



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD.**

FACULTAD DE MEDICINA

CAMPO DE ESTUDIO: EPIDEMIOLOGÍA

**USO DE MARCADORES EPIGENÉTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL
CÁNCER DE PRÓSTATA POR MÉTODOS NO INVASIVOS.**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA SALUD**

PRESENTA :

BEATRIZ EUGENIA SÁNCHEZ HERNÁNDEZ

TUTOR:

**DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ
FACULTAD DE MEDICINA
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION SALVADOR
ZUBIRÁN**

MEXICO D.F.

FEBRERO DE 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) como parte del fondo SSA/IMSS/ISSSTE-CONACYT.

Proyecto:

Uso de marcadores genéticos para la detección temprana, pronóstico y seguimiento pacientes con cáncer de próstata por métodos no invasivos.

Clave:

S0008-2006-1-44127

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Osvaldo Mutchinick B. por confiar en mi, por su infinita paciencia, por el tiempo dedicado a mi formación académica, por su apoyo para desarrollar este y otros proyectos de investigación, pero sobre todo porque durante estos años de convivencia he tenido valiosas enseñanzas para la vida.

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” donde fue realizado este estudio.

A las Doctoras Yevgeniya Svyryd y Nancy Monroy Jaramillo por su asoramiento en la estandarización de las técnicas de biología molecular aplicadas en este estudio.

Al la Dra. Florencia Vargas[†], al Dr Adolfo Aguayo Gómez y a la TS. Leonora Luna Muñoz por su asesoramiento para el manejo de bases de datos y el análisis estadístico.

Al Dr. Braulio Martínez quien realizó el análisis anatomopatológico de las muestras incluidas en este estudio.

A las Dras. Fabiola Rodríguez, Melanie Marmolejo Chavira y Blanca Ibarra así como al Dr. Adolfo Aguayo Gómez, quienes participaron en el reclutamiento y colecta de muestras de pacientes.

Al Biólogo Luis Muñoz Tellez por su apoyo para la organización y conformación de un banco de ADN de pacientes con cáncer de próstata e hiperplasia benigna de próstata.

Al QFB. Cristy Alfonso López por sus consejos profesionales.

Al Dr. Miguel Angel Jiménez Ríos, Jefe del Departamento de Urología del Instituto Nacional de Cancerología por su apoyo para el reclutamiento y colecta de muestras de pacientes de su Institución.

A las Sras. Pilar Chávez y Miriam Reyes encargadas de todos los trámites administrativos para la adquisición de materiales y reactivos necesarios para el desarrollo de este proyecto.

Al mis profesores y personal del Posgrado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la Facultad de Medicina.

DEDICATORIA

Por supuesto a ti mi Diego, porque ser tu mamá ha sido el mejor y más grande sueño cumplido, porque eres mi mayor alegría y mi razón de vivir.

A mi familia con inmenso cariño por todo su apoyo.

A todos mis amigos y compañeros del Departamento de Genética del INCMNSZ.

INDICE

	PÁGINA
INDICE DE TABLAS Y FIGURAS	3
ABREVIATURAS	4
I. INTRODUCCIÓN	5
II. ANTECEDENTES	
II.1 Anatomía y fisiología normal de la próstata	7
II.2 Enfermedades de la próstata	
II.2.1 Hiperplasia benigna de la próstata	9
II.2.2 Cáncer de próstata	10
II.2.2.1 Morfología del tumor	10
II.2.2.2 Clasificación histopatológica	11
II.3 Epidemiología del cáncer de próstata	
II.3.1 Estadísticas	14
II.3.2 Factores de riesgo ambiental	14
II.3.2.1 Alimentación	14
II.3.2.2 Tabaquismo	15
II.3.2.3 Patógenos	16
II.3.2.4 Herbicidas y pesticidas	17
II.3.3 Factores de riesgo genético	
II.3.3.1 Historia familiar	19
II.3.3.2 Raza	20
II.4 Alteraciones moleculares relacionadas al cáncer de próstata	
II.4.1 Alteraciones genéticas	20
II.4.2 Alteraciones epigenéticas	21
II.4.2.1 Hipermetilación del promotor de <i>GSTP1</i>	27
II.4.2.2 Hipermetilación del promotor de <i>RASSF1A</i>	28
II.5 Diagnóstico del cáncer de próstata	
II.5.1 Diagnóstico clínico:	29
II.5.1.1. Tacto rectal	29
II.5.1.2 Biopsia	30
II.5.1.3 Ultrasonografía	30
II.5.2. Biomarcadores protéicos	
II.5.2.1 Fosfatasa ácida	30
II.5.2.2 Antígeno prostático específico (APE)	31
II.5.3. Biomarcadores moleculares	
II.5.3.1 Marcador PCA3	32
III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
IV. HIPOTESIS	35

V. JUSTIFICACIÓN	35
VI. OBJETIVOS	38
VII. MATERIAL Y METODOS	38
VII.1 Diseño del estudio	38
VII.1.1 Descripción del estudio	39
VII.2 Población de estudio	39
VII.3 Criterios de selección	40
VII.4 Tamaño de la muestra	40
VII.5- Métodos de laboratorio	
VII.5.1. Toma de muestras	40
VII.5.2 Determinación de APE en suero	41
VII.5.3. Extracción de ADN de sangre, tejido prostático, sedimento urinario y plasma.	41
VII.5.4. Conversión del ADN con bisulfito de sodio	41
VII.5.5. PCR cuantitativo metilación-específica	42
VII.6 Análisis estadístico	43
VIII. RESULTADOS	
VIII.1 Características del grupo de estudio.	46
VIII.2 Niveles de Antígeno prostático específico (APE)	47
VIII.3 Porcentaje de metilación de los promotores de <i>GSTP1</i> y <i>RASSF1A</i>	47
VIII.4 Comparación de los porcentajes de metilación en muestras de pacientes con CaP e HBP.	53
VIII.5 Validez diagnóstica del APE y del porcentaje de metilación de los promotores <i>GSTP1</i> y <i>RASSF1A</i> para el diagnóstico de cáncer de próstata.	55
IX. DISCUSION	60
X. CONCLUSIONES	65
XI. ANEXOS	
ANEXO I. Sistema TNM de clasificación de Cáncer de Próstata y calificación histo-pronóstica de Gleason	67
ANEXO 2. Hoja de Informe al paciente	69
ANEXO 3. Carta de Consentimiento Informado	70
XII. BIBLIOGRAFIA	71

