,065 (\pm 1,807)	
PIA (3)	0,07970 (\pm 0,07954)	0,0645*
HGPIN (3)	0,06552 (\pm 0,00055)	
CaP (3)	0,08432 (\pm 0,05015)	

*prueba ANOVA

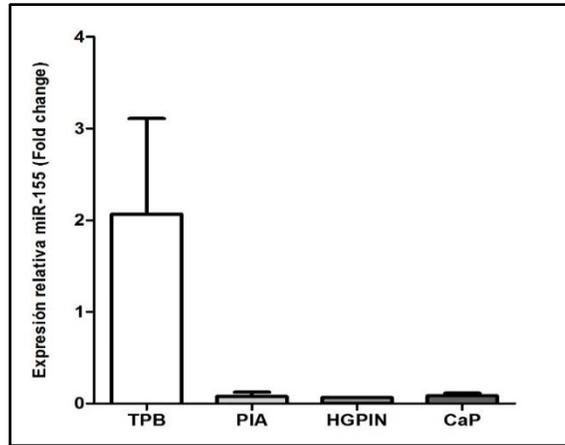


Figura 34. Perfil de expresión de miR-155 en muestras de TPB, PIA, HGPIN y CaP, obtenidas por LCM. Los niveles de expresión de miR-155 fueron cuantificados por RT-qPCR en muestras de TPB (n = 3), PIA (n = 3), HGPIN (n = 3), y CaP (n = 3) obtenidas por LCM. La diferencia de expresión de miR155 se determinó usando el método Ct por comparación con los niveles de expresión del RNU6 en cada grupo de muestras, valor $p = 0,0645$, prueba ANOVA.

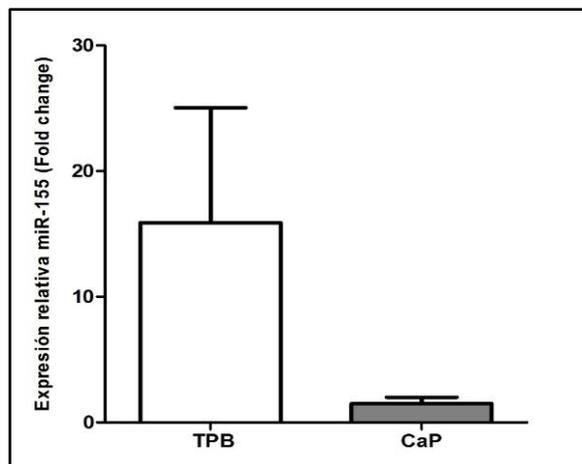


Figura 35. Perfil de expresión de miR-155 en muestras de tejido prostático benigno y adenocarcinoma prostático, obtenidas por LCM. Los niveles de expresión de miR-155 fueron cuantificados por RT-qPCR en muestras de TPB (n = 3) y CaP (n = 3) obtenidas por LCM. La diferencia de expresión de miR155 se determinó usando el método Ct por comparación con los niveles de expresión del RNU6 en cada grupo de muestras, valor $p = 0,1916$, prueba t.

8. DISCUSIÓN

8.1 ASOCIACIÓN ENTRE INFLAMACIÓN, ATROFIA, ATROFIA INFLAMATORIA PROLIFERATIVA (PIA), Y NEOPLASIA INTRAEPITELIAL PROSTÁTICA DE ALTO GRADO (HGPIIN), CON LA PRESENCIA DE ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

La inflamación prostática crónica y su papel potencial en la carcinogénesis sigue siendo objeto de estudio, con evidencias cada vez más fuertes en favor de su posible implicación en el desarrollo del CaP (8, 42, 47, 74, 75).

Se conoce poco acerca de la presencia de inflamación en el tejido prostático de pacientes sin condiciones prostáticas clínicas, debido a la dificultad para obtener muestras para su estudio. En las biopsias de próstata realizadas debido a niveles séricos elevados de PSA, o, a un EDR anormal, frecuentemente se encuentra inflamación (233-237), aunque su prevalencia es variable, tal vez debido a que este hallazgo usualmente no es reportado por los patólogos (235). En el presente estudio se encontró una alta prevalencia de inflamación crónica, presente tanto en las biopsias con CaP, como en las biopsias negativas para tumor.

Varios estudios han encontrado asociaciones tanto positivas como negativas entre inflamación e incidencia de CaP. MacLennan *et al* reportaron una alta incidencia de CaP tras 5 años de seguimiento, en casos con inflamación crónica en la biopsia inicial (76). En un estudio de casos y controles realizado por Gurel *et al*, la probabilidad de CaP fue más alta en los hombres que tenían inflamación en el tejido prostático benigno en los cilindros de biopsia (75).

En el estudio prospectivo de cohorte realizado por Cheng *et al*, en hombres afroamericanos, asiático-americanos, latinos y blancos, la gran diversidad sociodemográfica de su población y el amplio rango de historia de prostatitis crónica y de enfermedades de transmisión sexual, les permitió estudiar la influencia de estas condiciones en el desarrollo del CaP. Encontraron que los hombres con historia de prostatitis tenían un riesgo significativamente más alto de desarrollar CaP, igualmente aquellos con mayor tiempo de duración de los síntomas. En cuanto al grupo étnico, los latinos con historia de enfermedad de transmisión sexual también tuvieron mayor riesgo de CaP, que aquellos sin este antecedente (238).

Otros en cambio han reportado una asociación negativa. Como Terakawa *et al* quienes encontraron que la inflamación fue más frecuente en enfermedades prostáticas benignas, y la ausencia de inflamación crónica en la próstata estuvo asociada con un riesgo tres veces más alto para CaP (239). Wolters *et al* siguieron a 121 pacientes con biopsia de próstata inicial benigna, con repetición de la biopsia cuatro años más tarde, reportando que la inflamación presente en la biopsia inicial no fue predictiva de riesgo de cáncer (240). Kryvenko *et al* reportaron que la presencia de cualquier grado de inflamación estuvo asociada con un riesgo disminuido para CaP (241). Otros estudios recientes reportaron un riesgo menor de CaP en biopsias subsecuentes en hombres que tenían inflamación en una biopsia previa negativa (235, 236). También, a diferencia de lo reportado en el estudio de Gurel *et al*, en el grupo tratado con finasteride no hubo una asociación estadísticamente significativa entre la prevalencia y extensión de la inflamación en las biopsias, y la probabilidad de CaP (242) .

Una posible explicación para estos resultados discordantes puede estar relacionada con las características de las poblaciones estudiadas. Los estudios de seguimiento que mostraron un riesgo disminuido para CaP en relación con inflamación crónica incluyeron hombres que habían tenido una biopsia negativa posterior a la elevación de los niveles séricos de PSA. Es posible que las biopsias negativas en estos hombres indicaran que el principal responsable de sus altos niveles de PSA fuese la inflamación tisular y no el cáncer; esto puede explicar la relación entre la inflamación y el riesgo bajo de CaP en estos estudios. En contraste, el estudio de McLennan incluyó pacientes con hallazgos clínicos sugestivos de adenocarcinoma (76) , y el estudio de Gurel restringió el análisis a casos y controles con niveles bajos de PSA al momento de la biopsia, y a casos y controles sin indicación para biopsia evitando el sesgo del nivel elevado de PSA como indicación de la biopsia prostática (75).

La inflamación prostática puede contribuir en forma importante al aumento de los niveles séricos de PSA en hombres sin CaP (75), con evidencia histológica de inflamación crónica en un porcentaje alto de hombres sometidos a biopsia transrectal de próstata por aumento del PSA, o por EDR anormal (234).

En el presente estudio, se encontró mayor frecuencia de inflamación en casos con cáncer. El análisis univariado mostró una asociación significativa entre la inflamación y el adenocarcinoma, aunque la significancia estadística de esta asociación se perdió después de ajustarla a la presencia de HGPIN y PIA en el análisis multivariado. A pesar de esto, se observó una probabilidad más alta de CaP en los casos que tenían al menos un cilindro de biopsia con inflamación moderada/severa, en comparación con los casos en los que este grado de inflamación no se observó en ninguno de los cilindros de tejido

estudiados. De modo que la presencia de inflamación de alto grado puede estar asociada a riesgo aumentado de adenocarcinoma. Este hallazgo concuerda con lo reportado por Gurel quien mostró asociación con CaP tanto en los casos con al menos un cilindro con inflamación, como en los casos con mayor número de cilindros con inflamación (75).

En relación con la localización de la inflamación, Kryvenko *et al* recientemente reportaron que la inflamación estromal estuvo asociada con menor riesgo de CaP. En contraste en el presente estudio este tipo de asociación se observó en casos con inflamación glandular, y persistió después de ajustarla a la intensidad de la inflamación. La inflamación glandular moderada o severa, usualmente se asoció con infiltrado inflamatorio agudo. Este patrón de inflamación ha sido asociado previamente a retención urinaria aguda (243), prostatitis, HPB, así como a hallazgos histológicos aislados en pacientes asintomáticos (234), y puede estar relacionado con etapas tempranas del proceso inflamatorio. La carcinogénesis prostática en cambio puede involucrar la inflamación crónica, que conlleva un tiempo más largo de exposición a especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y a otros mediadores químicos de la inflamación.

La inflamación intraprostática también ha sido asociada al grado tumoral. Por ejemplo, Gurel *et al* reportaron que tuvo una asociación más fuerte con el CaP de alto grado que con el de bajo grado (75); asociación que no fue encontrada en los casos evaluados en este estudio. Otros dos estudios prospectivos desarrollados en pacientes con CaP, encontraron que los hombres con mayor extensión de la inflamación intraprostática estuvieron asociados a peor pronóstico de la enfermedad (79, 244). Autores como Sfanos y De Marzo, ampliamente dedicados al tema, con base en sus estudios de la infección por *P.acnes* en modelos murinos, han planteado la hipótesis de que la

inflamación crónica observada en los pacientes con CaP puede iniciar mucho tiempo antes al desarrollo del mismo, y persistir independientemente de una alta prevalencia del agente infeccioso causal, lo cual sigue siendo objeto de su investigación (35).

En relación con la atrofia, al igual que en otras investigaciones (79, 123, 128, 241), en el presente estudio se encontró una prevalencia alta de atrofia focal, con PIA como el tipo predominante, y atrofia simple como la forma más frecuente de PIA. La prevalencia de atrofia simple fue similar a la reportada por Asimakopoulos *et al* en especímenes de biopsia benignos, quienes no encontraron asociación significativa entre la incidencia de CaP en una biopsia repetida, con la presencia de atrofia focal en la biopsia inicial (127). Anton *et al* encontraron hiperplasia post-atrónica en cerca de un tercio de las próstatas, pero, no encontraron asociación entre su presencia y la probabilidad de CaP (126). En 202 casos seleccionados al azar del “European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer”, Postma *et al* reportaron que ni el subtipo, ni la extensión de la atrofia, estuvieron asociados significativamente con un diagnóstico subsecuente de CaP (125). En otro estudio, Vral *et al* no pudieron demostrar una asociación entre PIA y la presencia de adenocarcinoma en su evaluación de biopsias prostáticas (123). En este estudio, al igual que en el de Vral *et al*, no se encontró una diferencia significativa en la prevalencia de PIA entre biopsias benignas y biopsias con CaP, al contrario de lo reportado por Kryvenko *et al* quien reportó que los pacientes con atrofia en una biopsia de próstata benigna, tienen un riesgo moderadamente aumentado para CaP (241).

Además, en el presente estudio se observó que a diferencia de lo que sucede con PIA, la atrofia focal de tipo no-PIA fue un hallazgo inusual en biopsias con cáncer. Acorde con

lo reportado por Vral *et al* se encontró que el CaP y las lesiones atróficas tipo no-PIA tienden a ser mutuamente excluyentes en la misma zona del tejido (123).

La inflamación crónica y las lesiones de atrofia focal se encuentran comúnmente en el tejido adyacente al CaP (79, 245). De acuerdo con los resultados que describen a la atrofia simple como la forma predominante de PIA y la asocian con inflamación (6, 94, 123, 124), se encontró una fuerte asociación entre la presencia y la intensidad de la inflamación, con la presencia de PIA.

Un hallazgo interesante fue la diferencia significativa en la intensidad de la inflamación entre los casos con grados bajos de PIA, en comparación con los casos con grados altos de PIA, con una tendencia en los casos con PIA grado 3 y 4 a asociarse con niveles más intensos de inflamación. Esta asociación no había sido reportada previamente y puede sustentar el origen postulado de estas lesiones a partir de la inflamación crónica (6).

Davidson *et al* reportaron previamente que la inflamación crónica fue más común y severa en los casos con hiperplasia post-atrónica. Ellos también encontraron que las lesiones de hiperplasia post-atrónica estuvieron asociadas con HGPIN (79). Billis *et al* no encontraron ninguna lesión de hiperplasia post-atrónica en biopsias sin inflamación (124); en el presente estudio se observó que la hiperplasia post-atrónica estuvo asociada en un porcentaje importante, con inflamación moderada/severa, similar a los hallazgos reportados por Ruska *et al* (94), y Vral *et al* (123). Estos hallazgos también sustentan la naturaleza inflamatoria de esta lesión.

Se confirmaron también las asociaciones previamente reportadas de HGPIN con riesgo aumentado de diagnóstico de CaP. Varios estudios han estimado un riesgo dos a cuatro veces más alto para CaP después de un diagnóstico de HGPIN (246-248). Un alto

porcentaje de los urólogos consideran la presencia de HGPIN, en ausencia de cáncer, como una indicación para repetir la biopsia posteriormente (249), y estudios basados en los resultados de patología han sugerido la necesidad de realizar nueva biopsia después de una biopsia benigna con evidencia de HGPIN (250).

Sin embargo, los hallazgos aquí reportados similar a los reportados por Nonn *et al* (167), pueden no ser generalizados a todos los hombres. Los pacientes incluidos en este estudio fueron candidatos a biopsia de próstata por niveles séricos elevados de PSA, y/o EDR anormal, y por tanto no pueden considerarse representativos de todos los hombres de la misma edad. Dado el rango de edad de nuestra cohorte, y la alta prevalencia de CaP descrita en ancianos (251), algunos de estos hombres con biopsia negativa probablemente tienen un tumor sincrónico que pudo haber sido pasado por alto en la biopsia inicial, y, dado que no fue posible llevar cabo seguimiento a largo plazo, puede existir un sesgo debido a presencia de CaP no diagnosticado. Además, se midió la inflamación en biopsias que fueron usadas para hacer o excluir un diagnóstico de CaP. Por lo tanto, no se puede excluir que la inflamación observada en el tejido benigno sea una respuesta a un tumor no diagnosticado.

Similar a lo descrito en estudios previos, se encontró evidencia de transición morfológica entre PIA y HGPIN, y entre PIA y CaP (6, 86, 90, 96, 100) , en contraste con Anton *et al* quienes no encontraron asociación topográfica entre hiperplasia post-atrónica y focos de CaP (126).La postulación de PIA como una lesión precursora de CaP o HGPIN sigue siendo controversial (92, 128), y su posible origen en la proliferación regenerativa de las células epiteliales prostáticas, en respuesta a la injuria causada por las especies reactivas de oxígeno de origen inflamatorio (6) no ha sido definida.

8.2 EXPRESIÓN DE CXXC5 EN RELACIÓN CON CÁNCER DE PRÓSTATA Y CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

En un estudio previo de nuestro grupo en el que se evaluó mediante RT-qPCR el perfil de expresión de un grupo de genes en líneas celulares prostáticas benignas y con diferentes fenotipos de CaP, se encontró sobre-expresión de CXXC5 en las líneas LNCaP y PC-3 en comparación con la línea celular PWR-1E (20). La expresión de CXXC5 fue evaluada en muestras de tejido prostático benigno y con CaP a nivel del mRNA por medio de RT-qPCR y CISH, y a nivel proteico mediante IHQ, se determinó que el tejido con CaP expresa niveles más altos de CXXC5 que el TPB. La inmunohistoquímica del tejido prostático demostró que la expresión de CXXC5 fue significativamente más fuerte en las células de los acinos tumorales, que en las células epiteliales de los acinos benignos adyacentes, de los mismos pacientes con CaP.

El modelo de progresión del CaP propuesto por De Marzo, une los efectos de la inflamación crónica a las modificaciones moleculares y celulares subyacentes a la patogénesis del CaP. Incluye la lesión de atrofia focal con aumento de la fracción de células epiteliales proliferantes, asociada con inflamación crónica, llamada PIA, (6, 95). Estas lesiones pueden originarse en el contexto del stress oxidativo, y pueden representar una lesión precursora de HGPIN y CaP(8, 11, 42, 47). Se observó aumento en la expresión de CXXC5 a lo largo del modelo propuesto para la progresión del CaP, con sobre-regulación a lo largo del espectro de lesiones pre- malignas de la próstata.

La sobreexpresión de CXXC5 fue reportada previamente por Knappskog *et al* quienes inicialmente describieron un rol importante de CXXC5 en el proceso de tumorigénesis en

tumores sólidos. Estudiaron su patrón de expresión y su posible correlación con varios parámetros clínicos en carcinoma de mama, melanoma maligno y carcinoma papilar de tiroides. Encontraron sobreexpresión significativa de CXXC5 en el tejido maligno comparado con el tejido no tumoral, y postularon a CXXC5 como un factor pronóstico para el cáncer de mama. Basados en sus hallazgos, concluyeron que los altos niveles de expresión de CXXC5 pueden estar relacionados con el potencial maligno de las células tumorales, y puede representar un biomarcador potencial para el diagnóstico de estas neoplasias (213). Además, el hallazgo de que los niveles altos de CXXC5 estuvieron asociados con TP53 “wild-type” puede indicar que los niveles de CXXC5 podrían sustituir a las mutaciones de TP53 como marcador de mal pronóstico en cáncer de mama (213). En acuerdo con los resultados de Knappskog, los resultados aquí reportados aportan evidencia de que el TPB y el CaP expresan CXXC5 en forma diferencial.