ÍNDICE DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1. Sensibilidad y especificidad del estudio de la HMP de <i>GSTP1</i> y <i>RASSF1A</i> para la detección del cáncer de próstata	28
Tabla 2. Concentración de APE (ng/ml) y Riesgo para CaP	32
Tabla 3. Secuencia de primers para reacciones de PCR-Metilación específica.	42
Tabla 4. Cálculo de Sensibilidad, Especificidad y Valores Predictivos	44
Tabla 5. Niveles de antígeno prostático específico en los grupos estudiados.	47
Tabla 6. Resultados de la cuantificación absoluta de <i>ACTB</i> convertido.	51
Tabla 7. Resultados de la cuantificación absoluta de <i>GSTP1</i> metilado.	52
Tabla 8. Distribución del % de metilación de promotores en muestras de ADN de pacientes con CaP y pacientes con HBP.	55
Tabla 9. Exactitud diagnóstica de APE y el %MP en <i>GSTP1</i> y <i>RASSF1A</i>	57
Tabla 10. Valores de sensibilidad y especificidad mostradas por los marcadores estudiados en diferentes tipos de muestras biológicas.	58
Tabla 11. Validez diagnóstica conjunta del grado de metilación de los promotores de <i>GSTP1</i> , <i>RASSF1A</i> Y DEL APE	59

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1. Zonas de la próstata	8
Figura 2. Diagrama esquemático de la graduación de Gleason	13
Figura 3. Estructura de la cromatina activa e inactiva del promotor	25
Figura 4. Metilación del ADN en promotores en la carcinogénesis	26
Figura 5. Cuantificación absoluta de ADN convertido con bisulfito de sodio	49
Figura 6. Cuantificación absoluta de <i>GSTP1</i> metilado	50
Figura 7. Distribución del % de metilación de promotores en muestras de ADN de pacientes con CaP y pacientes con HBP.	54
Figura 8. Curvas ROC (Receiver Operator Curve)	56

ABREVIATURAS:

APE: Antígeno Prostático Específico

AR: Receptor de Andrógenos

AUC: Area Under Curve

BAD: Biopsia con Aguja Delgada

CaP: Cáncer de Próstata

EG: Expresión Génica

GSTP1: Glutathionina S-transferasa 1

HBP: Hiperplasia Benigna de la Próstata

HMGG: Hipermetilación Global del Genoma

HMP: Hipermetilación de promotores

INCAN: Instituto Nacional de Cancerología, México, DF.

INCMNSZ: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México, DF.

PCA3: Antígeno Prostático 3

RASSF1A: Proteína 1 de unión a Rass

ROC: Receiver Operating Characteristic

TNM: Tumor, Nódulo, Metástasis

TR: Tacto Rectal

VN: Verdadero Negativo

VPN: Valor Predictivo Negativo

VP: Verdadero Positivo

VPP: Valor Predictivo Positivo

%MP: Porcentaje de Metilación del Promotor

I. INTRODUCCIÓN

De todos los tipos de cáncer que afectan a la población masculina, el de próstata (CaP) ocupa el segundo lugar en frecuencia a nivel mundial (WHO 2012). En las primeras etapas de la enfermedad, el cáncer se limita a la próstata y puede erradicarse evitando la propagación y consecuente muerte del paciente, por ello la importancia de las acciones de detección temprana para prevenir la progresión de la enfermedad, determinar un riesgo aumentado y detectar los primeros signos de cambio de una lesión pre-maligna a su transformación cancerosa (Andriole 2009).

En México, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte y el de próstata es la segunda neoplasia más frecuente en el varón en edad post-productiva (mayores de 65) con una prevalencia de 71.7 por 100,000 habitantes (Sanchez-Barriga 2013). Durante la década de 1990 a 1999, la tasa de mortalidad por esta enfermedad ascendió de 2.79 a 3.75 por 100,000 habitantes y aunque no se cuentan con datos precisos, el Sector Salud considera que esta tasa continúa en aumento (INEGI 2008). De 1995 a 1999, el número de defunciones por CaP fue de 17,099, de las cuales el 87.3% correspondió al grupo de 65 y más años, el 12.66% al grupo de 15 a 64 años y el restante, 0.4% a menores de 15 años. De acuerdo con los datos de la Ssa un programa eficaz de diagnóstico temprano en las instituciones públicas del país, evitaría casi 3,800 muertes por esta enfermedad en un periodo de 6 años (Ssa,1999).

Actualmente el diagnóstico se establece por estudios clínicos, de gabinete e histopatológico de biopsias con aguja delgada (BAD). Se estima que el diagnóstico por BAD no es concluyente del 1 al 24% de las biopsias lo que

requiere de repetir la BAD pudiendo ocasionar complicaciones diversas (Troyer et al. 2004). Un método de presunción diagnóstica no invasivo ampliamente usado en la práctica clínica es la cuantificación de los niveles plasmáticos del antígeno prostático específico (APE) cuya sensibilidad es del 70% al 80% y su especificidad baja, solo del 30%. Niveles de APE mayores a 4ng/ml puede asociarse a procesos inflamatorios, hiperplásicos ó neoplásicos y sugiere la realización de otros exámenes para determinar si el cáncer está presente (Sun et al. 2007).

Hasta la fecha no se cuenta con marcadores diagnósticos y pronósticos precisos para CaP, si bien la determinación de niveles séricos de APE es ampliamente usada en la práctica clínica, su baja sensibilidad y aun más baja especificidad hacen de este un método diagnóstico poco preciso ya que del 20 al 30% de los individuos con CaP pueden tener niveles normales de APE (Agnihotri et al. 2014). Es importante tener presente que la determinación de niveles de antígeno, tiene que ser considerada en el contexto de otros métodos de diagnóstico como el tacto rectal o la BAD. Por otra parte, los niveles de APE no tienen una utilidad pronóstica es decir no se ha encontrado alguna correlación constante entre los niveles de APE y las características clínicas y anatomopatológicas del CaP (Hoffman et al. 2002; McKenzie et al. 2011; Wang et al. 1979)

II. ANTECEDENTES

II.1 Anatomía y fisiología normal de la próstata

La próstata es un órgano pequeño del tamaño de una nuez, es un órgano glandular y fibromuscular situado inmediatamente por debajo de la vejiga que rodea la uretra formando parte del sistema reproductor masculino. La glándula prostática normal pesa alrededor de 20 gramos y contiene a la uretra posterior que mide entre 2.5 y 3.0 cm de longitud. Según su morfología y función (McNeal 1972) se distinguen las siguientes zonas (**Fig 1**):

- a) Zona central: en ella se desarrolla el 5% de el cáncer de próstata
- b) Zona muscular anterior: en ella solo existe músculo y no desarrolla enfermedad alguna.
- c) Zona de esfínter interno: compone el mecanismo que cierra la uretra al momento de la eyaculación.
- d) Zona periférica: es la zona más grande de la próstata en un hombre joven, en ella se desarrolla el 90% de los cánceres de próstata.
- e) Zona transicional: es la zona que forma el crecimiento benigno de la próstata o hiperplasia benigna de a próstata, solo desarrolla cáncer en un 5% de los casos.

La estructura tubular que pasa por en medio de arriba hacia abajo, es la uretra, conducto por donde sale la orina. La próstata tiene una delgada cápsula fibrosa debajo de la cual hay fibras musculares lisas circulares y tejido conjuntivo que rodea a la uretra. En lo profundo de esta capa yace el estroma prostático

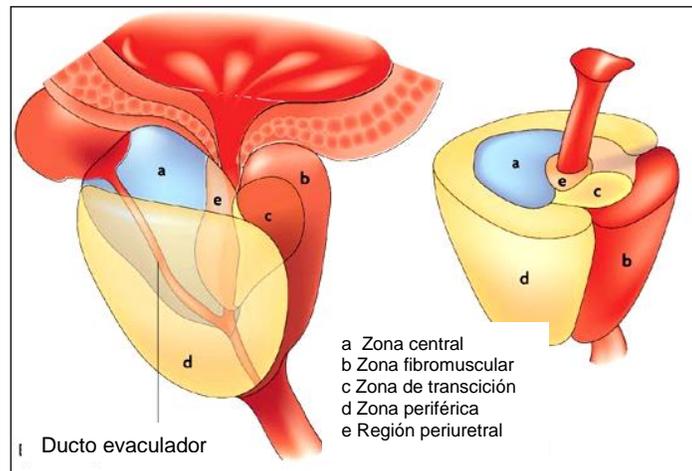


Fig 1: Zonas de la próstata (De Marzo et al. 2007)

constituido por los tejidos conjuntivo y elástico así como por fibras musculares lisas. En el están incluidas las glándulas epiteliales que se abren a conductos excretores de mayor tamaño que desembocan en el piso de la uretra principalmente en el *vero montanum* y el cuello vesical (Smith, Tanagho, and McAninch 1995). En el epitelio prostático se pueden distinguir tres tipos celulares según sus características morfológicas, su función y su relevancia para la carcinogénesis: a) el epitelial luminal que es andrógeno dependiente, produce proteínas secretoras como el APE y expresa al receptor de andrógenos (AR); b) el de células basales, las que forman una capa continua y no producen proteínas secretoras y c) el tipo neuroendócrino, independiente de andrógenos. Su acumulación en la capa basal es una característica del CaP (Catalona et al. 1989).

La próstata secreta varias proteínas como: fosfatasa ácida, seminina, activador de plasminógeno y APE. El APE es una proteasa de serina cuya función fisiológica es disolver el semen coagulado. Un aumento en la sangre acompaña frecuentemente a un crecimiento anormal de la glándula, por lo cual el

APE es el marcador más usado por la mayoría de los urólogos para la detección del CaP. Existe en el suero en una forma libre, APE libre o unido a inhibidores de proteasas, principalmente α -1 antitripsina (Wang et al. 1979).

II.2 Enfermedades de la próstata

II.2.1 Hiperplasia benigna de la próstata

La hiperplasia benigna de la próstata (HBP) y el adenocarcinoma prostático son dos de los principales neoplasmas que afectan a la próstata. Estas dos entidades constituyen la mayor proporción de las patologías que afectan al sistema urinario. La HBP es una enfermedad relacionada con la edad que se manifiesta como una forma inocua de agrandamiento no neoplásico de la próstata (100-200% de su tamaño normal). Está presente en el 20% de los hombres de 40 o más años de edad y la frecuencia de aparición de esta hiperplasia aumenta al 70% a los 60 años (Smith, Tanagho, and McAninch 1995). La HBP se produce principalmente en la zona de transición. Aunque el origen exacto de esta enfermedad es desconocido, se proponen dos factores importantes que la condicionan: a) la presencia de dihidrotestosterona (DHT) y b) el envejecimiento. La aplicación de DHT en pacientes con deficiencia de la misma ocasiona el crecimiento de la glándula (Powers and Marker 2013).

En cuanto al envejecimiento, probablemente la HBP se origina por cambios en los niveles séricos de testosterona que se abaten por una disminución del estímulo sobre las células de Leydig y por el aumento en la conversión de testosterona en andrógenos en los tejidos periféricos. La función de los andrógenos y estrógenos en la inducción de la HBP es compleja y todavía

no se entiende bien en su totalidad. Histológicamente, la HBP puede apreciarse con la aparición de nódulos microscópicos en el tejido periuretral en la zona de transición de la glándula prostática a edades tan tempranas como a los 20 años. Durante el envejecimiento y en presencia de andrógenos, el tejido hiperplásico avanza a un estadio macroscópico que se manifiesta por una glándula agrandada a la palpación y puede causar obstrucción urinaria (Abate-Shen and Shen 2000).

Se han descrito muchas lesiones pre-malignas en el CaP. La neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (PIN) y la atrofia inflamatoria proliferativa (AIP) que son potencialmente precursoras del cáncer de próstata (De Marzo et al. 1999) .