Estos hallazgos, y los de Knappskog *et al*, contrastan con los reportes iniciales de Pendino *et al*, quienes describieron expresión aumentada de CXXC5 asociada con el fenotipo no maligno en la línea celular de leucemia NB4 y consideraron a CXXC5 como un candidato fuerte para gen supresor de tumor en la transformación celular mieloide [6]. Sin embargo, en sus hallazgos recientes reportaron que la expresión de CXXC5 muestra una amplia variación en pacientes con LMA, y los niveles altos de expresión están asociados con un pronóstico adverso (21, 252), basados en esas observaciones sugirieron que CXXC5 puede ser considerado como una posible diana terapéutica en LMA (252).

Estos hallazgos sugieren que CXXC5 puede estar involucrado en el proceso de la carcinogénesis prostática, con una relación entre niveles altos de expresión de CXXC5 y la progresión de esta neoplasia. Este estudio constituye un punto de partida para estudios posteriores que determinen el papel biológico y las posibles implicaciones clínicas de la expresión de CXXC5 en el CaP.

8.3 EXPRESIÓN DE FMOD EN RELACIÓN CON CÁNCER DE PRÓSTATA Y CON LA PRESENCIA DE LESIONES PRECURSORAS DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

En muchos tipos de neoplasias se ha sugerido la expresión alterada de uno o más SLRP, como relevantes para el diagnóstico y/o el pronóstico de la enfermedad, a pesar de esto la participación precisa de los proteoglicanos en la carcinogénesis no ha sido demostrada en forma conclusiva (253). La presencia de miembros de la familia de los SLRPs, distintos a fibromodulina, ha sido descrita en la próstata. En el estudio de Suhovskih *et al* se demostró la expresión del conjunto específico de proteoglicanos investigados, en tejido prostático humano normal, localizados en las células epiteliales prostáticas (syndecan-1, glypican-1), y en el estroma (versican, decorin, y lumican). Además se encontró que el CaP se asocia con patrones individuales de expresión de estos proteoglicanos, representados por combinaciones de ellos y de sus niveles de expresión (254).

Los proteoglicanos más estudiados en el CaP son decorin, biglycan y lumican, que participan en la señalización celular y la organización tisular. Se ha planteado que los cambios en las células y en la actividad enzimática del tumor en desarrollo, pueden

alterar la composición y estructura de los proteoglicanos y modificar su función. Estudios recientes sugieren que los tumores, incluyendo el CaP, usan estos cambios para promover su propia supervivencia, crecimiento y diseminación (255).

El conocimiento actual de la expresión y participación del proteoglicano fibromodulina en el cáncer es limitado. Los primeros reportes que asocian fibromodulina con neoplasias provienen de estudios en líneas celulares de leucemia linfocítica crónica de células B (CLL-B), donde se encontró significativamente sobreexpresada (227). Posteriormente se describió como un antígeno asociado a tumor, también en leucemia, debido a su potencial para generar una respuesta antitumoral específica (228, 229).

Oldberg ha descrito que fibromodulina participa en la regulación de la dinámica entre el carcinoma en desarrollo y su estroma acompañante. Planteando que el medio ambiente inflamatorio de los carcinomas en desarrollo induce la producción estromal de fibromodulina, aumentando la densidad y rigidez del tejido (220). Fibromodulina también ha sido implicada en la angiogénesis tumoral. Los hallazgos de Ao *et al*, en el carcinoma de células pequeñas de pulmón sugieren que el estímulo autocrino de fibromodulina en las células cancerosas puede promover la angiogénesis tumoral por sobre-regulación de la expresión de factores angiogénicos, y proponen su silenciamiento como una potencial terapia clínica para reprimir la angiogénesis tumoral (256). Recientemente se ha reportado la expresión y posible participación de fibromodulina en otro proceso neoplásico. Se identificó a FMOD como un gen sobre-regulado en glioblastoma multiforme, debido a pérdida de la metilación de su promotor y se propuso que promueve la migración de las células de glioma por inducción de formación de fibras de estrés de actina filamentosa (257).

En relación con la expresión de fibromodulina en el CaP, sólo se han descrito los estudios previos de nuestro grupo. En un estudio de expresión génica mediante microarreglo, se identificó la expresión de este proteoglicano a nivel de transcritos en líneas celulares de CaP de ratas ACI, iniciando con los estudios de expresión a nivel epitelial de esta proteína, lo que sugirió nuevos roles para esta familia de proteoglicanos (19).

Hasta hace poco no había información de la expresión de fibromodulina en líneas celulares de CaP humano, o en tejido prostático humano normal, benigno o maligno. En el estudio de evaluación de su expresión en líneas celulares prostáticas humanas tumorales y benignas, realizado por nuestro grupo, se encontró alto nivel de expresión de transcritos de FMOD en las líneas tumorales PC3 y LNCaP, en comparación con el nivel de la línea celular epitelial prostática benigna PWR-1E, lo que llevó a sugerir que este proteoglicano podría servir como marcador del potencial metastásico del CaP (20, 24).

Al estudiar la expresión de FMOD en CaP en comparación con TPB, mediante RT-qPCR usando biopsias de tejido prostático de pacientes con CaP y con HPB, los niveles de expresión de FMOD fueron significativamente más altos en el grupo de casos con CaP que en el grupo de casos con HPB (24).

En el presente estudio, la detección mediante IHQ y CISH de fibromodulina en el tejido prostático humano, demostró que su expresión es significativamente más fuerte en las células epiteliales cancerosas que en los acinos prostáticos benignos adyacentes en el tejido del mismo paciente. Igualmente, la expresión de fibromodulina fue significativamente más fuerte en las células cancerosas que en los acinos benignos de otros tejidos de pacientes con HPB (24).

Se ha descrito que el microambiente y los fibroblastos estromales son capaces de inhibir la proliferación tumoral a través de moléculas de señalización secretadas y por interacciones directas célula-célula. En el estudio reciente de Suhovskih *et al*, investigaron esta relación y demostraron que existe un papel instructor de los fibroblastos hacia las células epiteliales prostáticas normales, el cual es revocado por las células cancerosas, mediante la desregulación de la expresión de proteoglicanos y moléculas de unión, y por desorganización de la comunicación fibroblasto-célula cancerosa (258). En este sentido, un hallazgo significativo en este estudio fue la expresión intracelular incrementada de fibromodulina, a nivel de transcritos y a nivel de proteína, en las células epiteliales del CaP en comparación con el estroma tumoral. Esto revela que en la expresión intracelular de este proteoglicano en los tumores de próstata ocurren cambios en su patrón de expresión, cambiando la localización de los niveles altos de expresión en el estroma, hacia las células epiteliales. Estos hallazgos son consistentes con la observación descrita por el grupo de Suhovskih de que en el CaP ocurren cambios complejos en la expresión de otros SLRPs, debido a disminución de la expresión de proteoglicanos estromales, como decorin y lumican, y aumento de la expresión y relocalización de syndecan-1 y glypican-1, así como la aparición de proteoglicanos adicionales como agrecan y NG2 (254).

Otro hallazgo interesante en relación con fibromodulina fue su presencia, a nivel de transcritos y a nivel de proteína, en el núcleo de las células epiteliales, algo que no se ha reportado previamente. Otros estudios han demostrado que diferentes proteoglicanos pueden estar presentes en el núcleo de varios tipos de células tumorales y de fibroblastos estromales (259, 260). Se ha demostrado la translocación nuclear del proteoglicano

transmembrana syndecan-1, en mesotelioma maligno, en varios tipos de adenocarcinoma, y en células de neuroblastoma. Una vez en el núcleo, se sospecha que syndecan-1 podría unirse a factores de crecimiento debido a su estrecha co-localización (261). Otro de los SLRPs, decorin, es expresado en forma aberrante en el núcleo en las líneas celulares humanas *dysplastic oral keratinocytes* (DOK) y de carcinoma de células escamosas (SCC-25), y en células epiteliales orales displásicas y malignas de biopsias de tejidos humanos, se ha sugerido que este decorin nuclear puede jugar un papel en la migración e invasión de las células malignas (262).

La evaluación de la expresión de fibromodulina, tanto a nivel de transcritos, como a nivel de proteína, a lo largo del modelo propuesto para la progresión del CaP, demostró sobre-regulación a lo largo del espectro de lesiones premalignas de la próstata. Fibromodulina está sobre-regulada no solo en CaP, sino también, aunque en menor grado, en HGPIN, y en la lesión propuesta como lesión precursora: PIA, en relación con los acinos benignos.

8.4 FIBROMODULINA EN RELACIÓN CON INFLAMACIÓN, Y PRESENCIA DE CUERPOS AMILÁCEOS EN EL TEJIDO PROSTÁTICO

Un hallazgo llamativo en este estudio fue la tinción fuerte para fibromodulina, observada en los cuerpos amiláceos localizados dentro de algunos acinos prostáticos benignos (24). Algunos estudios han planteado una posible etiología infecciosa en el desarrollo de estos cuerpos, y su alta prevalencia en la próstata del adulto, puede indicar que la inflamación aguda prostática, posiblemente causada por infecciones bacterianas, es más común de lo que se consideraba (35, 36). Esta inflamación también puede estar relacionada con el

traumatismo en el epitelio glandular, que los cuerpos amiláceos pueden causar, con derrame de líquido prostático, e inducción subsecuente de inflamación focal aguda y crónica (8).

Un estudio que analizó los componentes de los cuerpos amiláceos reportó que la proteína más prevalente es la lactoferrina, y que muchas otras de las proteínas predominantes en estas concreciones están involucradas en la inflamación aguda, específicamente proteínas contenidas en los gránulos de los neutrófilos, incluyendo calprotectina, mieloperoxidasa y α -defensinas (36). En otro estudio que evaluó la composición de los cuerpos amiláceos de la próstata, se reportó que sus principales componentes son las formas amiloide de las proteínas S100A8 y S100A9, que han sido asociadas con varios procesos inflamatorios y con varios tipos de cáncer. Esto sugiere un enlace entre infección bacteriana, inflamación y depósito amiloide de las proteínas pro-inflamatorias en la próstata, de manera que se podría desencadenar un ciclo de auto-perpetuación, y aumentar el riesgo de malignidad con el envejecimiento de la próstata. Este estudio también identificó DNA y proteínas de *E.Coli* en las muestras de los cuerpos amiláceos, por lo que se planteó la hipótesis de que su formación podría estar asociada a infección bacteriana (263).

Estos resultados aportan evidencias en favor del papel de la inflamación aguda en el proceso de la formación de los cuerpos amiláceos en la próstata, lo que podría ser una fuente de información importante sobre la frecuencia de la inflamación aguda asintomática en esta glándula, un posible factor contribuyente a su carcinogénesis. Sin embargo, no es claro si la biogénesis, o la presencia de estos cuerpos, están relacionadas directamente con el proceso de carcinogénesis prostática (35). En este

trabajo, el anticuerpo específico para el proteoglicano fibromodulina mostró una tinción fuerte en el epitelio prostático de los acinos benignos que contienen cuerpos amiláceos. Se necesitan estudios más detallados que determinen si fibromodulina es secretada en el líquido prostático, o si es un componente estructural de los cuerpos amiláceos, y las posibles implicaciones biológicas asociadas.

8.5 USO DE TEJIDOS FFPE PARA ESTUDIAR EL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

Los tejidos FFPE archivados son un recurso valioso para los estudios de expresión génica en la biología tumoral. Estas muestras proporcionan un registro histórico de la histología, la expresión proteica y de ácidos nucleicos, que pueden ser correlacionados con el seguimiento y la evolución de la enfermedad (264, 265). Estos tejidos pueden ser almacenados en forma indefinida a temperatura ambiente, sin pérdida de su integridad estructural, sin embargo, el procesamiento y el almacenamiento a largo plazo pueden resultar en daño y degradación de las proteínas y los transcritos (266). La estabilidad del mRNA en los tejidos FFPE depende de muchos factores, incluyendo los métodos de procesamiento, el tiempo de almacenamiento y la abundancia de los transcritos (266). Se ha reportado que el fijador es el elemento más crítico a tener en cuenta en la preservación tanto de la morfología tisular como la integridad del RNA (161).

En el presente estudio, se demostró una leve pérdida de la calidad de los transcritos relacionada con el mayor tiempo de almacenamiento, a pesar de haber seleccionado muestras de especímenes de prostatectomía realizados en un período inferior a 4 años

atrás. En cambio, la concentración de RNA obtenido no fue afectada por el tiempo de almacenamiento del bloque, ni por el volumen de tejido estudiado.

En el estudio de Nam *et al*, fragmentos pequeños de DNA o RNA fueron amplificados en forma satisfactoria en la mayoría de las muestras FFPE, pero, obtuvieron mejores resultados en el rendimiento, la pureza y la integridad del RNA en especímenes recientes que en los almacenados por varios años, reportando que la integridad del RNA se afecta más durante el primer año, que durante periodos más largos de tiempo (148). Von Ahlfen también describe que solo después de almacenar por más de 12 meses, o, a temperaturas elevadas, la integridad del RNA se convierte en un factor limitante para el rendimiento de la PCR (192).

Rodrigues Gouveia *et al* encontraron que la introducción de un paso adicional de lavado con PBS preparado con agua libre de DNasa/RNasa, durante la preparación de la muestra para la extracción de RNA de tejido FFPE, produjo una mejora significativa en la calidad del RNA, y en el resultado de la amplificación, propusieron que es posible que el lavado favorezca la eliminación de los residuos del fijador en los tejidos, los cuales son contaminantes que pueden actuar como inhibidores de la PCR (156). También reportaron que la amplificación no fue influida por el tipo de tejido ni la edad del bloque (156). Hallazgos similares a los de Scorsato y Telles quienes no observaron pérdida de material, o cambios en la pureza del RNA relacionados con la edad del bloque (267).

En el estudio de Dunn *et al*, el procedimiento de FFPE resultó en menor rendimiento en la obtención del RNA, que el de una cantidad equivalente de tejido congelado. El RNA obtenido de ambos métodos de procesamiento produjo cantidades comparables de RNA amplificado a partir de cantidades iguales de RNA. El análisis del perfil de expresión

mostró una concordancia cercana al 80% en las diferencias de expresión entre HPB y CaP, entre los tejidos FFPE y los tejidos congelados. Ellos propusieron que se tomen cilindros de tejido FFPE para ser almacenados a temperaturas más bajas, o almacenar RNA obtenido poco tiempo después del procesamiento de los tejidos, para permitir los estudios moleculares sin comprometer las rutinas actuales de patología quirúrgica (166).

En el estudio de Doleshal *et al*, algunos tipos de tejido con mayor área en la superficie de corte del bloque, tuvieron un rendimiento mayor que los especímenes con superficies más pequeñas, como piel y glándula mamaria (268). En el presente estudio en cambio, no se encontró variación en el rendimiento del RNA obtenido en relación con el volumen de tejido estudiado.

Los valores de Ct en la amplificación del RNA obtenido de tejidos FFPE pueden ser altos debido a las dificultades en el aislamiento de suficiente cantidad de RNA de buena calidad. Para asegurarse de que los valores de Ct no representen artefactos, es importante asegurar que las temperaturas de fusión de los ciclos individuales sean idénticas (202). En el presente estudio, encontramos que algunos productos de amplificación, específicamente de miR-9 presentaron valores de Ct indeterminados y con doble pico en la curva de fusión por lo que fueron excluidos del análisis, esto puede estar relacionado con las dificultades descritas en la obtención de RNA de buena calidad de un número pequeño de células en muestras FFPE.

En cuanto al estudio de expresión de microRNAs, el análisis comparativo de tejidos FFPE y congelados sugiere que los microRNAs son inusualmente estables cuando se comparan con los transcritos de mRNA (269, 270). Sin embargo, se han reportado conclusiones diversas en relación con la estabilidad de los microRNAs en tejidos FFPE

almacenados por largos periodos de tiempo, por ejemplo Nonn *et al*, reportaron buena correlación entre el perfil de expresión de microRNAs en los tejidos congelados y en los tejidos FFPE (164). Igualmente, Siebolts *et al*, encontraron que la accesibilidad de los microRNAs en los tejidos FFPE es comparable a la de los tejidos congelados, y que pueden ser evaluados en forma confiable mediante RT-qPCR (264), y Szafranska *et al*, demostraron lo mismo al analizar la expresión de microRNAs mediante la tecnología de microarreglos (271). En el presente estudio, similar a lo descrito por Peskoe, se encontró asociación entre mayor tiempo de almacenamiento del bloque con menor nivel de expresión de RNU6, lo que además se considera pudo influir en la dificultad en la obtención de resultados al analizar la expresión de los microRNAs objeto de estudio en el tejido FFPE.

8.6 EXPRESIÓN DE RNU6 Y SU USO COMO GEN DE REFERENCIA EN EL ESTUDIO DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CAP

La cuantificación relativa de la expresión génica mediante RT-qPCR es uno de los principales métodos para estudiar la expresión de microRNAs en tejidos, pero su valor en los estudios de expresión depende en gran parte de la selección de genes de referencia con expresión estable (272). Existe incertidumbre sobre la selección de los genes de referencia apropiados y su impacto en los resultados, debido a que los microRNAs son solo una pequeña fracción del RNA total en una muestra de tejido, y esta cantidad puede variar significativamente entre diferentes muestras, por lo que el normalizador debe ser capaz de determinar estas pequeñas diferencias (265).