II.2.2 Cáncer de próstata

II.2.2.1 Morfología del tumor:

El CaP sólo presenta síntomas cuando su tamaño incrementa y tiene algún grado de invasión. El 68% de los cánceres se desarrollan en la zona periférica, un 8% en la zona central y un 24% en la zona transicional (Ramon and Denis 2007) La zona periférica es accesible al tacto rectal mientras que los tumores que se desarrollan en las zonas central y transicional se valoran mejor con la ecografía (Abate-Shen and Shen 2000).

El CaP tiene distintas etapas de progresión:

1. Enfermedad localizada, en la cual el CaP está confinado dentro de la cápsula de la próstata y no se ha dispersado hacia otras partes del cuerpo. El CaP primario es dependiente de andrógenos para crecer y sobrevivir. Entre las fases

1 y 2 surge la enfermedad recurrente donde después de la terapia localizada, se observa un aumento del APE, indicativo que el cáncer ha reincidento.

2. Enfermedad metastásica, en la cual el CaP está creciendo en las áreas que rodean la próstata.

3. Enfermedad refractaria a hormonas, en la cual el CaP continúa creciendo a pesar del tratamiento con fármacos que inhiben la producción de hormonas masculinas en el suero en combinación con antagonistas competitivos del receptor de andrógenos. La cirugía radical del CaP localizado en estadio avanzado es raramente curativa. La radiación también resulta inefectiva y es solo paliativa y la quimioterapia no representa un pronóstico de supervivencia prolongada en la mayoría de los protocolos utilizados. En este estadio la supervivencia es de 12 a 18 meses (National Cancer Institute (U.S.) 2004) (Kawachi et al. 2007)

II.2.2.2 Clasificación histopatológica:

El CaP es el crecimiento anormal y desordenado de las células del epitelio glandular que tienen capacidad de diseminarse. La clasificación se establece de la siguiente manera: Tumor, Nódulo, Metástasis (TNM), en donde la evaluación inicial consiste en determinar el estadio local del tumor, ya sea, enfermedad intracapsular (T1-T2) y extracapsular (T3- T4); tiene un impacto importante en la toma de decisiones para el tratamiento. Más del 95% de todos los cánceres prostáticos son adenocarcinomas. A continuación se detalla la clasificación clínica según el grado de invasión local y metástasis en el TNM del cáncer de próstata:

_ **TNM I o A:** es un cáncer descubierto incidentalmente, paciente con adenoma que se opera y en el informe del patólogo aparece el cáncer de próstata. Si son positivas para cáncer menos del 5% de las muestras de la biopsia tiene una determinada conducta, si es mayor al 5% el tratamiento es diferente.

_ **TNM II o B:** se detecta al tacto, mediante la palpación de un adenoma que además presenta pequeños nódulos duros en su interior. B 1 ó 2 depende del tamaño y de si está en los dos lóbulos de la próstata o no.

_ **TNM III o C:** es una próstata que al tacto está dura y fija por que el cáncer se extiende más allá de la cápsula.

_ **TNM IV:** es el cáncer que al hacer el diagnóstico ya tiene metástasis a distancia.

L. A. Gleason en 1992 creó un sistema para estimar la gravedad de los CaP basado en la arquitectura del tumor llamado Grado de Gleason y es una clasificación basada en la diferenciación celular y la relación estroma-glándula del cáncer más no de anaplasia. Este sistema clasifica microscópicamente a las células desde bien diferenciadas (grado 1) hasta muy indiferenciadas (grado 5). Mediante observación microscópica del tejido se determinan los dos patrones estructurales (primario y secundario) de mayor área, sumando un mínimo de 2 puntos y un máximo de 10 puntos. Los grados 1 y 2 son normales. El grado 3 (células moderadamente diferenciadas) es el más común y considerado aún normal. El grado 4 corresponde a cáncer y es el más importante y a veces difícil de diferenciar del grado 3. El grado 5 es indiferenciado y las células parecen propagarse muy desordenadamente. Para su evaluación clara, se debe reportar

como la suma de los dos patrones, por ejemplo 7 (3+ 4). Así, un Gleason 10 será, en términos simples, el más grave de todos, y un Gleason 2 totalmente normal (Gleason 1992). En la práctica clínica el grado Gleason define el pronóstico y el TNM decide el tratamiento. También una citometría de flujo puede orientar el pronóstico, los cánceres diploides suelen ser benignos y los aneuploides y tetraploides suelen considerarse como malignos (National Cancer Institute (U.S.) 2004; Glare and Christakis 2008)

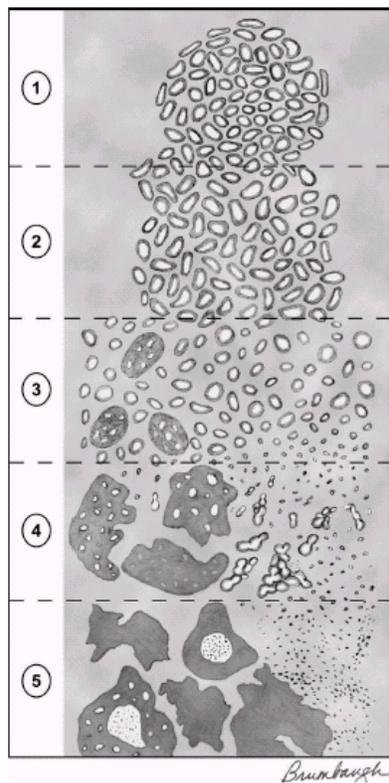


Fig 2. Diagrama esquemático de la graduación de Gleason. El sistema de Gleason se modificó de manera que se definieron los siguientes patrones o grados Grado 1: nódulos circunscritos, uniformes, redondeados u ovales, de medida regular (glándulas más grandes que el grado 3). Grado 2: es semejante al patrón 1, con nódulos más circunscritos, sin embargo en el borde del nódulo puede haber mínima infiltración. Las glándulas están más dispersas y no como un patrón de Gleason 1 con morfología uniforme. Grado 3: se observan unidades glandulares discretas, con glándulas más pequeñas que las del Gleason 1 y 2. Hay marcada variación en la medida y la forma. Presenta patrón nodular cribiforme Grado 4: masas irregulares y epitelio fusionado, con células claras. Presenta glándulas cribiformes grandes y con borde irregular. Grado 5: esencialmente no hay diferenciación glandular, compuesta de capas sólidas, cordones, o células simples. Carcinoma anaplásico con necrosis central rodeado por masas de papilas, cribiformes o sólidas (Epstein y col., 2007).

II.3 Epidemiología del cáncer de próstata

II.3.1 Estadísticas

En México, el CaP ocupa el segundo lugar como causa de muerte por tumores malignos en hombres mayores de 65 años con más de 4,500 defunciones por año, una prevalencia de 170.4 por 100,000 habitantes mayores de 65 años y una incidencia de 6,536 casos nuevos anuales (Ssa., 1999). De acuerdo con datos del INEGI en 2009 el 4.5% de las defunciones por CaP se concentran en hombres de 50 a 59 años y el 94.5% de las mismas en hombres de 60 años y más (INEGI., 2010). De acuerdo con el Registro Histopatológico de Neoplasias en México, el sector público reportó más del 70% de los casos y el sector privado, el 22.6%. Las entidades con mayor número de casos reportados fueron el Distrito Federal, Jalisco y Veracruz (SSa., 1999)

II.3.2 Factores de riesgo ambiental

II.3.2.1 Alimentación:

El CaP es un tipo de neoplasia maligna en la cual se ha demostrado que la dieta y la prevención farmacológica pueden ser efectivas debido a que es un cáncer de alta prevalencia, extensa latencia, dependencia endócrina, disponibilidad de marcadores en suero y la posible detección de lesiones precursoras en biopsia. Se ha demostrado que la ingesta de jitomate al igual que la de vitamina E, selenio, e isoflavonoides se correlaciona con disminución del riesgo para CaP (Kristal et al. 2010)

II.3.2.2 Tabaquismo:

Se ha documentado ampliamente que la exposición al humo del tabaco es un factor de riesgo para numerosos cánceres humanos sin embargo hasta el momento no hay una descripción contundente de su relación con el CaP (Huncharek et al. 2010). Los estudios de casos y controles no han encontrado una relación entre el tabaquismo y la enfermedad, sin embargo, algunos estudios en distintas cohortes han documentado un riesgo 2-3 veces mayor en fumadores de más de un paquete al día comparado con los no fumadores. Estos estudios no han demostrado una relación dosis-respuesta convincente, ni han valorado la influencia de otros los posibles factores confusores de riesgo (Troy et al. 2010; Kenfield et al. 2011). Respecto a mortalidad, la asociación ha sido documentada de forma más consistente. En diversos estudios de cohortes se ha establecido una relación directa entre tabaquismo y mayor frecuencia de muerte por cáncer de próstata. Los enfermos fumadores duplican el riesgo de morir por esta enfermedad con respecto a los no fumadores (Barry et al. 2012).

La mayoría de los autores no encuentran una correlación con el número de cigarrillos diarios ni con los años de fumador. No obstante, un trabajo documentó una relación convincente dosis-respuesta entre el número de paquetes por año de fumador en los últimos 10 años previos al diagnóstico aunque en diversos trabajos se reporta que los ex-fumadores no parecen tener un mayor riesgo de morir por cáncer de próstata, este estudio documentó efectos un aumento de la mortalidad, incluso hasta después de una década posterior a dejar de fumar (Giovannucci et al. 1999).

En un meta-análisis analizando 24 estudios epidemiológicos de cohortes que englobaban a 21.579 enfermos, se observó que cuando se estratificaban por cantidad de cigarrillos fumados, los fumadores presentaban un riesgo entre el 11 y el 22% mayor con respecto a los nunca fumadores, y de un 9% los ex-fumadores, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. En relación a mortalidad, los fumadores activos también presentaban diferencias estadísticamente significativas, con un riesgo mayor del 14% con respecto a los que nunca fumaron, el cual se incrementaba al 24 y al 30% en los más adictos. Los autores comentan que los estudios anteriormente realizados, probablemente por su menor casuística, subvaloraban la verdadera influencia del tabaquismo en la incidencia y mortalidad por CaP. También recomiendan la necesidad de diseñar estudios dirigidos a señalar variables determinantes de pronóstico (estadio y grado tumoral) e historial clínico de tabaquismo, tanto en fumadores como en ex-fumadores (Huncharek et al. 2010).

II.3.2.3 Patógenos:

Numerosos datos epidemiológicos, genéticos, histológicos y de biología molecular, evidencian la influencia de la infección prostática y de la consiguiente inflamación crónica en la patogenia y progresión del CaP. Potencialmente, los agentes infecciosos pueden influir en la carcinogénesis a través de los siguientes mecanismos: *a)* incorporación de oncogenes víricos en el genoma del portador; *b)* inhibición de los genes supresores de tumor; *c)* estimulación de señales proliferativas y *d)* mediante la supresión del sistema de vigilancia inmunológica. Aunque la prostatitis crónica generada por las enfermedades de transmisión

sexual se asocia con mayor riesgo de CaP y con peor resultado al tratamiento, hasta la fecha ningún agente infeccioso específico se ha relacionado convincentemente como agente causal de la enfermedad (Wagenlehner et al. 2007). El virus del papiloma humano (VPH) ha recibido mayor atención por su relación con los cánceres genitourinarios, pero su contribución real al cáncer de próstata es controversial. Mientras que algunos autores no han encontrado ninguna asociación otros han implicado al serotipo 16, que corresponde a la variedad más ligada a cáncer cérvico-uterino (Adami et al. 2003; Groom et al. 2012)

II.3.2.4 Herbicidas y pesticidas:

En el primer caso son compuestos químicos activos empleados contra las plagas de origen vegetal y en el segundo de origen animal. El agente naranja es una mezcla de dos herbicidas que se utilizó como defoliante en la guerra del Vietnam, entre 1962 y 1971. En 1998 la Academia Nacional de Ciencias de EUA reconoció una asociación positiva entre la exposición al herbicida y numerosos cánceres humanos, pero su relación con el CaP fue considerada limitada y no concluyente (Blair et al 1993; Frumkim et al 2003). Estudios más recientes sugieren una asociación más consistente. En un estudio de casos y controles comparando 6,214 veteranos de la guerra del Vietnam expuestos al herbicida con respecto a 6,930 veteranos no expuestos, los autores encontraron una frecuencia del doble de CaP entre los expuestos con edades más tempranas al diagnóstico, así como mayor riesgo de presentar *score* de Gleason entre 8-10 (21.8% y 10,5% respectivamente) y mayor probabilidad de enfermedad

metastásica entre los expuestos (13.4% y 4% respectivamente) (Frumkin 2003). Además, este grupo de investigadores no encontró diferencias entre ambos grupos con respecto a edad, tabaquismo, índice de masa corporal, exposición a finasteride y niveles de APE. En un modelo de regresión logística multivariado el agente naranja fue el factor más predictivo, no solo de desarrollar cáncer de próstata, sino de grado histológico más grave y de mayor probabilidad de enfermedad metastática al diagnóstico.