Para que un gen sea elegible como gen de referencia debe expresarse en un nivel constante independiente de variaciones biológicas, estadios de enfermedad, o tratamientos; su estabilidad debe ser validada en cada diseño de estudio; y, su rango de expresión y su longitud deben ser similares a los del gen diana (272).

Usualmente la RT-qPCR para detección de expresión de microRNAs se normaliza a un gen de referencia como RNU6B, RNU44 o RNU48, que son RNAs nucleolares pequeños (snoRNAs), sin embargo, evidencias recientes sugieren que algunos snoRNAs están des-regulados en cáncer (273), y muchos genes y microRNAs de referencia comúnmente usados no se expresan en forma estable y por tanto no son adecuados para normalización o cuantificación de datos de RT-qPCR (274). Algunos estudios además han normalizado la expresión a mRNA más largos, como GAPDH, TATA box binding protein mRNA, y RNaseP (16, 275). Es cuestionable si estos mRNA pueden ser usados como genes de referencia en los estudios de expresión de microRNAs, debido a que pueden tener diferentes eficiencias de aislamiento comparados con los microRNAs, pueden degradarse más rápido debido a su longitud, y son transcritos en forma reversa con técnicas diferentes a las de los microRNAs de interés (276).

RNU6-2 es el gen de referencia más común en los estudios de expresión de microRNAs (277) RNU6 es altamente conservado a lo largo de la evolución y tiene múltiples copias en el genoma. En el estudio de Gee *et al*, su uso como único gen de referencia tuvo mejor significancia que la normalización usando múltiples genes en cáncer de mama (273). En cambio, en el estudio de Chen *et al*, su expresión cambió en forma importante entre las muestras de esófago normal y las muestras con carcinoma (274).

Por otra parte, no hay un acuerdo en relación con los microRNAs diferencialmente expresados en CaP. El uso de genes de referencia no validados parece ser una de las principales causas de las discrepancias en los resultados de la expresión de microRNAs en los estudios publicados (278). Los estudios de Jiang y Josson de expresión de microRNAs en líneas celulares de CaP mostraron que RNU6-2 se expresaba en niveles comparables, pero solo estudiaron células y no tejidos y el número de muestras fue muy bajo (4 y 5 muestras, respectivamente) (279, 280).

En el presente estudio se encontró una relación directa entre la calidad del RNA y el nivel de expresión de RNU6. Al igual que en los estudios de Jiang y Josson, no hubo una diferencia significativa en el nivel de expresión entre los tejidos estudiados. También se encontró que un mayor tiempo de almacenamiento del bloque se asoció con menor nivel de expresión de RNU6, representado por aumento en el valor de Ct. Hallazgos similares a los de Peskoe *et al*, quienes reportaron una pérdida lineal de señal de los microRNAs estudiados y de RNU6B, en relación con la edad de los bloques FFPE almacenados por 12–20 años (277).

8.7 USO DE CISH PARA ESTUDIAR EL PERFIL DE TRANSCRIPCIÓN DEL ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO

El ensayo de CISH, une la IHQ y la hibridación *in situ* como parte del conjunto de herramientas basadas en tejidos y células disponibles en la investigación del cáncer. Esta tecnología es capaz de detectar una sola molécula de RNA, mientras preserva el contexto del tejido, lo que permite localizar con precisión cuales transcritos se expresan

en cada célula, incluso con niveles muy bajos de expresión, todo esto con las ventajas de poder hacerlo bajo microscopía de luz convencional o de fluorescencia (169).

En la investigación en CaP, el uso de RNAscope permitió estudiar la actividad de la polimerasa I en líneas celulares, tejido prostático benigno y CaP (281). Ha contribuido a determinar aspectos de la expresión génica, como que el CaP tanto primario como metastásico no expresa mRNA de IL6 (282). Se ha descrito como una forma de estudiar con mayor confianza la expresión heterogénea de PTEN dentro de áreas focales del tumor, o de otros biomarcadores para los que no se disponga de técnicas de IHQ estandarizadas (283). Y en el estudio de la relación inflamación-CaP y su posible etiología, mediante esta técnica, se encontró la primera evidencia de que *P. acnés* es capaz de inducir inflamación en la próstata del ratón (74). En el presente estudio fue una herramienta valiosa que permitió estudiar la expresión *in situ* de los genes CXXC5 y FMOD en las lesiones descritas como parte de la progresión del CaP.

8.8 EXPRESIÓN DE LOS MICRORNAS: MIR-9 Y MIR-155, Y SU ASOCIACIÓN CON LA PRESENCIA DE ADENOCARCINOMA PROSTÁTICO Y SUS POSIBLES LESIONES PRECURSORAS

Los microRNAs representan no solo candidatos promisorios a marcadores, sino potenciales oportunidades terapéuticas, debido a su especificidad y a la facilidad para ser detectados (13, 137). Se han realizado investigaciones en los últimos años, en las que muchos microRNAs han sido encontrados desregulados en CaP, usando diferentes metodologías (12-15, 18, 137, 147, 284), con resultados alentadores por una parte, acerca de su uso futuro en el diagnóstico, manejo y pronóstico del CaP, pero por otro

lado, con resultados contradictorios, lo que retrasa su posible uso en la práctica clínica (137). Esta dualidad puede deberse, por una parte, a que la expresión aberrante de un único microRNA puede influir en un gran número de procesos celulares, afectando múltiples proteínas inter-relacionadas (144, 281). También puede estar relacionada, con el uso de diferentes plataformas, con diferencias significativas en la selección de los casos, en el procesamiento (muestras congeladas y muestras FFPE) y almacenamiento de los tejidos, o, con el uso de tejidos que contienen otros elementos además del tumor, o, la obtención de poblaciones celulares puras mediante LCM (12, 275, 285).

Varios estudios han reportado muchos microRNAs como diferencialmente expresados entre TPB y CaP (13, 16, 141, 272, 275, 284, 286). Por ejemplo, Majid *et al* encontraron sub-regulación de miR-34b en las líneas celulares de CaP LNCaP y PC3, y en muestras de CaP, comparados con la línea celular no maligna PWR1E y con las muestras de tejido normal o con HPB (145). Estudios como el de Ozen *et al*, han demostrado subregulación significativa generalizada de microRNAs en el CaP clínicamente localizado en comparación con el tejido benigno de la zona periférica de la glándula (287). Hellwinkel *et al*, reportaron un panel de microRNAs (miR-185, miR-16, let-7a y let-7b), que discriminan entre tejido no neoplásico vecino a CaP, y tejido no neoplásico en pacientes sin cáncer en las biopsias de próstata, lo que podría indicar que el cambio en la regulación de estos microRNAs está involucrado en la transformación maligna inicial (141).

En el presente estudio se encontró una tendencia a mayor expresión de miR-9, y a menor expresión de miR-155, en las muestras de CaP en general, comparadas con las muestras de tejido prostático benigno, sin embargo, para ninguno de los dos microRNAs

estudiados se alcanzó un nivel de significancia estadística, tal vez debido a heterogeneidad en la expresión de estos microRNAs, a un nivel muy bajo de expresión, o a las características propias del tipo de tejido del que se obtuvieron las muestras.

Se han reportado diferencias en la expresión de microRNAs entre tumores con puntajes de Gleason alto y bajo (13, 272, 285, 286, 288). Leite *et al*, no encontraron ningún cambio en la expresión de microRNAs entre CaP de bajo y alto grado (289). Otros autores en cambio reportaron una correlación entre miR-31, miR-96, y miR-205 y el puntaje de Gleason, así como entre miR-125b, miR-205 y miR-222 y el estadio tumoral (286). En este estudio no fue posible comparar el nivel de expresión de los microRNAs estudiados entre CaP de bajo, intermedio y alto grado, debido al pequeño número de muestras de CaP que cumplieron los requisitos para ser incluidas en el análisis, lo cual puede estar relacionado con las dificultades mencionadas en relación con las características de las muestras y la calidad del RNA obtenido.

Hay evidencias de que algunos microRNAs pueden regular muchos de los eventos que hacen parte de la progresión del CaP, por esto, cada paso de dicha progresión es una fuente potencial de descubrimiento de biomarcadores de microRNAs (12). Dentro de este proceso se ha propuesto que algunos microRNAs actúan como oncomiRNAs: miR-32, miR-148, miR-221, miR-222, miR-106a y miR-25, y otros como microRNAs supresores de tumor: miR-15a, miR-16-1, miR-34a miR-133, Let-7, miR-145 y miR-146 en los pasos iniciales de la progresión del CaP (12, 290). En el estudio realizado por Leite *et al*, fueron analizados 14 microRNAs en las lesiones que reproducen la progresión del CaP. Excepto miR-21 y miR-206, los niveles de expresión de todos los microRNAs estudiados cambiaron significativamente durante la progresión. Se demostró que hay una pérdida

global de expresión de microRNAs en dos pasos: el primero es la transición entre HGPIN y CaP, y el segundo es la transición de CaP localizado a metastásico. Todos los microRNAs estudiados estuvieron sobre-expresados en HGPIN en comparación con el tejido prostático benigno. Hubo un cambio en la expresión de los microRNAs 16, 25, 146a, y 191 entre HGPIN y CaP, sobre-expresión de miR-21 y miR-191 en HGPIN, y reducción de su expresión en CaP (289). Estos resultados confirmaron que en las células neoplásicas en forma predominante hay sub-regulación de microRNAs, resultando en pérdida de control de procesos celulares fundamentales relacionados con la progresión tumoral como la proliferación y diferenciación celular (146, 289).

En el presente estudio se investigó en forma específica, el nivel de expresión de miR-9 y miR-155 en las etapas planteadas en la progresión del CaP. Se determinó la expresión de dichos microRNAs en poblaciones celulares puras de tejido prostático benigno y de las lesiones involucradas en este proceso obtenidas por LCM.

Para el caso de miR-9, este microRNA ha sido descrito como oncomiRNA y como supresor de tumor dependiendo del tipo de neoplasia (291-293). En próstata, se reportó como uno de los microRNAs reguladores de la expresión del AR en líneas celulares de CaP (294), y sobre-expresado en CaP de alto grado en comparación con CaP de bajo grado (288, 295).

Los hallazgos del presente estudio, a pesar de no alcanzar un nivel de significancia estadística, muestran tendencia a sobreexpresión de mir-9 en CaP con relación al tejido prostático benigno, lo que concuerda con los resultados de un estudio publicado recientemente, en el que compararon su expresión entre líneas celulares prostáticas benignas y tumorogénicas, y entre tejido prostático benigno y CaP de 3 especímenes de

prostatectomía (296). En nuestro estudio el número de muestras fue mucho mayor y se comparó además su expresión en PIA, encontrándose también sobre-expresado en estas lesiones al igual que en CaP,

Los niveles de expresión de miR-155 mostraron una tendencia a menor expresión en las muestras de PIA, HGPIN y CaP, comparadas con las muestras de TPB, aunque esta diferencia no alcanzó un nivel de significancia estadística, lo cual puede estar relacionado con características propias del material estudiado, como el procesamiento al que fue sometido el tejido y el tiempo de almacenamiento del mismo.

miR-155 es altamente expresado en linfocitos activados, y en monocitos/macrófagos, con aumento durante la diferenciación hematopoyética y la respuesta inmune (297, 298), con un papel importante como mediador de la respuesta celular a la infección y la inflamación (298, 299). Se han reportado altos niveles de expresión de miR-155 en leucemias, linfomas, así como en carcinomas de mama, pulmón, tiroides y páncreas (297, 299-301). En cambio han sido descritos niveles bajos de expresión de miR-155 en líneas celulares de melanoma y cáncer gástrico (302, 303).

En el estudio de Sempere *et al*, en el que se estudió mediante un ensayo combinado de ISH/IHQ la codetección de microRNAs y proteínas, como marcadores de linaje celular, se encontró que la expresión de miR-155 estuvo confinada a la población de células inmunes presentes en los tumores estudiados, con bajo nivel de expresión de miR-155 en las células cancerosas de algunos de los tumores. Resaltan que en el estudio de expresión de los microRNAs es importante establecer la identidad de las células que los expresan, pues es posible que las señales detectadas provengan de otros elementos presentes en el tejido, como en el caso de miR-155 cuya expresión elevada puede

corresponder a las células de linaje linfoide, lo que debe tenerse en cuenta al realizar el análisis (304).

El hallazgo descrito en el presente estudio de tendencia a la sub-expresión de miR-155 en el CaP y en las lesiones asociadas a su progresión, contrasta con la descripción de este microRNA como oncogén en algunos tumores sólidos (300, 305). Esto puede estar relacionado con el tipo celular específico en el que fue detectado, al ser estudiada su expresión en las células epiteliales microdisecadas de cada una de las lesiones descritas. A diferencia de los estudios como el de Basu *et al*, en el que se comparó la expresión de miR-155 en muestras de tejido completas de CaP y HPB, que incluyen elementos celulares del sistema inmune asociados con niveles altos de expresión de este microRNA (305). Situación similar a la descrita en el estudio de Nonn *et al*, quienes encontraron sobre-expresados dos microRNAs que en estudios previos habían sido encontrados subexpresados, en CaP en relación con tejido prostático benigno. Explican esta discordancia como un posible sesgo de sub-representación de los microRNAs específicos del estroma, originado al estudiar el tejido completo y no poblaciones celulares específicas, pues en el CaP hay disminución marcada de la cantidad de estroma (164).

Similar a los hallazgos del presente estudio, recientemente se ha descrito sub-expresión de miR-155 en tejido con HGPIN obtenido por LCM y analizado mediante microarreglos y RT-qPCR, lo que fue confirmado al estudiar la expresión de algunos de los mRNA blanco de mir-155 (306). Por tanto, las divergencias reportadas requieren continuar el análisis de este microRNA en el contexto de las lesiones descritas como participantes en la progresión del CaP.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos soportan una asociación estadísticamente significativa entre la inflamación prostática crónica y el adenocarcinoma prostático, con mayor probabilidad de CaP en presencia de inflamación moderada/severa en al menos uno de los cilindros de la biopsia prostática. Esta asociación es inversa en los casos con CaP que presentan inflamación glandular moderada o severa, asociada con infiltrado inflamatorio agudo, la cual puede estar relacionada con etapas tempranas del proceso inflamatorio. La carcinogénesis prostática en cambio puede involucrar la inflamación crónica, que conlleva un tiempo más largo de exposición a un microambiente rico en especies altamente reactivas de oxígeno y nitrógeno y otros mediadores químicos de la inflamación, generando daño persistente al tejido y proliferación celular que pueden contribuir al desarrollo y la progresión del adenocarcinoma prostático.

Los niveles más intensos de inflamación crónica se asocian con mayor extensión de PIA en el tejido prostático. Esta asociación no había sido reportada previamente y puede sustentar el origen postulado de esta lesión a partir de la inflamación crónica y el planteamiento que este ambiente tisular, compuesto de células epiteliales atróficas e infiltrado inflamatorio crónico mononuclear, puede predisponer al desarrollo de adenocarcinoma prostático, por lo que la evaluación del grado de PIA e inflamación en las biopsias prostáticas podría ser útil en el estudio de las biopsias negativas para CaP.

Se confirmaron también las asociaciones previamente reportadas entre presencia e intensidad de inflamación, con la presencia de PIA, así como, del riesgo aumentado de diagnóstico de CaP en casos con HGPIN. No se encontró una diferencia significativa en

la prevalencia de PIA entre biopsias benignas y biopsias con CaP. Además, se observó que a diferencia de lo que sucede con PIA, la atrofia focal de tipo no-PIA fue un hallazgo inusual en biopsias con cáncer.

En el presente estudio se demostró que existe un aumento significativo de la expresión del gen CXXC5 a nivel de mRNA y de proteína en CaP, HGPIN, y PIA, comparados con el tejido prostático benigno, con aumento en su expresión a lo largo del modelo propuesto para la progresión del CaP. Estos hallazgos sugieren que CXXC5 puede estar involucrado en el proceso de la carcinogénesis prostática, con una relación entre niveles altos de expresión de CXXC5 y la progresión de esta neoplasia.

Del mismo modo, la evaluación de la expresión del proteoglicano fibromodulina, tanto a nivel de transcritos, como a nivel de proteína, a lo largo del modelo propuesto para la progresión del CaP, demostró sobreexpresión a lo largo del espectro de lesiones de la próstata postuladas como premalignas. Fibromodulina está sobreexpresada no solo en CaP, sino también, aunque en menor grado, en HGPIN, y en PIA, en relación con los acinos benignos.

Los hallazgos del presente estudio soportan la noción de que el microambiente tisular asociado a la inflamación crónica puede llevar a cambios en la expresión de genes específicos cuya identificación podría llevar a descubrir nuevos genes potencialmente involucrados en la patogenia del CaP. Lo anterior se puede soportar con los resultados de investigaciones previamente realizadas por nuestro grupo de investigación en relación con los cambios de expresión génica en el adenocarcinoma prostático, que incluyen también cambios en la expresión de algunos microRNAs, para los cuales no se ha identificado un patrón de expresión tisular específico en el adenocarcinoma prostático.

A este respecto, en el presente estudio se detectó una tendencia a la sub-expresión de miR-155 en el CaP y en las lesiones asociadas a su progresión, que a pesar de no alcanzar un nivel de significancia estadística, contrasta con la descripción de este microRNA como oncogén en algunos tumores sólidos, lo que puede estar relacionado con el tipo celular específico en el que fue detectado, al ser estudiada su expresión en una población celular enriquecida compuesta por las células epiteliales microdisecadas de cada una de las lesiones descritas. Por tanto, las divergencias reportadas requieren continuar el análisis de este microRNA en el contexto de las lesiones descritas como participantes en la progresión del CaP.

Se detectó además una tendencia a sobreexpresión de miR-9 en el CaP, que a pesar de no alcanzar una significancia estadística está acorde con su descripción como oncomiRNA.