Respecto a la exposición a pesticidas, las dificultades para interpretar los riesgos asociados al CaP radican en la existencia de centenares de principios activos diferentes de estos compuestos, así como en el tipo de exposición aguda o crónica. Desde finales de los años 60 estudios ecológicos basados en las defunciones, mostraban tasas de mortalidad para algunos cánceres, entre ellos el prostático, significativamente más elevadas en zonas rurales norteamericanas pero más bajas que en las zonas urbanas (Blair et al. 1992).

En la década de los años 90 tres meta-análisis demostraron mayor riesgo, 7, 8 y 12% respectivamente, tanto de incidencia como de mortalidad de CaP en zonas rurales de EUA con fuerte actividad agrícola comparados con la población general de otras zonas (Hayen et al. 2008). Sin embargo, la residencia en áreas rurales no es sinónimo del uso de pesticidas. Además deben considerarse numerosos factores de riesgo vinculados al estilo de vida, exposiciones a otros químicos y a contaminantes biológicos.

En la última década varios meta-análisis han analizado el uso de pesticidas en el ámbito profesional. Este estudio mostró un riesgo estadísticamente significativo, que en los aplicadores de pesticidas tanto

agrícolas como no agrícolas, exceptuando a los trabajadores en fábricas de producción 13% mayor de CaP (RR = 1,13; IC 95% 1,04-1,22 (Van Maele-Fabry et al. 2006)

II.3.3 Factores de riesgo genético

II.3.3.1 Historia familiar

El CaP familiar es definido cuando dos o más familiares afectados han desarrollado la enfermedad a edad temprana (antes de los 55 años) presentándose con un frecuencia del 9%. Los pacientes CaP hereditario lo presentan entre seis a siete años antes que aquellos con cáncer esporádico. (Heidenreich et al., 2007; NCCN 2007). Diversos estudios han demostrado que un hombre con una historia positiva de CaP tienen un riesgo incrementado para un diagnóstico positivo y para un pronóstico desfavorable. Se estima que un hombre con un padre diagnosticado con CaP tiene un incremento de 2 veces el riesgo de desarrollar esta neoplásica comparado con hombres sin el antecedente paterno de esta enfermedad y si además del padre hay un hermano afectado, el riesgo incrementa de 3 hasta 9 veces (Hemminki and Czene 2002) . Una historia familiar de CaP se asocia también con un cancer letal. El riesgo de morir por CaP es aproximadamente dos veces mayor en un hombre que tiene un padre o un hermano enfermo comparado con aquellos hombres con CaP sin historia familiar positiva. (Brandt, Sundquist, and Hemminki 2012). Estudios en gemelos sugieren que la incidencia de casos familiares de esta neoplásia está determinada en un 40% por factores de riesgo genético (Lichtenstein et al. 2000).

II.3.3.2 Raza

Se han descrito diferencias en cuanto a la frecuencia del CaP en diferentes áreas geográficas, siendo las de mayor incidencia, regiones del norte de EUA y Europa y las de menor incidencia las del sureste de Asia. La incidencia y la mortalidad por CaP en hombres afroamericanos es la más alta reportada. En ellos, la tasa de mortalidad es 2.4 veces mayor que los hombres caucásicos (Howlander N 2011). Sin embargo, se ha observado que hombres que migran de Japón a Hawaii incrementan su riesgo a desarrollar CaP y más aun si migran a zonas como California. Estos hallazgos sugieren la presencia de factores ambientales que aumentan la velocidad de progresión de una forma latente de CaP a una forma clínica (Quinn and Babb 2002). Factores como el consumo de ciertos alimentos, comportamiento sexual, consumo de alcohol, exposición a luz ultravioleta y ciertas exposiciones ocupacionales parecen modular el riesgo para desarrollar esta neoplasia (Kolonel, Altshuler, and Henderson 2004).

II.4 Alteraciones moleculares relacionadas al cáncer de próstata

II.4.1 Alteraciones genéticas

La heterogeneidad biológica del CaP se asocia a la heterogeneidad de la expresión génica relacionada a diversas alteraciones cromosómicas las cuales han sido frecuentemente identificadas mediante estudios de análisis de pérdida de heterocigosidad (LOH) y estudios de polimorfismos genéticos. El análisis mediante hibridación genómica comparativa (CGH) y de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) han mostrado algunas alteraciones en regiones cromosómicas predominantes implicadas en la carcinogénesis del CaP. Las

alteraciones cromosómicas más comunes son las deleciones en 1p, 6q, 8p, 10q, 13q, 16q, y 18q y las duplicaciones en 1q, 2p, 7, 8q, 18q y Xq. Estos estudios han permitido la identificación de genes específicos donde su expresión correlaciona con la pérdida o ganancia de las regiones cromosómicas mencionadas como de los siguientes genes *AR* (Xq12), *EIF3S3* (8q23) y *MYC* (8q24) (Yano et al. 2004)

II.4.2 Alteraciones epigenéticas

El CaP es una enfermedad compleja con alteraciones a nivel del ciclo celular, la reparación del ADN, apoptosis, respuesta hormonal y mecanismos de adhesión celular. Diversos estudios sugieren que tanto genes supresores de tumor inactivos, oncogenes activos, receptores de hormonas, citocinas, así como receptores de factores de crecimiento están reguladas no solo por mecanismos genéticos sino también por modificaciones epigenéticas (Esteller 2007). Estas modificaciones incluyen a varios tipos de reguladores de la expresión génica como la metilación del ADN, el remodelamiento de la cromatina y la regulación por microRNAs (Sharma, Kelly, and Jones 2010) .

La metilación de citosinas dentro de los dinucleótidos CpG del ADN es la modificación epigenética más estudiada. Se calcula que del 3-6% de estas citosinas se encuentran normalmente metiladas en el ADN humano. Estos dinucleótidos CpG se encuentran en regiones ricas de CpG las cuales se conocen como islas CpG las cuales se encuentran usualmente no metiladas en todos los tejidos normales (Baylin et al. 2001). En las células normales, existen regiones ricas en secuencias CpG repetidas que frecuentemente se encuentran

altamente metiladas para proteger la integridad del genoma evitando la inserción y activación de la transcripción de secuencias móviles o de elementos capaces de insertarse en el genoma tales como transposones y retrotransposones. A nivel germinal, existen genes tejido-específicos que son regulados a través de la metilación del ADN. Tal es el caso de la impronta genómica y de la inactivación del cromosoma X en las mujeres, donde se requiere de la hipermetilación del ADN de uno de los dos alelos de un gen para establecer en el primer caso una expresión monoalélica y en el segundo una reducción de dosis génica (Delcuve, Rastegar, and Davie 2009). Además de la metilación del ADN, las células requieren de otros mecanismos de regulación epigenética, tales como el código de histonas que consiste en modificaciones covalentes en las colas de las histonas, interacciones ADN-cromatina, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y glucosilación entre otros mecanismos importantes. En las células normales, es necesario que exista un balance preciso en el ADN acetilado activo y acetilado inactivo. Este balance es controlado por enzimas acetiladoras de histonas (HATS) así como enzimas deacetilasas de histonas (HDACs). Otras modificaciones incluyen la metilación de residuos de lisina de las histonas, esta es catalizada por metiltransferasas de histonas (MTH) y es un proceso que regula la expresión génica y la estructura de la cromatina. En general, la metilación en la lisina de H3K9, H3K27 y H4K20 se han asociado con silenciamiento génico mientras que la metilación en H3K4, H3K36 y H3K se ha asociado con activación (Bronner et al. 2007). Tanto los cambios genéticos como epigenéticos son responsables de la disrupción en las vías de señalización celulares en cáncer. Los proto-oncogenes pueden ser sobrepresados por

ganancia de cromosomas, amplificación génica, translocaciones y mutaciones activadoras. Los genes supresores de tumor (GST) pueden ser inactivados por pérdidas cromosómicas, deleciones y mutaciones puntuales. Sin embargo, es claro que actualmente el silenciamiento génico de los GST asociado a la hipermetilación podrían ser considerados como un equivalente funcional de mutaciones puntuales y deleciones, desempeñando un papel fundamental en el desarrollo del cáncer (Munoz-Pinedo et al. 2013).

La mayor parte de la cromatina está en un estado transcripcionalmente inactivo donde el nucleosoma se encuentra muy compactado formando la llamada “cromatina cerrada”, en oposición, la “cromatina abierta” es accesible a la maquinaria de transcripción (Fig.3). La transcripción es regulada por una serie de procesos dinámicos necesarios para reunir los requerimientos adecuados para la síntesis de una proteína particular en un determinado contexto celular. Aunque el orden exacto de los eventos del silenciamiento génico aún son poco conocidos, algunos aspectos son característicos de este estado transcripcional de la cromatina. Las citosinas metiladas de los promotores silenciados se unen a un grupo específico de proteínas represoras. Estas se unen a los dominios de unión de los CaPG metilados o methyl-CaPG-binding-domain proteins (MBDs), en un complejo que también incluye la desacetilasa de histonas (HDAC). Esta última juega un rol central en la regulación de la transcripción debido a que es capaz de remover los grupos acetilo de los aminoácidos en los extremos N-terminal, también llamados colas de las histonas. Este proceso está involucrado en la condensación del nucleosoma y de las histonas hipoacetiladas que también forman parte del silenciamiento temporal de los genes en las regiones de

euromatina. Al contrario, en los promotores transcripcionalmente activos con citosinas no metiladas, las histonas son acetiladas por una acetiltransferasa de histonas (HATs) que forma un complejo activador de la transcripción con factores de transcripción y proteínas coactivadoras (Mungall 2002).

El estado de metilación de las citosinas influye en la formación del cáncer en varias maneras. Primero, la metilación puede alterar las regiones codificadoras de genes induciendo puntos de mutación, segundo, la depleción global de m5C en el genoma puede causar inestabilidad y tercero, hipermetilación focal de las áreas promotoras de los genes puede inactivar su transcripción. El silenciamiento génico por hipermetilación de CpG en las regiones promotoras de los genes supresores de tumores es uno de los eventos epigenéticos fundamentales en la carcinogénesis y es probablemente el mecanismo más común de inactivación de GST en cáncer (Ellis, Atadja, and Johnstone 2009). La metilación de las islas CpG localizadas cerca del sitio de inicio de la transcripción de un GST (3500pb río arriba) es asociado con el silenciamiento del gen, mientras que la metilación en secuencias distantes de la región promotora generalmente no tienen influencia en la expresión génica (Bartova et al. 2009)

En concordancia con la hipótesis de inactivación en dos eventos de los genes supresores de tumores, ambos alelos de un supresor están usualmente inactivados sea por hipermetilación o por una combinación de metilación y delección. En principio cualquier combinación de eventos genéticos y epigenéticos puede llevar a la inactivación de un GST. Es bien conocido por observaciones epidemiológicas que la edad es un riesgo mayor para el desarrollo de cáncer y

en muchos tipos de cáncer es también un factor pronóstico independiente de la respuesta a tratamiento. Los eventos moleculares que subyacen a los efectos adversos de la edad son probablemente multifactoriales (Hanley et al. 2010)