Un hallazgo novedoso del estudio fue el aumento de expresión del proteoglicano fibromodulina en los acinos benignos que contienen cuerpos amiláceos. Se necesitan estudios más detallados que determinen si fibromodulina es secretada en el líquido prostático, o si es un componente estructural de los cuerpos amiláceos, y las posibles implicaciones biológicas asociadas.

Los resultados aquí expuestos constituyen un punto de partida para estudios posteriores que determinen el papel biológico y las posibles implicaciones clínicas de la expresión de los genes CXXC5 y FMOD en el CaP. Igualmente se requieren estudios adicionales que permitan aclarar las funciones biológicas específicas de miR-9 y miR-155 en la progresión del adenocarcinoma prostático.

10. PUBLICACIONES Y PONENCIAS

- Benedetti Ines, Bettin Alfonso, Reyes Niradiz, "Inflammation and focal atrophy in prostate needle biopsy cores and association to prostatic adenocarcinoma", *Annals of Diagnostic Pathology* 24 (2016) 55–61
- Reyes Niradiz, Benedetti Ines, Bettin Alfonso, Rebollo Juan, Geliebter Jan, "The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue", *Cancer Biomarkers* 16 (2016) 191–202
- Benedetti Ines, De Marzo Angelo, Geliebter Jan, Reyes Niradiz, "CXXC5 expression in prostate cancer: implications for cancer progression" *International Journal of Experimental Pathology*, *In Press*.
- Benedetti Ines, Correa Oscar, Reyes Niradiz, "Prostatic Inflammation: Association with Prostate Cancer, PSA serum levels and pathological findings in patients with suspected prostate cancer in Cartagena-Colombia". UICC World Cancer Congress 2012, Montreal, Canada, 2012
- Benedetti Ines, Correa Oscar, Tiwari Raj K, Geliebter Jan, Reyes Niradiz, "Prostatic inflammation and proliferative inflammatory atrophy: Are there any association with prostatic cancer? AACR Annual Meeting 2013, Washington D.C., 2013

- Benedetti Ines, Correa Oscar, Reyes Niradiz, “Atrofia prostática focal en relación con parámetros clínicos y hallazgos histopatológicos en pacientes con sospecha de adenocarcinoma prostático” XXIX Congreso SLAP 2013, Oaxaca, México, 2013.
- Benedetti Ines, Bettin Alfonso, Reyes Niradiz, “CXXC5 is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue” AACR Annual Meeting 2016 in New Orleans, Louisiana, 2016
- Benedetti Ines¹, De Marzo Angelo, Baena Javier, Geliebter Jan, Reyes Niradiz “Fibromodulin expression in human prostate cancer tissue: implications for prostate cancer progression” AACR Annual Meeting 2017, Washington D.C., 2017.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. PubMed PMID: 25220842. Epub 2014/09/16. eng.
2. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul 24;454(7203):436-44. PubMed PMID: 18650914. Epub 2008/07/25. eng.
3. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet*. 2001 Feb 17;357(9255):539-45. PubMed PMID: 11229684. Epub 2001/03/07. eng.
4. Candido J, Hagemann T. Cancer-related inflammation. *Journal of clinical immunology*. 2013 Jan;33 Suppl 1:S79-84. PubMed PMID: 23225204. Epub 2012/12/12. eng.
5. Del Prete A, Allavena P, Santoro G, Fumarulo R, Corsi MM, Mantovani A. Molecular pathways in cancer-related inflammation. *Biochimica medica*. 2011;21(3):264-75. PubMed PMID: 22420240. Epub 2011/01/01. eng.
6. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol*. 1999 Dec;155(6):1985-92. PubMed PMID: 10595928. Pubmed Central PMCID: 1866955. Epub 1999/12/14. eng.
7. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG. Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis. *Urol Oncol*. 2007 Sep-Oct;25(5):398-400. PubMed PMID: 17826659. Epub 2007/09/11. eng.
8. Sfanos KS, De Marzo AM. Prostate cancer and inflammation: the evidence. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):199-215. PubMed PMID: 22212087. Epub 2012/01/04. eng.
9. Amaro A, Esposito AI, Gallina A, Nees M, Angelini G, Albini A, et al. Validation of proposed prostate cancer biomarkers with gene expression data: a long road to travel. *Cancer metastasis reviews*. 2014 Sep;33(2-3):657-71. PubMed PMID: 24477410. Pubmed Central PMCID: 4113682. Epub 2014/01/31. eng.
10. Mullane SA, Van Allen EM. Precision medicine for advanced prostate cancer. *Current opinion in urology*. 2016 May;26(3):231-9. PubMed PMID: 26909474. Pubmed Central PMCID: 4955574. Epub 2016/02/26. eng.
11. De Marzo AM, Meeker AK, Zha S, Luo J, Nakayama M, Platz EA, et al. Human prostate cancer precursors and pathobiology. *Urology*. 2003 Nov;62(5 Suppl 1):55-62. PubMed PMID: 14607218. Epub 2003/11/11. eng.
12. Kumar B, Lupold SE. MicroRNA expression and function in prostate cancer: a review of current knowledge and opportunities for discovery. *Asian journal of andrology*. 2016 Apr 8. PubMed PMID: 27056344. Epub 2016/04/09. Eng.
13. Patil PA, Magi-Galluzzi C. MicroRNA in prostate cancer: Practical aspects. *Histology and histopathology*. 2015 Dec;30(12):1379-96. PubMed PMID: 26186079. Epub 2015/07/18. eng.
14. Catto JW, Alcaraz A, Bjartell AS, De Vere White R, Evans CP, Fussel S, et al. MicroRNA in prostate, bladder, and kidney cancer: a systematic review. *Eur Urol*. 2011 May;59(5):671-81. PubMed PMID: 21296484. Epub 2011/02/08. eng.
15. Khanmi K, Ignacimuthu S, Paulraj MG. MicroRNA in prostate cancer. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2015 Dec 7;451(Pt B):154-60. PubMed PMID: 26415820. Epub 2015/09/30. eng.
16. Porkka KP, Pfeiffer MJ, Waltering KK, Vessella RL, Tammela TL, Visakorpi T. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res*. 2007 Jul 01;67(13):6130-5. PubMed PMID: 17616669. Epub 2007/07/10. eng.

17. Szczyrba J, Loprich E, Wach S, Jung V, Unteregger G, Barth S, et al. The microRNA profile of prostate carcinoma obtained by deep sequencing. *Molecular cancer research : MCR*. 2010 Apr;8(4):529-38. PubMed PMID: 20353999. Epub 2010/04/01. Eng.
18. Pang Y, Young CY, Yuan H. MicroRNAs and prostate cancer. *Acta biochimica et biophysica Sinica*. 2010 Jun 15;42(6):363-9. PubMed PMID: 20539944. Epub 2010/06/12. eng.
19. Reyes I, Tiwari R, Geliebter J, Reyes N. DNA microarray analysis reveals metastasis-associated genes in rat prostate cancer cell lines. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*. 2007 Jun;27(2):190-203. PubMed PMID: 17713630. Epub 2007/08/24. eng.
20. Bettin A, Reyes I, Reyes N. Gene expression profiling of prostate cancer-associated genes identifies fibromodulin as potential novel biomarker for prostate cancer. *The International journal of biological markers*. 2016 Dec 14:0. PubMed PMID: 26689247. Epub 2015/12/23. Eng.
21. Astori A, Fredly H, Aloysius TA, Bullinger L, Mansat-De Mas V, de la Grange P, et al. CXXC5 (retinoid-inducible nuclear factor, RINF) is a potential therapeutic target in high-risk human acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2013 Sep;4(9):1438-48. PubMed PMID: 23988457. Pubmed Central PMCID: 3824541. Epub 2013/08/31. eng.
22. Andersson T, Sodersten E, Duckworth JK, Cascante A, Fritz N, Sacchetti P, et al. CXXC5 is a novel BMP4-regulated modulator of Wnt signaling in neural stem cells. *The Journal of biological chemistry*. 2009 Feb 6;284(6):3672-81. PubMed PMID: 19001364. Epub 2008/11/13. eng.
23. Pendino F, Nguyen E, Jonassen I, Dysvik B, Azouz A, Lanotte M, et al. Functional involvement of RINF, retinoid-inducible nuclear factor (CXXC5), in normal and tumoral human myelopoiesis. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3172-81. PubMed PMID: 19182210. Epub 2009/02/03. eng.
24. 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 biomarkers : section A of Disease markers*. 2016;16(1):191-202. PubMed PMID: 26600400. Epub 2015/11/26. eng.
25. Bettin A. Evaluacion del proteoglicano Fibromodulina (FMOD) como nuevo biomarcador del cáncer de próstata [Tesis Doctoral]: Universidad de Cartagena; 2016.
26. McNeal JE. Prostate. In: Mills SE, editor. *Histology for pathologists*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2776–835.
27. Petersen ROS, Isabell A.; Davis, Charles J. *Urologic Pathology* 2009.
28. Fine SW, Reuter VE. Anatomy of the prostate revisited: implications for prostate biopsy and zonal origins of prostate cancer. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):142-52. PubMed PMID: 22212083. Epub 2012/01/04. eng.
29. Laczko I, Hudson DL, Freeman A, Feneley MR, Masters JR. Comparison of the zones of the human prostate with the seminal vesicle: morphology, immunohistochemistry, and cell kinetics. *Prostate*. 2005 Feb 15;62(3):260-6. PubMed PMID: 15389778. Epub 2004/09/25. eng.
30. Humphrey PA. Diagnosis of adenocarcinoma in prostate needle biopsy tissue. *J Clin Pathol*. 2007 Jan;60(1):35-42. PubMed PMID: 17213347. Pubmed Central PMCID: 1860598. Epub 2007/01/11. eng.
31. van Leenders GJ, Gage WR, Hicks JL, van Balken B, Aalders TW, Schalken JA, et al. Intermediate cells in human prostate epithelium are enriched in proliferative inflammatory atrophy. *Am J Pathol*. 2003 May;162(5):1529-37. PubMed PMID: 12707036. Pubmed Central PMCID: 1851184. Epub 2003/04/23. eng.
32. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes Dev*. 2010 Sep 15;24(18):1967-2000. PubMed PMID: 20844012. Pubmed Central PMCID: 2939361. Epub 2010/09/17. eng.
33. Benedetti IB, L.Arroyo, B. De Oro, B. Determinación retrospectiva de marcadores de células basales útiles en el diagnóstico del Adenocarcinoma prostático en biopsias prostáticas con diagnóstico dudoso, Cartagena 2005-2006. *Revista Ciencias Biomédicas* 2010;1(1):23 - 9

34. Hameed O, Humphrey PA. Immunohistochemistry in diagnostic surgical pathology of the prostate. *Seminars in diagnostic pathology*. 2005 Feb;22(1):88-104. PubMed PMID: 16512601. Epub 2006/03/04. eng.
35. Sfanos KS, Isaacs WB, De Marzo AM. Infections and inflammation in prostate cancer. *American journal of clinical and experimental urology*. 2013 Dec 25;1(1):3-11. PubMed PMID: 25110720. Pubmed Central PMCID: 4219279. Epub 2014/08/12. Eng.
36. Sfanos KS, Wilson BA, De Marzo AM, Isaacs WB. Acute inflammatory proteins constitute the organic matrix of prostatic corpora amylacea and calculi in men with prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009 Mar 03;106(9):3443-8. PubMed PMID: 19202053. Pubmed Central PMCID: 2651291. Epub 2009/02/10. eng.
37. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):7-30. PubMed PMID: 28055103. Epub 2017/01/06. eng.
38. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer statistics, 2016*. *CA Cancer J Clin*. 2016 Jan;66(1):7-30. PubMed PMID: 26742998. Epub 2016/01/09. eng.
39. Cancerología INd. El cancer en cifras, Distribución de casos nuevos de cáncer por sexo, según localización primaria, INC, Colombia, 2010. Bogota: Insituto Nacional de Cancerologia, 2010.
40. Cancerología IdNd. Anuario estadístico 2012. 2012.
41. Society AC. Prostate Cancer, the key statistics about prostate cancer. American Cancer Society, 2012.
42. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):256-69. PubMed PMID: 17384581. Epub 2007/03/27. eng.
43. Kheirandish P, Chingwundoh F. Ethnic differences in prostate cancer. *British journal of cancer*. 2011 Aug 09;105(4):481-5. PubMed PMID: 21829203. Pubmed Central PMCID: 3170971. Epub 2011/08/11. eng.
44. Park SY, Haiman CA, Cheng I, Park SL, Wilkens LR, Kolonel LN, et al. Racial/ethnic differences in lifestyle-related factors and prostate cancer risk: the Multiethnic Cohort Study. *Cancer causes & control : CCC*. 2015 Oct;26(10):1507-15. PubMed PMID: 26243447. Pubmed Central PMCID: 4567936. Epub 2015/08/06. eng.
45. Attard G, Parker C, Eeles RA, Schroder F, Tomlins SA, Tannock I, et al. Prostate cancer. *Lancet*. 2016 Jan 2;387(10013):70-82. PubMed PMID: 26074382. Epub 2015/06/16. eng.
46. Koh CM, Bieberich CJ, Dang CV, Nelson WG, Yegnasubramanian S, De Marzo AM. MYC and Prostate Cancer. *Genes Cancer*. 2010 Jun;1(6):617-28. PubMed PMID: 21779461. Pubmed Central PMCID: 3092219. Epub 2011/07/23. eng.
47. Nelson WG, De Marzo AM, Isaacs WB. Prostate cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 24;349(4):366-81. PubMed PMID: 12878745. Epub 2003/07/25. eng.
48. Benedettini E, Nguyen P, Loda M. The pathogenesis of prostate cancer: from molecular to metabolic alterations. *Diagn Histopathol (Oxf)*. 2008 May;14(5):195-201. PubMed PMID: 20953243. Pubmed Central PMCID: 2955448. Epub 2008/05/01. Eng.
49. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM. Molecular alterations in prostate cancer as diagnostic, prognostic, and therapeutic targets. *Adv Anat Pathol*. 2008 Nov;15(6):319-31. PubMed PMID: 18948763. Pubmed Central PMCID: 3214657. Epub 2008/10/25. eng.
50. Schroder FH, van der Maas P, Beemsterboer P, Kruger AB, Hoedemaeker R, Rietbergen J, et al. Evaluation of the digital rectal examination as a screening test for prostate cancer. Rotterdam section of the European Randomized Study of Screening for Prostate Cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 1998 Dec 2;90(23):1817-23. PubMed PMID: 9839522. Epub 1998/12/05. eng.

51. Van der Kwast TH, Roobol MJ. Defining the threshold for significant versus insignificant prostate cancer. *Nature reviews Urology*. 2013 Aug;10(8):473-82. PubMed PMID: 23712205. Epub 2013/05/29. eng.
52. Catalona WJ, Smith DS, Ornstein DK. Prostate cancer detection in men with serum PSA concentrations of 2.6 to 4.0 ng/mL and benign prostate examination. Enhancement of specificity with free PSA measurements. *Jama*. 1997 May 14;277(18):1452-5. PubMed PMID: 9145717. Epub 1997/05/14. eng.
53. Carvalhal GF, Smith DS, Mager DE, Ramos C, Catalona WJ. Digital rectal examination for detecting prostate cancer at prostate specific antigen levels of 4 ng./ml. or less. *J Urol*. 1999 Mar;161(3):835-9. PubMed PMID: 10022696. Epub 1999/02/18. eng.
54. Ukimura O, Coleman JA, de la Taille A, Emberton M, Epstein JI, Freedland SJ, et al. Contemporary role of systematic prostate biopsies: indications, techniques, and implications for patient care. *Eur Urol*. 2013 Feb;63(2):214-30. PubMed PMID: 23021971. Epub 2012/10/02. eng.
55. McNeal JE. Prostate cancer volume. *Am J Surg Pathol*. 1997 Nov;21(11):1392-3. PubMed PMID: 9351580. Epub 1997/11/14. eng.
56. Wang ZA, Toivanen R, Bergren SK, Chambon P, Shen MM. Luminal cells are favored as the cell of origin for prostate cancer. *Cell reports*. 2014 Sep 11;8(5):1339-46. PubMed PMID: 25176651. Pubmed Central PMCID: 4163115. Epub 2014/09/02. eng.
57. De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS. Stem cell features of benign and malignant prostate epithelial cells. *J Urol*. 1998 Dec;160(6 Pt 2):2381-92. PubMed PMID: 9817389. Epub 1998/11/17. eng.
58. Berney D, Cheng L. Prostate cancer: towards the standardization and synthesis of morphology, genetics, and prognosis. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):1-3. PubMed PMID: 22212074. Epub 2012/01/04. eng.
59. Epstein JI. Diagnosis of limited adenocarcinoma of the prostate. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):28-40. PubMed PMID: 22212076. Epub 2012/01/04. eng.
60. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004 Mar;17(3):292-306. PubMed PMID: 14976540. Epub 2004/02/21. eng.
61. Humphrey PA. Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. 2004 Mar;17(3):292-306. PubMed PMID: 14976540. Epub 2004/02/21. eng.
62. Mellinger GT, Gleason D, Bailar J, 3rd. The histology and prognosis of prostatic cancer. *J Urol*. 1967 Feb;97(2):331-7. PubMed PMID: 6018430. Epub 1967/02/01. eng.
63. Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samaratunga H. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):75-86. PubMed PMID: 22212079. Epub 2012/01/04. eng.
64. Epstein JI, Allsbrook WC, Jr., Amin MB, Egevad LL. The 2005 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2005 Sep;29(9):1228-42. PubMed PMID: 16096414. Epub 2005/08/13. eng.
65. Epstein JI, Egevad L, Amin MB, Delahunt B, Srigley JR, Humphrey PA, et al. The 2014 International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Gleason Grading of Prostatic Carcinoma: Definition of Grading Patterns and Proposal for a New Grading System. *Am J Surg Pathol*. 2016 Feb;40(2):244-52. PubMed PMID: 26492179.
66. Epstein JI. International Society of Urological Pathology (ISUP) Grading of Prostate Cancer: Author's Reply. *Am J Surg Pathol*. 2016 Jun;40(6):862-4. PubMed PMID: 27008583. Epub 2016/03/24. eng.
67. Kristiansen G. Diagnostic and prognostic molecular biomarkers for prostate cancer. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):125-41. PubMed PMID: 22212082. Epub 2012/01/04. eng.
68. Epstein JI, Egevad L, Humphrey PA, Montironi R. Best practices recommendations in the application of immunohistochemistry in the prostate: report from the International Society of Urologic

- Pathology consensus conference. *Am J Surg Pathol*. 2014 Aug;38(8):e6-e19. PubMed PMID: 25029122. Epub 2014/07/17. eng.
69. Saini S. PSA and beyond: alternative prostate cancer biomarkers. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016 Apr;39(2):97-106. PubMed PMID: 26790878. Pubmed Central PMCID: 4821699. Epub 2016/01/23. eng.
70. Romero Otero J, Garcia Gomez B, Campos Juanatey F, Touijer KA. Prostate cancer biomarkers: an update. *Urol Oncol*. 2014 Apr;32(3):252-60. PubMed PMID: 24495450. Epub 2014/02/06. eng.
71. van der Kwast TH, Amin MB, Billis A, Epstein JI, Griffiths D, Humphrey PA, et al. International Society of Urological Pathology (ISUP) Consensus Conference on Handling and Staging of Radical Prostatectomy Specimens. Working group 2: T2 substaging and prostate cancer volume. *Mod Pathol*. 2011 Jan;24(1):16-25. PubMed PMID: 20818340. Epub 2010/09/08. eng.
72. Sutcliffe S, Platz EA. Inflammation in the etiology of prostate cancer: an epidemiologic perspective. *Urol Oncol*. 2007 May-Jun;25(3):242-9. PubMed PMID: 17483023. Epub 2007/05/08. eng.
73. Reyes NC, O. Inflamación y cáncer de próstata: implicaciones biológicas y posible utilidad clínica. *IATREIA*. 2014;27(1):73-84.
74. Shinohara DB, Vaghasia AM, Yu SH, Mak TN, Bruggemann H, Nelson WG, et al. A mouse model of chronic prostatic inflammation using a human prostate cancer-derived isolate of *Propionibacterium acnes*. *Prostate*. 2013 Jun;73(9):1007-15. PubMed PMID: 23389852. Epub 2013/02/08. eng.
75. Gurel B, Lucia MS, Thompson IM, Jr., Goodman PJ, Tangen CM, Kristal AR, et al. Chronic inflammation in benign prostate tissue is associated with high-grade prostate cancer in the placebo arm of the prostate cancer prevention trial. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2014 May;23(5):847-56. PubMed PMID: 24748218. Pubmed Central PMCID: 4012292. Epub 2014/04/22. eng.
76. MacLennan GT, Eisenberg R, Fleshman RL, Taylor JM, Fu P, Resnick MI, et al. The influence of chronic inflammation in prostatic carcinogenesis: a 5-year followup study. *J Urol*. 2006 Sep;176(3):1012-6. PubMed PMID: 16890681. Epub 2006/08/08. eng.
77. Nickel JC, True LD, Krieger JN, Berger RE, Boag AH, Young ID. Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. *BJU Int*. 2001 Jun;87(9):797-805. PubMed PMID: 11412216. Epub 2001/06/20. eng.
78. Stimac G, Reljic A, Spajic B, Dimanovski J, Ruzic B, Ulamec M, et al. Aggressiveness of inflammation in histological prostatitis--correlation with total and free prostate specific antigen levels in men with biochemical criteria for prostate biopsy. *Scottish medical journal*. 2009 Aug;54(3):8-12. PubMed PMID: 19725275. Epub 2009/09/04. eng.
79. Davidsson S, Fiorentino M, Andren O, Fang F, Mucci LA, Varenhorst E, et al. Inflammation, focal atrophic lesions, and prostatic intraepithelial neoplasia with respect to risk of lethal prostate cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2011 Oct;20(10):2280-7. PubMed PMID: 21953116. Pubmed Central PMCID: 3671592. Epub 2011/09/29. eng.
80. Delongchamps NB, de la Roza G, Chandan V, Jones R, Sunheimer R, Threatte G, et al. Evaluation of prostatitis in autopsied prostates--is chronic inflammation more associated with benign prostatic hyperplasia or cancer? *J Urol*. 2008 May;179(5):1736-40. PubMed PMID: 18343414. Pubmed Central PMCID: 2661538. Epub 2008/03/18. eng.
81. Vis AN, Van Der Kwast TH. Prostatic intraepithelial neoplasia and putative precursor lesions of prostate cancer: a clinical perspective. *BJU Int*. 2001 Jul;88(2):147-57. PubMed PMID: 11446873. Epub 2001/07/12. eng.
82. Klink JC, Miocinovic R, Magi Galluzzi C, Klein EA. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Korean J Urol*. 2012 May;53(5):297-303. PubMed PMID: 22670187. Pubmed Central PMCID: 3364467. Epub 2012/06/07. eng.

83. Bostwick DG, Cheng L. Precursors of prostate cancer. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):4-27. PubMed PMID: 22212075. Epub 2012/01/04. eng.
84. Bostwick DG, Liu L, Brawer MK, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Rev Urol*. 2004 Fall;6(4):171-9. PubMed PMID: 16985598. Pubmed Central PMCID: 1472840. Epub 2006/09/21. eng.
85. Montironi R, Mazzucchelli R, Lopez-Beltran A, Cheng L, Scarpelli M. Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. *Nat Clin Pract Urol*. 2007 Jun;4(6):321-32. PubMed PMID: 17551536. Epub 2007/06/07. eng.
86. De Marzo AM, Putzi MJ, Nelson WG. New concepts in the pathology of prostatic epithelial carcinogenesis. *Urology*. 2001 Apr;57(4 Suppl 1):103-14. PubMed PMID: 11295606. Epub 2001/04/11. eng.
87. Franks LM. Atrophy and hyperplasia in the prostate proper. *J Pathol Bacteriol*. 1954 Oct;68(2):617-21. PubMed PMID: 14354565. Epub 1954/10/01. eng.
88. Liavag I. The localization of prostatic carcinoma. An autopsy study. *Scand J Urol Nephrol*. 1968;2(2):65-71. PubMed PMID: 4185315. Epub 1968/01/01. eng.
89. Shah R, Mucci NR, Amin A, Macoska JA, Rubin MA. Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: neoplastic precursor or innocent bystander? *Am J Pathol*. 2001 May;158(5):1767-73. PubMed PMID: 11337374. Pubmed Central PMCID: 1891965. Epub 2001/05/05. eng.
90. Putzi MJ, De Marzo AM. Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Urology*. 2000 Nov 1;56(5):828-32. PubMed PMID: 11068311. Epub 2000/11/09. eng.
91. De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI, Ali T, Billis A, Chan TY, et al. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol*. 2006 Oct;30(10):1281-91. PubMed PMID: 17001160. Epub 2006/09/27. eng.
92. Billis A. Prostatic atrophy. Clinicopathological significance. *Int Braz J Urol*. 2010 Jul-Aug;36(4):401-9. PubMed PMID: 20815946. Epub 2010/09/08. eng.
93. Amin MB, Tamboli P, Varma M, Srigley JR. Postatrophic hyperplasia of the prostate gland: a detailed analysis of its morphology in needle biopsy specimens. *Am J Surg Pathol*. 1999 Aug;23(8):925-31. PubMed PMID: 10435562. Epub 1999/08/06. eng.
94. Ruska KM, Sauvageot J, Epstein JI. Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy. *Am J Surg Pathol*. 1998 Sep;22(9):1073-7. PubMed PMID: 9737239. Epub 1998/09/16. eng.
95. De Marzo AM, Platz EA, Epstein JI, Ali T, Billis A, Chan TY, et al. A working group classification of focal prostate atrophy lesions. *Am J Surg Pathol*. 2006 Oct;30(10):1281-91. PubMed PMID: 17001160. Epub 2006/09/27. eng.
96. Wang W, Bergh A, Damber JE. Morphological transition of proliferative inflammatory atrophy to high-grade intraepithelial neoplasia and cancer in human prostate. *Prostate*. 2009 Sep 15;69(13):1378-86. PubMed PMID: 19507201. Epub 2009/06/10. eng.
97. Benedetti-Padrón Inés RN. Atrofia inflamatoria proliferativa: Potencial lesión precursora de adenocarcinoma prostático. *Revista Ciencias Biomédicas*. 2013 Enero-junio 2014;5(1):88-99.
98. Perletti G, Montanari E, Vral A, Gazzano G, Marras E, Mione S, et al. Inflammation, prostatitis, proliferative inflammatory atrophy: 'Fertile ground' for prostate cancer development? *Mol Med Report*. 2010 Jan-Feb;3(1):3-12. PubMed PMID: 21472193. Epub 2010/01/01. eng.
99. De Marzo AM, Meeker AK, Epstein JI, Coffey DS. Prostate stem cell compartments: expression of the cell cycle inhibitor p27Kip1 in normal, hyperplastic, and neoplastic cells. *Am J Pathol*. 1998 Sep;153(3):911-9. PubMed PMID: 9736039. Pubmed Central PMCID: 1853003. Epub 1998/09/15. eng.
100. Nakayama M, Bennett CJ, Hicks JL, Epstein JI, Platz EA, Nelson WG, et al. Hypermethylation of the human glutathione S-transferase-pi gene (GSTP1) CpG island is present in a subset of proliferative inflammatory atrophy lesions but not in normal or hyperplastic epithelium of the prostate: a detailed

- study using laser-capture microdissection. *Am J Pathol.* 2003 Sep;163(3):923-33. PubMed PMID: 12937133. Pubmed Central PMCID: 1868250. Epub 2003/08/26. eng.
101. Tomas D, Kruslin B, Rogatsch H, Schafer G, Belicza M, Mikuz G. Different types of atrophy in the prostate with and without adenocarcinoma. *Eur Urol.* 2007 Jan;51(1):98-103; discussion -4. PubMed PMID: 16824675. Epub 2006/07/11. eng.
102. Billis A. Prostatic atrophy: an autopsy study of a histologic mimic of adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 1998 Jan;11(1):47-54. PubMed PMID: 9556422. Epub 1998/04/29. eng.
103. Di Silverio F, Gentile V, De Matteis A, Mariotti G, Giuseppe V, Luigi PA, et al. Distribution of inflammation, pre-malignant lesions, incidental carcinoma in histologically confirmed benign prostatic hyperplasia: a retrospective analysis. *Eur Urol.* 2003 Feb;43(2):164-75. PubMed PMID: 12565775. Epub 2003/02/05. eng.
104. Yildiz-Sezer S, Verdorfer I, Schafer G, Rogatsch H, Bartsch G, Mikuz G. Assessment of aberrations on chromosome 8 in prostatic atrophy. *BJU Int.* 2006 Jul;98(1):184-8. PubMed PMID: 16831166. Epub 2006/07/13. eng.
105. Macoska JA, Trybus TM, Wojno KJ. 8p22 loss concurrent with 8c gain is associated with poor outcome in prostate cancer. *Urology.* 2000 May;55(5):776-82. PubMed PMID: 10792100. Epub 2000/05/03. eng.
106. Bethel CR, Faith D, Li X, Guan B, Hicks JL, Lan F, et al. Decreased NKX3.1 protein expression in focal prostatic atrophy, prostatic intraepithelial neoplasia, and adenocarcinoma: association with gleason score and chromosome 8p deletion. *Cancer Res.* 2006 Nov 15;66(22):10683-90. PubMed PMID: 17108105. Epub 2006/11/17. eng.
107. Gurel B, Iwata T, Koh CM, Jenkins RB, Lan F, Van Dang C, et al. Nuclear MYC protein overexpression is an early alteration in human prostate carcinogenesis. *Mod Pathol.* 2008 Sep;21(9):1156-67. PubMed PMID: 18567993. Pubmed Central PMCID: 3170853. Epub 2008/06/24. eng.
108. Tsujimoto Y, Takayama H, Nonomura N, Okuyama A, Aozasa K. Postatrophic hyperplasia of the prostate in Japan: histologic and immunohistochemical features and p53 gene mutation analysis. *Prostate.* 2002 Sep 1;52(4):279-87. PubMed PMID: 12210488. Epub 2002/09/05. eng.
109. Wang W, Bergh A, Damber JE. Chronic inflammation in benign prostate hyperplasia is associated with focal upregulation of cyclooxygenase-2, Bcl-2, and cell proliferation in the glandular epithelium. *Prostate.* 2004 Sep 15;61(1):60-72. PubMed PMID: 15287094. Epub 2004/08/03. eng.
110. Wang W, Bergh A, Damber JE. Increased expression of CCAAT/enhancer-binding protein beta in proliferative inflammatory atrophy of the prostate: relation with the expression of COX-2, the androgen receptor, and presence of focal chronic inflammation. *Prostate.* 2007 Aug 1;67(11):1238-46. PubMed PMID: 17570496. Epub 2007/06/16. eng.
111. Parsons JK, Nelson CP, Gage WR, Nelson WG, Kensler TW, De Marzo AM. GSTA1 expression in normal, preneoplastic, and neoplastic human prostate tissue. *Prostate.* 2001 Sep 15;49(1):30-7. PubMed PMID: 11550208. Epub 2001/09/11. eng.
112. Karaivanov M, Todorova K, Kuzmanov A, Hayrabyan S. Quantitative immunohistochemical detection of the molecular expression patterns in proliferative inflammatory atrophy. *Journal of molecular histology.* 2007 Mar;38(1):1-11. PubMed PMID: 17171435. Epub 2006/12/16. eng.
113. Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM, et al. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *Eur Urol.* 2004 Dec;46(6):698-708. PubMed PMID: 15548435. Epub 2004/11/19. eng.
114. Nelson WG, De Marzo AM, Yegnasubramanian S. Epigenetic alterations in human prostate cancers. *Endocrinology.* 2009 Sep;150(9):3991-4002. PubMed PMID: 19520778. Pubmed Central PMCID: 2736081. Epub 2009/06/13. eng.

115. Zha S, Gage WR, Sauvageot J, Saria EA, Putzi MJ, Ewing CM, et al. Cyclooxygenase-2 is up-regulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate, but not in prostate carcinoma. *Cancer Res.* 2001 Dec 15;61(24):8617-23. PubMed PMID: 11751373. Epub 2001/12/26. eng.
116. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *Prostate.* 2000 Jan;42(1):73-8. PubMed PMID: 10579801. Epub 1999/12/01. eng.
117. Kirschenbaum A, Klausner AP, Lee R, Unger P, Yao S, Liu XH, et al. Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human prostate. *Urology.* 2000 Oct 1;56(4):671-6. PubMed PMID: 11018637. Epub 2000/10/06. eng.
118. Zha S, Yegnasubramanian V, Nelson WG, Isaacs WB, De Marzo AM. Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective. *Cancer Lett.* 2004 Nov 8;215(1):1-20. PubMed PMID: 15374627. Epub 2004/09/18. eng.
119. Jarrard DF, Kinoshita H, Shi Y, Sandefur C, Hoff D, Meisner LF, et al. Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Res.* 1998 Dec 1;58(23):5310-4. PubMed PMID: 9850055. Epub 1998/12/16. eng.
120. Takahashi S, Inaguma S, Sakakibara M, Cho YM, Suzuki S, Ikeda Y, et al. DNA methylation in the androgen receptor gene promoter region in rat prostate cancers. *Prostate.* 2002 Jun 1;52(1):82-8. PubMed PMID: 11992622. Epub 2002/05/07. eng.
121. Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2002 Mar 14;1602(1):73-87. PubMed PMID: 11960696. Epub 2002/04/19. eng.
122. Faith D, Han S, Lee DK, Friedl A, Hicks JL, De Marzo AM, et al. p16 is upregulated in proliferative inflammatory atrophy of the prostate. *Prostate.* 2005 Sep 15;65(1):73-82. PubMed PMID: 15880529. Epub 2005/05/10. eng.
123. Vral A, Magri V, Montanari E, Gazzano G, Gourvas V, Marras E, et al. Topographic and quantitative relationship between prostate inflammation, proliferative inflammatory atrophy and low-grade prostate intraepithelial neoplasia: A biopsy study in chronic prostatitis patients. *International journal of oncology.* 2012 Dec;41(6):1950-8. PubMed PMID: 23026863. Epub 2012/10/03. eng.
124. Billis A, Magna LA. Inflammatory atrophy of the prostate. Prevalence and significance. *Arch Pathol Lab Med.* 2003 Jul;127(7):840-4. PubMed PMID: 12823038. Epub 2003/06/26. eng.
125. Postma R, Schroder FH, van der Kwast TH. Atrophy in prostate needle biopsy cores and its relationship to prostate cancer incidence in screened men. *Urology.* 2005 Apr;65(4):745-9. PubMed PMID: 15833520. Epub 2005/04/19. eng.
126. Anton RC, Kattan MW, Chakraborty S, Wheeler TM. Postatrophic hyperplasia of the prostate: lack of association with prostate cancer. *Am J Surg Pathol.* 1999 Aug;23(8):932-6. PubMed PMID: 10435563. Epub 1999/08/06. eng.
127. Asimakopoulos AD, Miano R, Mauriello A, Costantini S, Pasqualetti P, Liberati E, et al. Significance of focal proliferative atrophy lesions in prostate biopsy cores that test negative for prostate carcinoma. *Urol Oncol.* 2011 Nov-Dec;29(6):690-7. PubMed PMID: 20451420. Epub 2010/05/11. eng.
128. Billis A, Freitas LL, Magna LA, Ferreira U. Inflammatory atrophy on prostate needle biopsies: is there topographic relationship to cancer? *Int Braz J Urol.* 2007 May-Jun;33(3):355-60; discussion 61-3. PubMed PMID: 17626652. Epub 2007/07/14. eng.
129. Brasil AA, Favaro WJ, Cagnon VH, Ferreira U, Billis A. Atrophy in specimens of radical prostatectomy: is there topographic relation to high-grade prostatic intraepithelial neoplasia or cancer? *Int Urol Nephrol.* 2011 Jun;43(2):397-403. PubMed PMID: 20632094. Epub 2010/07/16. eng.
130. Packer JR, Maitland NJ. The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2016 Jun;1863(6 Pt A):1238-60. PubMed PMID: 26921821. Epub 2016/02/28. eng.

131. Shoag J, Barbieri CE. Clinical variability and molecular heterogeneity in prostate cancer. *Asian journal of andrology*. 2016 Jul-Aug;18(4):543-8. PubMed PMID: 27080479. Pubmed Central PMCID: 4955177. Epub 2016/04/16. eng.
132. Eder IE, Bektic J, Haag P, Bartsch G, Klocker H. Genes differentially expressed in prostate cancer. *BJU Int*. 2004 May;93(8):1151-5. PubMed PMID: 15142130. Epub 2004/05/15. eng.
133. Gorlov IP, Byun J, Gorlova OY, Aparicio AM, Efstathiou E, Logothetis CJ. Candidate pathways and genes for prostate cancer: a meta-analysis of gene expression data. *BMC medical genomics*. 2009;2:48. PubMed PMID: 19653896. Pubmed Central PMCID: 2731785. Epub 2009/08/06. eng.
134. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2015 Jun;15(6):321-33. PubMed PMID: 25998712. Epub 2015/05/23. eng.
135. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in molecular medicine*. 2014 Aug;20(8):460-9. PubMed PMID: 25027972. Epub 2014/07/17. eng.
136. Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO molecular medicine*. 2012 Mar;4(3):143-59. PubMed PMID: 22351564. Pubmed Central PMCID: 3376845. Epub 2012/02/22. eng.
137. Fabris L, Ceder Y, Chinnaiyan AM, Jenster GW, Sorensen KD, Tomlins S, et al. The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers. *Eur Urol*. 2016 Jan 21. PubMed PMID: 26806656. Epub 2016/01/26. Eng.
138. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nature biotechnology*. 2008 Apr;26(4):462-9. PubMed PMID: 18362881. Epub 2008/03/26. eng.
139. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006 Feb 14;103(7):2257-61. PubMed PMID: 16461460. Pubmed Central PMCID: 1413718. Epub 2006/02/08. eng.
140. Zhang J, Ma L. MicroRNA control of epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer metastasis reviews*. 2012 Dec;31(3-4):653-62. PubMed PMID: 22684369. Pubmed Central PMCID: 3686549. Epub 2012/06/12. eng.
141. Hellwinkel OJ, Sellier C, Sylvester YM, Brase JC, Isbarn H, Erbersdobler A, et al. A Cancer-Indicative microRNA Pattern in Normal Prostate Tissue. *International journal of molecular sciences*. 2013;14(3):5239-49. PubMed PMID: 23459235. Pubmed Central PMCID: 3634476. Epub 2013/03/06. eng.
142. Khoshnaw SM, Powe DG, Ellis IO, Green AR. Detection and quantification of microRNAs in laser-microdissected formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Methods Mol Biol*. 2011;755:119-42. PubMed PMID: 21761299. Epub 2011/07/16. eng.
143. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC biotechnology*. 2007;7:36. PubMed PMID: 17603869. Pubmed Central PMCID: 1914054. Epub 2007/07/03. eng.
144. Schuster C, Budczies J, Faber C, Kirchner T, Hlubek F. MicroRNA expression profiling of specific cells in complex archival tissue stained by immunohistochemistry. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2011 Jan;91(1):157-65. PubMed PMID: 20661226. Epub 2010/07/28. eng.
145. Majid S, Dar AA, Saini S, Shahryari V, Arora S, Zaman MS, et al. miRNA-34b inhibits prostate cancer through demethylation, active chromatin modifications, and AKT pathways. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013 Jan 1;19(1):73-84. PubMed PMID: 23147995. Pubmed Central PMCID: 3910324. Epub 2012/11/14. eng.

146. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005 Jun 09;435(7043):834-8. PubMed PMID: 15944708. Epub 2005/06/10. eng.
147. Budd WT, Weaver DE, Anderson J, Zehner ZE. microRNA dysregulation in prostate cancer: network analysis reveals preferential regulation of highly connected nodes. *Chemistry & biodiversity*. 2012 May;9(5):857-67. PubMed PMID: 22589088. Pubmed Central PMCID: 3386794. Epub 2012/05/17. eng.
148. Nam SK, Im J, Kwak Y, Han N, Nam KH, Seo AN, et al. Effects of fixation and storage of human tissue samples on nucleic Acid preservation. *Korean journal of pathology*. 2014 Feb;48(1):36-42. PubMed PMID: 24627693. Pubmed Central PMCID: 3950233. Epub 2014/03/15. eng.
149. Comanescu M, Annaratone L, D'Armento G, Cardos G, Sapino A, Bussolati G. Critical steps in tissue processing in histopathology. *Recent patents on DNA & gene sequences*. 2012 Apr;6(1):22-32. PubMed PMID: 22208680. Epub 2012/01/03. eng.
150. Baker M. Biorepositories: Building better biobanks. *Nature*. 2012 Jun 7;486(7401):141-6. PubMed PMID: 22678297. Epub 2012/06/09. eng.
151. Bao WG, Zhang X, Zhang JG, Zhou WJ, Bi TN, Wang JC, et al. Biobanking of fresh-frozen human colon tissues: impact of tissue ex-vivo ischemia times and storage periods on RNA quality. *Annals of surgical oncology*. 2013 May;20(5):1737-44. PubMed PMID: 22711177. Epub 2012/06/20. eng.
152. Erickson HS, Josephson JW, Vira M, Albert PS, Gillespie JW, Rodriguez-Canales J, et al. Influence of hypoxia induced by minimally invasive prostatectomy on gene expression: implications for biomarker analysis. *American journal of translational research*. 2010;2(3):210-22. PubMed PMID: 20589162. Pubmed Central PMCID: 2892411. Epub 2010/07/01. eng.
153. Liu H, McDowell TL, Hanson NE, Tang X, Fujimoto J, Rodriguez-Canales J. Laser capture microdissection for the investigative pathologist. *Veterinary pathology*. 2014 Jan;51(1):257-69. PubMed PMID: 24227008. Epub 2013/11/15. eng.
154. Espina V, Geho D, Mehta AI, Petricoin EF, 3rd, Liotta LA, Rosenblatt KP. Pathology of the future: molecular profiling for targeted therapy. *Cancer investigation*. 2005;23(1):36-46. PubMed PMID: 15779867. Epub 2005/03/23. eng.
155. Rodriguez-Canales J, Hanson JC, Hipp JD, Balis UJ, Tangrea MA, Emmert-Buck MR, et al. Optimal molecular profiling of tissue and tissue components: defining the best processing and microdissection methods for biomedical applications. *Methods Mol Biol*. 2013;980:61-120. PubMed PMID: 23359150. Epub 2013/01/30. eng.
156. Gouveia GR, Ferreira SC, Ferreira JE, Siqueira SA, Pereira J. Comparison of two methods of RNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue specimens. *BioMed research international*. 2014;2014:151724. PubMed PMID: 25105117. Pubmed Central PMCID: 4106052. Epub 2014/08/12. eng.
157. Xie R, Chung JY, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, Nakatsuka N, et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2011 Apr;59(4):356-65. PubMed PMID: 21411807. Pubmed Central PMCID: 3201147. Epub 2011/03/18. eng.
158. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples. *Nucleic acids research*. 1999 Nov 15;27(22):4436-43. PubMed PMID: 10536153. Pubmed Central PMCID: 148727. Epub 1999/10/28. eng.
159. Chung JY, Hewitt SM. An optimized RNA extraction method from archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Methods Mol Biol*. 2010;611:19-27. PubMed PMID: 19960319. Epub 2009/12/05. eng.
160. Roberts L, Bowers J, Sensinger K, Lisowski A, Getts R, Anderson MG. Identification of methods for use of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in RNA expression profiling. *Genomics*. 2009 Nov;94(5):341-8. PubMed PMID: 19660539. Epub 2009/08/08. eng.

161. Cox ML, Schray CL, Luster CN, Stewart ZS, Korytko PJ, KN MK, et al. Assessment of fixatives, fixation, and tissue processing on morphology and RNA integrity. *Experimental and molecular pathology*. 2006 Apr;80(2):183-91. PubMed PMID: 16332367. Epub 2005/12/08. eng.
162. Ahram M, Flaig MJ, Gillespie JW, Duray PH, Linehan WM, Ornstein DK, et al. Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. *Proteomics*. 2003 Apr;3(4):413-21. PubMed PMID: 12687609. Epub 2003/04/11. eng.
163. Rodriguez-Canales J, Hanson JC, Tangrea MA, Erickson HS, Albert PS, Wallis BS, et al. Identification of a unique epigenetic sub-microenvironment in prostate cancer. *The Journal of pathology*. 2007 Mar;211(4):410-9. PubMed PMID: 17278115. Epub 2007/02/06. eng.
164. Nonn L, Vaishnav A, Gallagher L, Gann PH. mRNA and micro-RNA expression analysis in laser-capture microdissected prostate biopsies: valuable tool for risk assessment and prevention trials. *Experimental and molecular pathology*. 2010 Feb;88(1):45-51. PubMed PMID: 19874819. Pubmed Central PMCID: 2815196. Epub 2009/10/31. eng.
165. Kachroo N, Warren AY, Gnanapragasam VJ. Multi-transcript profiling in archival diagnostic prostate cancer needle biopsies to evaluate biomarkers in non-surgically treated men. *BMC cancer*. 2014;14:673. PubMed PMID: 25227682. Pubmed Central PMCID: 4174634. Epub 2014/09/18. eng.
166. Dunn TA, Fedor H, Isaacs WB, De Marzo AM, Luo J. Genome-wide expression analysis of recently processed formalin-fixed paraffin embedded human prostate tissues. *Prostate*. 2009 Feb 1;69(2):214-8. PubMed PMID: 18973134. Pubmed Central PMCID: 2612089. Epub 2008/11/01. eng.
167. Nonn L, Ananthanarayanan V, Gann PH. Evidence for field cancerization of the prostate. *Prostate*. 2009 Sep 15;69(13):1470-9. PubMed PMID: 19462462. Pubmed Central PMCID: 3690597. Epub 2009/05/23. eng.
168. Grabinski TM, Kneynsberg A, Manfredsson FP, Kanaan NM. A method for combining RNAscope in situ hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures. *PLoS One*. 2015;10(3):e0120120. PubMed PMID: 25794171. Pubmed Central PMCID: 4368734. Epub 2015/03/21. eng.
169. Player AN, Shen LP, Kenny D, Antao VP, Kolberg JA. Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2001 May;49(5):603-12. PubMed PMID: 11304798. Epub 2001/04/17. eng.
170. Cassidy A, Jones J. Developments in in situ hybridisation. *Methods*. 2014 Nov;70(1):39-45. PubMed PMID: 24747923. Epub 2014/04/22. eng.
171. Wang F, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2012 Jan;14(1):22-9. PubMed PMID: 22166544. Pubmed Central PMCID: 3338343. Epub 2011/12/15. eng.
172. Anderson CM, Zhang B, Miller M, Butko E, Wu X, Laver T, et al. Fully Automated RNAscope In Situ Hybridization Assays for Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Cells and Tissues. *Journal of cellular biochemistry*. 2016 Oct;117(10):2201-8. PubMed PMID: 27191821. Pubmed Central PMCID: 5132049. Epub 2016/05/19. eng.
173. Wang H, Su N, Wang LC, Wu X, Bui S, Nielsen A, et al. Quantitative ultrasensitive bright-field RNA in situ hybridization with RNAscope. *Methods Mol Biol*. 2014;1211:201-12. PubMed PMID: 25218387. Epub 2014/09/15. eng.
174. Wang H, Su N, Wang LC, Wu X, Bui S, Nielsen A, et al. Dual-color ultrasensitive bright-field RNA in situ hybridization with RNAscope. *Methods Mol Biol*. 2014;1211:139-49. PubMed PMID: 25218383. Epub 2014/09/15. eng.
175. Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, Tyagi S. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nature methods*. 2008 Oct;5(10):877-9. PubMed PMID: 18806792. Pubmed Central PMCID: 3126653. Epub 2008/09/23. eng.

176. Buxbaum AR, Haimovich G, Singer RH. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2015 Feb;16(2):95-109. PubMed PMID: 25549890. Pubmed Central PMCID: 4484810. Epub 2015/01/01. eng.
177. Marusyk A, Almendro V, Polyak K. Intra-tumour heterogeneity: a looking glass for cancer? *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr 19;12(5):323-34. PubMed PMID: 22513401. Epub 2012/04/20. eng.
178. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011 Mar 4;144(5):646-74. PubMed PMID: 21376230. Epub 2011/03/08. eng.
179. Lee JC, Jeng YM, Su SY, Wu CT, Tsai KS, Lee CH, et al. Identification of a novel FN1-FGFR1 genetic fusion as a frequent event in phosphaturic mesenchymal tumour. *The Journal of pathology*. 2015 Mar;235(4):539-45. PubMed PMID: 25319834. Epub 2014/10/17. eng.
180. Du Z, Abedalthagafi M, Aizer AA, McHenry AR, Sun HH, Bray MA, et al. Increased expression of the immune modulatory molecule PD-L1 (CD274) in anaplastic meningioma. *Oncotarget*. 2015 Mar 10;6(7):4704-16. PubMed PMID: 25609200. Pubmed Central PMCID: 4467109. Epub 2015/01/23. eng.
181. Staudt ND, Jo M, Hu J, Bristow JM, Pizzo DP, Gaultier A, et al. Myeloid cell receptor LRP1/CD91 regulates monocyte recruitment and angiogenesis in tumors. *Cancer Res*. 2013 Jul 01;73(13):3902-12. PubMed PMID: 23633492. Pubmed Central PMCID: 3702673. Epub 2013/05/02. eng.
182. Warrick JI, Tomlins SA, Carskadon SL, Young AM, Siddiqui J, Wei JT, et al. Evaluation of tissue PCA3 expression in prostate cancer by RNA in situ hybridization--a correlative study with urine PCA3 and TMPRSS2-ERG. *Mod Pathol*. 2014 Apr;27(4):609-20. PubMed PMID: 24072184. Pubmed Central PMCID: 3968238. Epub 2013/09/28. eng.
183. Kunju LP, Carskadon S, Siddiqui J, Tomlins SA, Chinnaiyan AM, Palanisamy N. Novel RNA hybridization method for the in situ detection of ETV1, ETV4, and ETV5 gene fusions in prostate cancer. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2014 Sep;22(8):e32-40. PubMed PMID: 25203299. Pubmed Central PMCID: 4159774. Epub 2014/09/10. eng.
184. Legres LG, Janin A, Masselon C, Bertheau P. Beyond laser microdissection technology: follow the yellow brick road for cancer research. *American journal of cancer research*. 2014;4(1):1-28. PubMed PMID: 24482735. Pubmed Central PMCID: 3902229. Epub 2014/02/01. eng.
185. Cheng L, Zhang S, MacLennan GT, Williamson SR, Davidson DD, Wang M, et al. Laser-assisted microdissection in translational research: theory, technical considerations, and future applications. *Applied immunohistochemistry & molecular morphology : AIMM / official publication of the Society for Applied Immunohistochemistry*. 2013 Jan;21(1):31-47. PubMed PMID: 22495368. Epub 2012/04/13. eng.
186. Liu A. Laser capture microdissection in the tissue biorepository. *Journal of biomolecular techniques : JBT*. 2010 Sep;21(3):120-5. PubMed PMID: 20808641. Pubmed Central PMCID: 2922833. Epub 2010/09/03. eng.
187. Espina V, Milia J, Wu G, Cowherd S, Liotta LA. Laser capture microdissection. *Methods Mol Biol*. 2006;319:213-29. PubMed PMID: 16719357. Epub 2006/05/25. eng.
188. Best CJ, Emmert-Buck MR. Molecular profiling of tissue samples using laser capture microdissection. *Expert review of molecular diagnostics*. 2001 May;1(1):53-60. PubMed PMID: 11901800. Epub 2002/03/21. eng.
189. Suarez-Quian CA, Goldstein SR, Pohida T, Smith PD, Peterson JI, Wellner E, et al. Laser capture microdissection of single cells from complex tissues. *BioTechniques*. 1999 Feb;26(2):328-35. PubMed PMID: 10023545. Epub 1999/02/19. eng.
190. Wang H, Owens JD, Shih JH, Li MC, Bonner RF, Mushinski JF. Histological staining methods preparatory to laser capture microdissection significantly affect the integrity of the cellular RNA. *BMC genomics*. 2006;7:97. PubMed PMID: 16643667. Pubmed Central PMCID: 1513394. Epub 2006/04/29. eng.

191. Erickson HS, Albert PS, Gillespie JW, Rodriguez-Canales J, Marston Linehan W, Pinto PA, et al. Quantitative RT-PCR gene expression analysis of laser microdissected tissue samples. *Nature protocols*. 2009;4(6):902-22. PubMed PMID: 19478806. Pubmed Central PMCID: 2760821. Epub 2009/05/30. eng.
192. von Ahlfen S, Missel A, Bendrat K, Schlumpberger M. Determinants of RNA quality from FFPE samples. *PLoS One*. 2007;2(12):e1261. PubMed PMID: 18060057. Pubmed Central PMCID: 2092395. Epub 2007/12/07. eng.
193. Botling J, Edlund K, Segersten U, Tahmasebpoor S, Engstrom M, Sundstrom M, et al. Impact of thawing on RNA integrity and gene expression analysis in fresh frozen tissue. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2009 Mar;18(1):44-52. PubMed PMID: 19214109. Epub 2009/02/14. eng.
194. Hewitt SM, Lewis FA, Cao Y, Conrad RC, Cronin M, Danenberg KD, et al. Tissue handling and specimen preparation in surgical pathology: issues concerning the recovery of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2008 Dec;132(12):1929-35. PubMed PMID: 19061293. Epub 2008/12/09. eng.
195. Tangrea MA, Mukherjee S, Gao B, Markey SP, Du Q, Armani M, et al. Effect of immunohistochemistry on molecular analysis of tissue samples: implications for microdissection technologies. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2011 Jun;59(6):591-600. PubMed PMID: 21430260. Pubmed Central PMCID: 3201191. Epub 2011/03/25. eng.
196. Rubin MA. Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. *The Journal of pathology*. 2001 Sep;195(1):80-6. PubMed PMID: 11568894. Epub 2001/09/25. eng.
197. Clement-Ziza M, Munnich A, Lyonnet S, Jaubert F, Besmond C. Stabilization of RNA during laser capture microdissection by performing experiments under argon atmosphere or using ethanol as a solvent in staining solutions. *RNA*. 2008 Dec;14(12):2698-704. PubMed PMID: 18945804. Pubmed Central PMCID: 2590969. Epub 2008/10/24. eng.
198. Araki T, Yamamoto A, Yamada M. Accurate determination of DNA content in single cell nuclei stained with Hoechst 33258 fluorochrome at high salt concentration. *Histochemistry*. 1987;87(4):331-8. PubMed PMID: 2447036. Epub 1987/01/01. eng.
199. Shukla CJ, Pennington CJ, Riddick AC, Sethia KK, Ball RY, Edwards DR. Laser-capture microdissection in prostate cancer research: establishment and validation of a powerful tool for the assessment of tumour-stroma interactions. *BJU Int*. 2008 Mar;101(6):765-74. PubMed PMID: 18190638. Epub 2008/01/15. eng.
200. Joseph A, Gnanapragasam VJ. Laser-capture microdissection and transcriptional profiling in archival FFPE tissue in prostate cancer. *Methods Mol Biol*. 2011;755:291-300. PubMed PMID: 21761313. Epub 2011/07/16. eng.
201. Domazet B, Maclennan GT, Lopez-Beltran A, Montironi R, Cheng L. Laser capture microdissection in the genomic and proteomic era: targeting the genetic basis of cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*. 2008;1(6):475-88. PubMed PMID: 18787684. Pubmed Central PMCID: 2480591. Epub 2008/09/13. eng.
202. Jiang R, Scott RS, Hutt-Fletcher LM. Laser capture microdissection for analysis of gene expression in formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Methods Mol Biol*. 2011;755:77-84. PubMed PMID: 21761295. Epub 2011/07/16. eng.
203. Schlomm T, Luebke AM, Sultmann H, Hellwinkel OJ, Sauer U, Poustka A, et al. Extraction and processing of high quality RNA from impalpable and macroscopically invisible prostate cancer for microarray gene expression analysis. *International journal of oncology*. 2005 Sep;27(3):713-20. PubMed PMID: 16077921. Epub 2005/08/04. eng.

204. 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;10:165. PubMed PMID: 20426842. Pubmed Central PMCID: 2876079. Epub 2010/04/30. eng.
205. Dakhova O, Ozen M, Creighton CJ, Li R, Ayala G, Rowley D, et al. Global gene expression analysis of reactive stroma in prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009 Jun 15;15(12):3979-89. PubMed PMID: 19509179. Pubmed Central PMCID: 2734921. Epub 2009/06/11. eng.
206. Richardson AM, Woodson K, Wang Y, Rodriguez-Canales J, Erickson HS, Tangrea MA, et al. Global expression analysis of prostate cancer-associated stroma and epithelia. *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*. 2007 Dec;16(4):189-97. PubMed PMID: 18043281. Epub 2007/11/29. eng.
207. Furusato B, Shaheduzzaman S, Petrovics G, Dobi A, Seifert M, Ravindranath L, et al. Transcriptome analyses of benign and malignant prostate epithelial cells in formalin-fixed paraffin-embedded whole-mounted radical prostatectomy specimens. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 2008;11(2):194-7. PubMed PMID: 17768422. Epub 2007/09/05. eng.
208. Pinzani P, Lind K, Malentacchi F, Nesi G, Salvianti F, Villari D, et al. Prostate-specific antigen mRNA and protein levels in laser microdissected cells of human prostate measured by real-time reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction and immuno-quantitative polymerase chain reaction. *Human pathology*. 2008 Oct;39(10):1474-82. PubMed PMID: 18619642. Epub 2008/07/16. eng.
209. Walton TJ, Li G, McCulloch TA, Seth R, Powe DG, Bishop MC, et al. Quantitative RT-PCR analysis of estrogen receptor gene expression in laser microdissected prostate cancer tissue. *Prostate*. 2009 Jun 1;69(8):810-9. PubMed PMID: 19189301. Epub 2009/02/04. eng.
210. Mostafavi-Pour Z, Kianpour S, Dehghani M, Mokarram P, Torabinejad S, Monabati A. Methylation of Integrin alpha4 and E-Cadherin Genes in Human Prostate Cancer. *Pathology oncology research : POR*. 2015 Mar 6. PubMed PMID: 25743258. Epub 2015/03/07. Eng.
211. Mainetti LE, Zhe X, Diedrich J, Saliganan AD, Cho WJ, Cher ML, et al. Bone-induced c-kit expression in prostate cancer: a driver of intraosseous tumor growth. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2015 Jan 1;136(1):11-20. PubMed PMID: 24798488. Pubmed Central PMCID: 4199873. Epub 2014/05/07. eng.
212. Zhang M, Wang R, Wang Y, Diao F, Lu F, Gao D, et al. The CXXC finger 5 protein is required for DNA damage-induced p53 activation. *Science in China Series C, Life sciences / Chinese Academy of Sciences*. 2009 Jun;52(6):528-38. PubMed PMID: 19557330. Epub 2009/06/27. eng.
213. Knappskog S, Myklebust LM, Busch C, Aloysius T, Varhaug JE, Lonning PE, et al. RINF (CXXC5) is overexpressed in solid tumors and is an unfavorable prognostic factor in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 2011 Oct;22(10):2208-15. PubMed PMID: 21325450. Epub 2011/02/18. eng.
214. Kuhn A, Valk PJ, Sanders MA, Ivey A, Hills RK, Mills KI, et al. Downregulation of the Wnt inhibitor CXXC5 predicts a better prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015 May 7;125(19):2985-94. PubMed PMID: 25805812. Pubmed Central PMCID: 4463809. Epub 2015/03/26. eng.
215. Lee SH, Kim MY, Kim HY, Lee YM, Kim H, Nam KA, et al. The Dishevelled-binding protein CXXC5 negatively regulates cutaneous wound healing. *The Journal of experimental medicine*. 2015 Jun 29;212(7):1061-80. PubMed PMID: 26056233. Pubmed Central PMCID: 4493411. Epub 2015/06/10. eng.
216. Oldberg A, Antonsson P, Lindblom K, Heinegard D. A collagen-binding 59-kd protein (fibromodulin) is structurally related to the small interstitial proteoglycans PG-S1 and PG-S2 (decorin). *The EMBO journal*. 1989 Sep;8(9):2601-4. PubMed PMID: 2531085. Pubmed Central PMCID: 401265. Epub 1989/09/01. eng.
217. Schaefer L, Grone HJ, Raslik I, Robenek H, Ugorcakova J, Budny S, et al. Small proteoglycans of normal adult human kidney: distinct expression patterns of decorin, biglycan, fibromodulin, and

- lumican. *Kidney international*. 2000 Oct;58(4):1557-68. PubMed PMID: 11012890. Epub 2000/09/30. eng.
218. Chen S, Oldberg A, Chakravarti S, Birk DE. Fibromodulin regulates collagen fibrillogenesis during peripheral corneal development. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2010 Mar;239(3):844-54. PubMed PMID: 20108350. Pubmed Central PMCID: 2965449. Epub 2010/01/29. Eng.
219. Chakravarti S. Functions of lumican and fibromodulin: lessons from knockout mice. *Glycoconjugate journal*. 2002 May-Jun;19(4-5):287-93. PubMed PMID: 12975607. Epub 2003/09/17. Eng.
220. Oldberg A, Kalamajski S, Salnikov AV, Stuhr L, Morgelin M, Reed RK, et al. Collagen-binding proteoglycan fibromodulin can determine stroma matrix structure and fluid balance in experimental carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007 Aug 28;104(35):13966-71. PubMed PMID: 17715296. Pubmed Central PMCID: 1955775. Epub 2007/08/24. eng.
221. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2005 Sep 16;280(37):32301-8. PubMed PMID: 16046396. Epub 2005/07/28. eng.
222. Adini I, Ghosh K, Adini A, Chi ZL, Yoshimura T, Benny O, et al. Melanocyte-secreted fibromodulin promotes an angiogenic microenvironment. *The Journal of clinical investigation*. 2014 Jan;124(1):425-36. PubMed PMID: 24355922. Pubmed Central PMCID: 3871226. Epub 2013/12/21. Eng.
223. 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. *The Biochemical journal*. 1994 Sep 1;302 (Pt 2):527-34. PubMed PMID: 8093006. Pubmed Central PMCID: 1137259. Epub 1994/09/01. Eng.
224. 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 Aug;157(2):423-33. PubMed PMID: 10934147. Pubmed Central PMCID: 1850122. Epub 2000/08/10. eng.
225. 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. *The Journal of biological chemistry*. 2011 Feb 25;286(8):6414-22. PubMed PMID: 21156791. Pubmed Central PMCID: 3057796. Epub 2010/12/16. eng.
226. Iozzo RV, Sanderson RD. Proteoglycans in cancer biology, tumour microenvironment and angiogenesis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2011 May;15(5):1013-31. PubMed PMID: 21155971. Pubmed Central PMCID: 3633488. Epub 2010/12/16. Eng.
227. 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. *Molecular cancer research : MCR*. 2003 Mar;1(5):346-61. PubMed PMID: 12651908. Epub 2003/03/26. Eng.
228. 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 Feb 15;105(4):1566-73. PubMed PMID: 15471955. Epub 2004/10/09. Eng.
229. Hassan DA, Samy RM, Abd-Elrahim OT, Salib CS. Study of fibromodulin gene expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Journal of the Egyptian National Cancer Institute*. 2011 Mar;23(1):11-5. PubMed PMID: 22099931. Epub 2011/11/22. Eng.

230. Benedetti I, Bettin A, Reyes N. Inflammation and focal atrophy in prostate needle biopsy cores and association to prostatic adenocarcinoma. *Annals of diagnostic pathology*. 2016 Oct;24:55-61. PubMed PMID: 27649956. Epub 2016/09/22. eng.
231. Dolcet X, Llobet D, Pallares J, Rue M, Comella JX, Matias-Guiu X. FLIP is frequently expressed in endometrial carcinoma and has a role in resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005 Jul;85(7):885-94. PubMed PMID: 15864316. Epub 2005/05/03. eng.
232. Fedor HL, De Marzo AM. Practical methods for tissue microarray construction. *Methods in molecular medicine*. 2005;103:89-101. PubMed PMID: 15542899. Epub 2004/11/16. eng.
233. Schatteman PH, Hoekx L, Wyndaele JJ, Jeuris W, Van Marck E. Inflammation in prostate biopsies of men without prostatic malignancy or clinical prostatitis: correlation with total serum PSA and PSA density. *Eur Urol*. 2000 Apr;37(4):404-12. PubMed PMID: 10765070. Epub 2000/04/15. eng.
234. Nickel JC, True LD, Krieger JN, Berger RE, Boag AH, Young ID. Consensus development of a histopathological classification system for chronic prostatic inflammation. *BJU Int*. 2001 Jun;87(9):797-805. PubMed PMID: 11412216. Epub 2001/06/20. eng.
235. Moreira DM, Nickel JC, Gerber L, Muller RL, Andriole GL, Castro-Santamaria R, et al. Baseline prostate inflammation is associated with a reduced risk of prostate cancer in men undergoing repeat prostate biopsy: results from the REDUCE study. *Cancer*. 2014 Jan 15;120(2):190-6. PubMed PMID: 24323568. Epub 2013/12/11. eng.
236. Yli-Hemminki TH, Laurila M, Auvinen A, Maattanen L, Huhtala H, Tammela TL, et al. Histological inflammation and risk of subsequent prostate cancer among men with initially elevated serum prostate-specific antigen (PSA) concentration in the Finnish prostate cancer screening trial. *BJU Int*. 2013 Oct;112(6):735-41. PubMed PMID: 23746332. Epub 2013/06/12. eng.
237. Stimac G, Spajic B, Reljic A, Katusic J, Popovic A, Grubisic I, et al. Effect of histological inflammation on total and free serum prostate-specific antigen values in patients without clinically detectable prostate cancer. *Korean J Urol*. 2014 Aug;55(8):527-32. PubMed PMID: 25132947. Pubmed Central PMCID: 4131081. Epub 2014/08/19. eng.
238. Cheng I, Witte JS, Jacobsen SJ, Haque R, Quinn VP, Quesenberry CP, et al. Prostatitis, sexually transmitted diseases, and prostate cancer: the California Men's Health Study. *PLoS One*. 2010;5(1):e8736. PubMed PMID: 20090948. Pubmed Central PMCID: 2806913. Epub 2010/01/22. eng.
239. Terakawa T, Miyake H, Kanomata N, Kumano M, Takenaka A, Fujisawao M. Inverse association between histologic inflammation in needle biopsy specimens and prostate cancer in men with serum PSA of 10-50 ng/mL. *Urology*. 2008 Dec;72(6):1194-7. PubMed PMID: 18829081. Epub 2008/10/03. eng.
240. Wolters T, Roobol MJ, Schroder FH, van der Kwast TH, Roemeling S, van der Crujisen-Koeter IW, et al. Can non-malignant biopsy features identify men at increased risk of biopsy-detectable prostate cancer at re-screening after 4 years? *BJU Int*. 2008 Feb;101(3):283-8. PubMed PMID: 17922858. Epub 2007/10/10. eng.
241. Kryvenko ON, Jankowski M, Chitale DA, Tang D, Rundle A, Trudeau S, et al. Inflammation and preneoplastic lesions in benign prostate as risk factors for prostate cancer. *Mod Pathol*. 2012 Jul;25(7):1023-32. PubMed PMID: 22460812. Pubmed Central PMCID: 3589982. Epub 2012/03/31. eng.
242. Murtola TJ, Gurel B, Umbehr M, Lucia MS, Thompson IM, Jr., Goodman PJ, et al. Inflammation in Benign Prostate Tissue and Prostate Cancer in the Finasteride Arm of the Prostate Cancer Prevention Trial. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2016 Mar;25(3):463-9. PubMed PMID: 26715424. Pubmed Central PMCID: 4779655. Epub 2015/12/31. eng.
243. Anjum I, Ahmed M, Azzopardi A, Mufti GR. Prostatic infarction/infection in acute urinary retention secondary to benign prostatic hyperplasia. *J Urol*. 1998 Sep;160(3 Pt 1):792-3. PubMed PMID: 9720549. Epub 1998/08/28. eng.

244. Irani J, Goujon JM, Ragni E, Peyrat L, Hubert J, Saint F, et al. High-grade inflammation in prostate cancer as a prognostic factor for biochemical recurrence after radical prostatectomy. Pathologist Multi Center Study Group. *Urology*. 1999 Sep;54(3):467-72. PubMed PMID: 10475356. Epub 1999/09/04. eng.
245. Kaplan SA. Analysis of the inflammatory network in benign prostate hyperplasia and prostate cancer. *J Urol*. 2005 Jan;173(1):161. PubMed PMID: 15592064. Epub 2004/12/14. eng.
246. Lee MC, Moussa AS, Yu C, Kattan MW, Magi-Galluzzi C, Jones JS. Multifocal high grade prostatic intraepithelial neoplasia is a risk factor for subsequent prostate cancer. *J Urol*. 2010 Nov;184(5):1958-62. PubMed PMID: 20846692. Epub 2010/09/18. eng.
247. Merrimen JL, Jones G, Walker D, Leung CS, Kapusta LR, Srigley JR. Multifocal high grade prostatic intraepithelial neoplasia is a significant risk factor for prostatic adenocarcinoma. *J Urol*. 2009 Aug;182(2):485-90; discussion 90. PubMed PMID: 19524976. Epub 2009/06/16. eng.
248. Merrimen JL, Jones G, Srigley JR. Is high grade prostatic intraepithelial neoplasia still a risk factor for adenocarcinoma in the era of extended biopsy sampling? *Pathology*. 2010 Jun;42(4):325-9. PubMed PMID: 20438403. Epub 2010/05/05. eng.
249. Descazeaud A, Rubin MA, Allory Y, Burchardt M, Salomon L, Chopin D, et al. What information are urologists extracting from prostate needle biopsy reports and what do they need for clinical management of prostate cancer? *Eur Urol*. 2005 Dec;48(6):911-5. PubMed PMID: 16140457. Epub 2005/09/06. eng.
250. De Matteis M, Poggi C, De Martino A, Corti B, Barozzi L, Pavlica P. Repeat biopsy in patients with initial diagnosis of PIN. *La Radiologia medica*. 2005 Sep;110(3):190-8. PubMed PMID: 16200041. Epub 2005/10/04. eng
- ita.
251. Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, et al. High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HG PIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases. *In Vivo*. 1994 May-Jun;8(3):439-43. PubMed PMID: 7803731. Epub 1994/05/01. eng.
252. Bruserud O, Reikvam H, Fredly H, Skavland J, Hagen KM, van Hoang TT, et al. Expression of the potential therapeutic target CXXC5 in primary acute myeloid leukemia cells - high expression is associated with adverse prognosis as well as altered intracellular signaling and transcriptional regulation. *Oncotarget*. 2015 Feb 20;6(5):2794-811. PubMed PMID: 25605239. Pubmed Central PMCID: 4413618. Epub 2015/01/22. eng.
253. Garusi E, Rossi S, Perris R. Antithetic roles of proteoglycans in cancer. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2012 Feb;69(4):553-79. PubMed PMID: 21964924. Epub 2011/10/04. eng.
254. 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 oncology*. 2013;2013:680136. PubMed PMID: 23691363. Pubmed Central PMCID: 3654277. Epub 2013/05/22. eng.
255. Edwards IJ. Proteoglycans in prostate cancer. *Nature reviews Urology*. 2012 Apr;9(4):196-206. PubMed PMID: 22349653. Epub 2012/02/22. eng.
256. Ao Z, Yu S, Qian P, Gao W, Guo R, Dong X, et al. Tumor angiogenesis of SCLC inhibited by decreased expression of FMOD via downregulating angiogenic factors of endothelial cells. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*. 2017 Mar;87:539-47. PubMed PMID: 28081464. Epub 2017/01/13. eng.
257. 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*. 2017 Jan 05;36(1):71-83. PubMed PMID: 27212030. Epub 2016/05/24. eng.
258. Suhovskih AV, Kashuba VI, Klein G, Grigorieva EV. Prostate cancer cells specifically reorganize epithelial cell-fibroblast communication through proteoglycan and junction pathways. *Cell adhesion &*

- migration. 2017 Jan 02;11(1):39-53. PubMed PMID: 27111714. Pubmed Central PMCID: 5308224. Epub 2016/04/26. eng.
259. Brockstedt U, Dobra K, Nurminen M, Hjerpe A. Immunoreactivity to cell surface syndecans in cytoplasm and nucleus: tubulin-dependent rearrangements. *Experimental cell research*. 2002 Apr 01;274(2):235-45. PubMed PMID: 11900484. Epub 2002/03/20. eng.
260. Richardson TP, Trinkaus-Randall V, Nugent MA. Regulation of heparan sulfate proteoglycan nuclear localization by fibronectin. *Journal of cell science*. 2001 May;114(Pt 9):1613-23. PubMed PMID: 11309193. Epub 2001/04/20. eng.
261. Zong F, Fthenou E, Wolmer N, Hollosi P, Kovalszky I, Szilak L, et al. Syndecan-1 and FGF-2, but not FGF receptor-1, share a common transport route and co-localize with heparanase in the nuclei of mesenchymal tumor cells. *PLoS One*. 2009 Oct 05;4(10):e7346. PubMed PMID: 19802384. Pubmed Central PMCID: 2750749. Epub 2009/10/06. eng.
262. Dil N, Banerjee AG. A role for aberrantly expressed nuclear localized decorin in migration and invasion of dysplastic and malignant oral epithelial cells. *Head & neck oncology*. 2011 Sep 29;3:44. PubMed PMID: 21958730. Pubmed Central PMCID: 3198745. Epub 2011/10/01. eng.
263. Yanamandra K, Alexeyev O, Zamotin V, Srivastava V, Shchukarev A, Brorsson AC, et al. Amyloid formation by the pro-inflammatory S100A8/A9 proteins in the ageing prostate. *PLoS One*. 2009;4(5):e5562. PubMed PMID: 19440546. Pubmed Central PMCID: 2678268. Epub 2009/05/15. eng.
264. Siebolts U, Varnholt H, Drebber U, Dienes HP, Wickenhauser C, Odenthal M. Tissues from routine pathology archives are suitable for microRNA analyses by quantitative PCR. *J Clin Pathol*. 2009 Jan;62(1):84-8. PubMed PMID: 18755714. Pubmed Central PMCID: 2603282. Epub 2008/08/30. eng.
265. Dijkstra JR, Mekenkamp LJ, Teerenstra S, De Krijger I, Nagtegaal ID. MicroRNA expression in formalin-fixed paraffin embedded tissue using real time quantitative PCR: the strengths and pitfalls. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2012 Apr;16(4):683-90. PubMed PMID: 22003827. Pubmed Central PMCID: 3822839. Epub 2011/10/19. eng.
266. Ludyga N, Grunwald B, Azimzadeh O, Englert S, Hofler H, Tapio S, et al. Nucleic acids from long-term preserved FFPE tissues are suitable for downstream analyses. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2012 Feb;460(2):131-40. PubMed PMID: 22270699. Epub 2012/01/25. eng.
267. Scorsato APT, J. E. Q. Fatores que interferem na qualidade do DNA extraído de amostras biológicas armazenadas em blocos de parafina. *J Bras Patol Med Lab*. 2011;47(5):541-8.
268. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2008 May;10(3):203-11. PubMed PMID: 18403610. Pubmed Central PMCID: 2329784. Epub 2008/04/12. eng.
269. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA*. 2007 Oct;13(10):1668-74. PubMed PMID: 17698639. Pubmed Central PMCID: 1986820. Epub 2007/08/19. eng.
270. Jung M, Schaefer A, Steiner I, Kempkensteffen C, Stephan C, Erbersdobler A, et al. Robust microRNA stability in degraded RNA preparations from human tissue and cell samples. *Clinical chemistry*. 2010 Jun;56(6):998-1006. PubMed PMID: 20378769. Epub 2010/04/10. eng.
271. Szafranska AE, Davison TS, Shingara J, Doleshal M, Riggerbach JA, Morrison CD, et al. Accurate molecular characterization of formalin-fixed, paraffin-embedded tissues by microRNA expression profiling. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2008 Sep;10(5):415-23. PubMed PMID: 18687792. Pubmed Central PMCID: 2518736. Epub 2008/08/09. eng.
272. Schaefer A, Jung M, Miller K, Lein M, Kristiansen G, Erbersdobler A, et al. Suitable reference genes for relative quantification of miRNA expression in prostate cancer. *Experimental & molecular*

medicine. 2010 Nov 30;42(11):749-58. PubMed PMID: 20890088. Pubmed Central PMCID: 2992854. Epub 2010/10/05. eng.

273. Gee HE, Buffa FM, Camps C, Ramachandran A, Leek R, Taylor M, et al. The small-nucleolar RNAs commonly used for microRNA normalisation correlate with tumour pathology and prognosis. *British journal of cancer*. 2011 Mar 29;104(7):1168-77. PubMed PMID: 21407217. Pubmed Central PMCID: 3068486. Epub 2011/03/17. eng.

274. Chen L, Jin Y, Wang L, Sun F, Yang X, Shi M, et al. Identification of reference genes and miRNAs for qRT-PCR in human esophageal squamous cell carcinoma. *Med Oncol*. 2017 Jan;34(1):2. PubMed PMID: 27889881. Epub 2016/11/28. eng.

275. Gandellini P, Folini M, Zaffaroni N. Towards the definition of prostate cancer-related microRNAs: where are we now? *Trends in molecular medicine*. 2009 Sep;15(9):381-90. PubMed PMID: 19716766. Epub 2009/09/01. eng.

276. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA*. 2008 May;14(5):844-52. PubMed PMID: 18375788. Pubmed Central PMCID: 2327352. Epub 2008/04/01. eng.

277. Peskoe SB, Barber JR, Zheng Q, Meeker AK, De Marzo AM, Platz EA, et al. Differential long-term stability of microRNAs and RNU6B snRNA in 12-20 year old archived formalin-fixed paraffin-embedded specimens. *BMC cancer*. 2017 Jan 06;17(1):32. PubMed PMID: 28061773. Pubmed Central PMCID: 5219687. Epub 2017/01/08. eng.

278. Schaefer A, Stephan C, Busch J, Yousef GM, Jung K. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of microRNAs in urologic tumors. *Nature reviews Urology*. 2010 May;7(5):286-97. PubMed PMID: 20368743. Epub 2010/04/07. eng.

279. Jossen S, Sung SY, Lao K, Chung LW, Johnstone PA. Radiation modulation of microRNA in prostate cancer cell lines. *Prostate*. 2008 Nov 01;68(15):1599-606. PubMed PMID: 18668526. Pubmed Central PMCID: 3182144. Epub 2008/08/01. eng.

280. Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. *Nucleic acids research*. 2005;33(17):5394-403. PubMed PMID: 16192569. Pubmed Central PMCID: 1236977. Epub 2005/09/30. eng.

281. Guner G, Sirajuddin P, Zheng Q, Bai B, Brodie A, Liu H, et al. Novel Assay to Detect RNA Polymerase I Activity in vivo. *Molecular cancer research : MCR*. 2017 Jan 23. PubMed PMID: 28119429. Epub 2017/01/26. eng.

282. Yu SH, Zheng Q, Esopi D, Macgregor-Das A, Luo J, Antonarakis ES, et al. A Paracrine Role for IL6 in Prostate Cancer Patients: Lack of Production by Primary or Metastatic Tumor Cells. *Cancer immunology research*. 2015 Oct;3(10):1175-84. PubMed PMID: 26048576. Pubmed Central PMCID: 4596748. Epub 2015/06/07. eng.

283. Bingham V, Ong CW, James J, Maxwell P, Waugh D, Salto-Tellez M, et al. PTEN mRNA detection by chromogenic, RNA in situ technologies: a reliable alternative to PTEN immunohistochemistry. *Human pathology*. 2016 Jan;47(1):95-103. PubMed PMID: 26518664. Epub 2015/11/01. eng.

284. Bertoli G, Cava C, Castiglioni I. MicroRNAs as Biomarkers for Diagnosis, Prognosis and Theranostics in Prostate Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2016 Mar 22;17(3):421. PubMed PMID: 27011184. Pubmed Central PMCID: 4813272. Epub 2016/03/25. eng.

285. Coppola V, De Maria R, Bonci D. MicroRNAs and prostate cancer. *Endocrine-related cancer*. 2010 Mar;17(1):F1-17. PubMed PMID: 19779034. Epub 2009/09/26. eng.

286. Schaefer A, Jung M, Mollenkopf HJ, Wagner I, Stephan C, Jentzmik F, et al. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2010 Mar 01;126(5):1166-76. PubMed PMID: 19676045. Epub 2009/08/14. eng.

287. Ozen M, Creighton CJ, Ozdemir M, Ittmann M. Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene*. 2008 Mar 13;27(12):1788-93. PubMed PMID: 17891175. Epub 2007/09/25. eng.
288. Walter BA, Valera VA, Pinto PA, Merino MJ. Comprehensive microRNA Profiling of Prostate Cancer. *Journal of Cancer*. 2013;4(5):350-7. PubMed PMID: 23781281. Pubmed Central PMCID: 3677622. Epub 2013/06/20. eng.
289. Leite KR, Tomiyama A, Reis ST, Sousa-Canavez JM, Sanudo A, Camara-Lopes LH, et al. MicroRNA expression profiles in the progression of prostate cancer--from high-grade prostate intraepithelial neoplasia to metastasis. *Urol Oncol*. 2013 Aug;31(6):796-801. PubMed PMID: 21880514. Epub 2011/09/02. eng.
290. Lo UG, Yang D, Hsieh JT. The role of microRNAs in prostate cancer progression. *Translational andrology and urology*. 2013 Sep;2(3):228-41. PubMed PMID: 26813625. Pubmed Central PMCID: 4708182. Epub 2013/09/01. eng.
291. Sun Z, Han Q, Zhou N, Wang S, Lu S, Bai C, et al. MicroRNA-9 enhances migration and invasion through KLF17 in hepatocellular carcinoma. *Molecular oncology*. 2013 Oct;7(5):884-94. PubMed PMID: 23684102. Epub 2013/05/21. eng.
292. Wang J, Zhao H, Tang D, Wu J, Yao G, Zhang Q. Overexpressions of microRNA-9 and microRNA-200c in human breast cancers are associated with lymph node metastasis. *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*. 2013 May;28(4):283-8. PubMed PMID: 23617747. Pubmed Central PMCID: 3653379. Epub 2013/04/27. eng.
293. Yu T, Liu K, Wu Y, Fan J, Chen J, Li C, et al. MicroRNA-9 inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of CXCR4 via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncogene*. 2014 Oct 16;33(42):5017-27. PubMed PMID: 24141785. Epub 2013/10/22. eng.
294. Ostling P, Leivonen SK, Aakula A, Kohonen P, Makela R, Hagman Z, et al. Systematic analysis of microRNAs targeting the androgen receptor in prostate cancer cells. *Cancer Res*. 2011 Mar 01;71(5):1956-67. PubMed PMID: 21343391. Epub 2011/02/24. eng.
295. Liang H, Studach L, Hullinger RL, Xie J, Andrisani OM. Down-regulation of RE-1 silencing transcription factor (REST) in advanced prostate cancer by hypoxia-induced miR-106b~25. *Experimental cell research*. 2014 Jan 15;320(2):188-99. PubMed PMID: 24135225. Pubmed Central PMCID: 3947575. Epub 2013/10/19. eng.
296. Seashols-Williams SJ, Budd W, Clark GC, Wu Q, Daniel R, Dragoescu E, et al. miR-9 Acts as an OncomiR in Prostate Cancer through Multiple Pathways That Drive Tumour Progression and Metastasis. *PLoS One*. 2016;11(7):e0159601. PubMed PMID: 27447934. Pubmed Central PMCID: 4957825. Epub 2016/07/23. eng.
297. Tili E, Croce CM, Michaille JJ. miR-155: on the crosstalk between inflammation and cancer. *International reviews of immunology*. 2009;28(5):264-84. PubMed PMID: 19811312. Epub 2009/10/09. eng.
298. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene*. 2013 Dec 10;532(1):1-12. PubMed PMID: 23246696. Epub 2012/12/19. eng.
299. Faraoni I, Antonetti FR, Cardone J, Bonmassar E. miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Jun;1792(6):497-505. PubMed PMID: 19268705. Epub 2009/03/10. eng.
300. Mattiske S, Suetani RJ, Neilsen PM, Callen DF. The oncogenic role of miR-155 in breast cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*. 2012 Aug;21(8):1236-43. PubMed PMID: 22736789. Epub 2012/06/28. eng.

301. Hou Y, Wang J, Wang X, Shi S, Wang W, Chen Z. Appraising MicroRNA-155 as a Noninvasive Diagnostic Biomarker for Cancer Detection: A Meta-Analysis. *Medicine*. 2016 Jan;95(2):e2450. PubMed PMID: 26765436. Pubmed Central PMCID: 4718262. Epub 2016/01/15. eng.
302. Li CL, Nie H, Wang M, Su LP, Li JF, Yu YY, et al. microRNA-155 is downregulated in gastric cancer cells and involved in cell metastasis. *Oncology reports*. 2012 Jun;27(6):1960-6. PubMed PMID: 22426647. Epub 2012/03/20. eng.
303. Huang C, Li H, Wu W, Jiang T, Qiu Z. Regulation of miR-155 affects pancreatic cancer cell invasiveness and migration by modulating the STAT3 signaling pathway through SOCS1. *Oncology reports*. 2013 Sep;30(3):1223-30. PubMed PMID: 23817566. Epub 2013/07/03. eng.
304. Sempere LF, Preis M, Yezefski T, Ouyang H, Suriawinata AA, Silahtaroglu A, et al. Fluorescence-based codetection with protein markers reveals distinct cellular compartments for altered MicroRNA expression in solid tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010 Aug 15;16(16):4246-55. PubMed PMID: 20682703. Pubmed Central PMCID: 3229296. Epub 2010/08/05. eng.
305. Basu S, Majumder S, Bhowal A, Ghosh A, Naskar S, Nandy S, et al. A study of molecular signals deregulating mismatch repair genes in prostate cancer compared to benign prostatic hyperplasia. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125560. PubMed PMID: 25938433. Pubmed Central PMCID: 4418837. Epub 2015/05/06. eng.
306. Cha YJ, Lee JH, Han HH, Kim BG, Kang S, Choi YD, et al. MicroRNA alteration and putative target genes in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer: STAT3 and ZEB1 are upregulated during prostate carcinogenesis. *Prostate*. 2016 Jul;76(10):937-47. PubMed PMID: 27017949. Epub 2016/03/29. eng.

12. ANEXOS

ANEXO 1

Benedetti Ines, Bettin Alfonso, Reyes Niradiz, “Inflammation and focal atrophy in prostate needle biopsy cores and association to prostatic adenocarcinoma”, *Annals of Diagnostic Pathology* 24 (2016) 55–61

ANEXO 2

Reyes Niradiz, Benedetti Ines, Bettin Alfonso, Rebollo Juan, Geliebter Jan, “The small leucine rich proteoglycan fibromodulin is overexpressed in human prostate epithelial cancer cell lines in culture and human prostate cancer tissue”, *Cancer Biomarkers* 16 (2016) 191–202

ANEXO 3

Benedetti Ines¹, De Marzo Angelo, Geliebter Jan, Reyes Niradiz, “CXXC5 expression in prostate cancer: implications for cancer progression” artículo *In press*, aceptado para publicación en *International Journal of Experimental Pathology*, julio 2017.