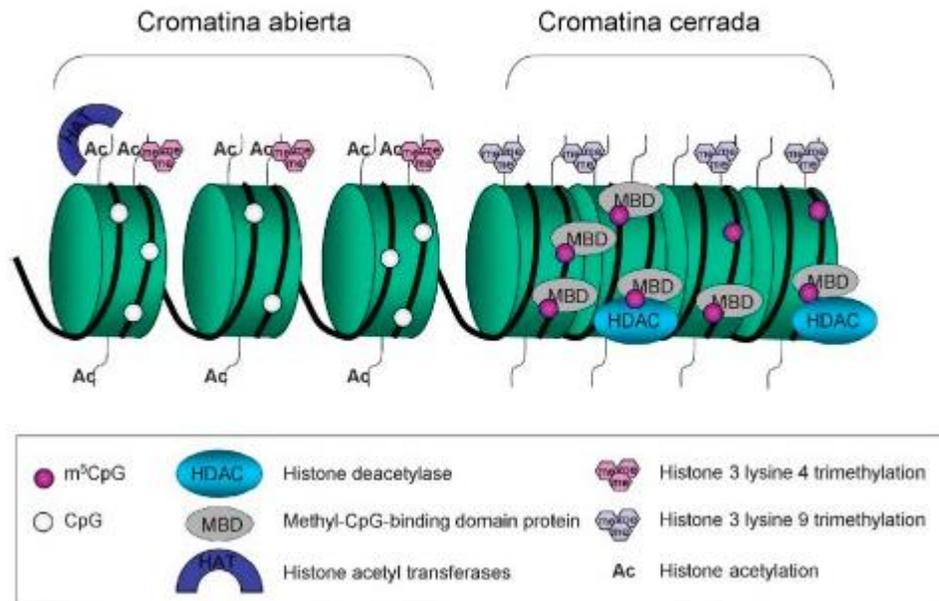


Fig.3 Estructura de la cromatina activa e inactiva del promotor. La cromatina transcripcionalmente activa es caracterizada por citosinas no metiladas y colas de histonas acetiladas. Cuando las citosinas se metilan se unen a MBDs, que atraen HDACs, que van a remover los grupos acetilos de las colas de histonas. El ADN se transforma en una estructura de cromatina cerrada llevando la marca de silenciamiento la histona He lisina 9 trimetilación. (Gronbaek, Hother, and Jones 2007).

sin embargo, patrones alterados de metilación de ADN en pacientes mayores puede ser un elemento clave. En células somáticas, la metilación global disminuye con la edad, mientras que que la metilación de las áreas promotoras aumenta (Delcuve, Rastegar, and Davie 2009). La metilación de las citosina parece extenderse desde las secuencias más alejadas hacia los promotores hasta alcanzar un nivel donde el gen es silenciado(Gronbaek, Hother, and Jones 2007) (Fig.4).

Dependiendo de la función del gen involucrado, estos cambios pueden no tener consecuencias o pueden representar una condición premaligna si ésta ocurre en genes reguladores del crecimiento y muerte celular. Se ha sugerido que la metilación relacionada a la edad puede cambiar la fisiología de las células

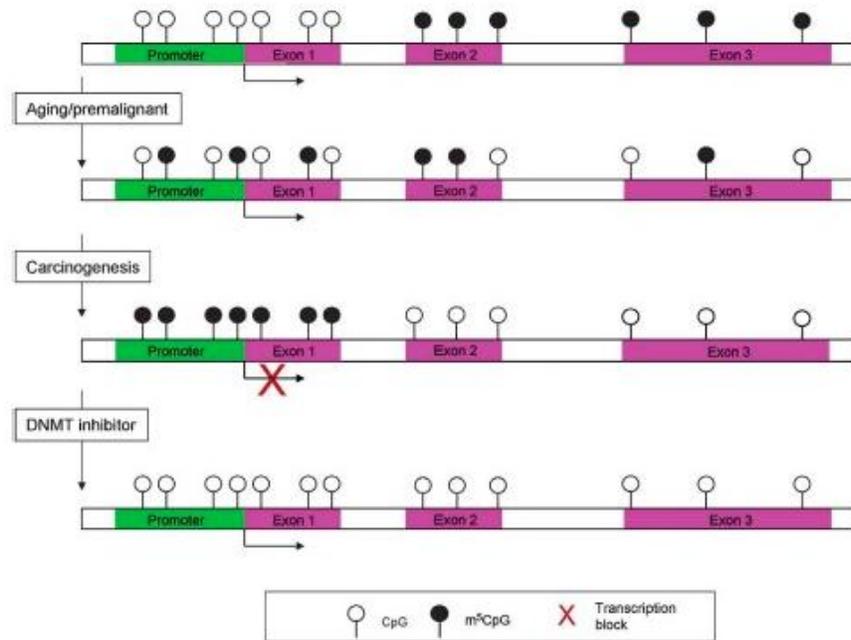


Fig.4 Metilación del ADN en promotores en la carcinogénesis. En tejido normal, la metilación es preferencialmente encontradas en las citosinas de las regiones codificantes de los genes y las islas CaPG de los promotores se encuentran demetilados. En el envejecimiento y en las lesiones preneoplásicas, la metilación se prolonga hacia los promotores. En la medida que estos se metilan se bloquea la transcripción, que puede llevar a la inactivación de los genes supresores de tumores, y que se pueden reactivar con el uso de agentes demetilantes (Gronbaek, Hother, and Jones 2007)

normales de forma que las hace más susceptibles de adquirir defectos genéticos secundarios y por lo tanto promueve la transformación maligna (Delcuve, Rastegar, and Davie 2009).

A nivel molecular, existen genes cuya expresión puede estar aumentada o reprimida parcial o totalmente en células tumorales y en ciertas condiciones benignas propensas al desarrollo del cáncer. Estos cambios anormales en la

expresión génica (EG) pueden deberse a anomalías cromosómicas, mutaciones génicas o metilación aberrante. En el cáncer se han descrito 2 tipos de alteraciones en los patrones de metilación: el primero, una hipometilación global del genoma (HMGG) de las células tumorales y el segundo, hipermetilación en los promotores (HMP) de ciertos genes. Si bien ambos fenómenos pueden ocurrir en la misma célula, estos son independientes (Chekhun 2008). Se sabe que una metilación alterada en los promotores puede aumentar la expresión de oncogenes y factores de transcripción o bien silenciar genes con diversas funciones: supresores de tumor, genes de reparación, diferenciación celular y genes que participan en mecanismos de detoxificación por mencionar algunos (Kang et al., 2004).

II.4.2.1 Hipermetilación del promotor de GSTP1

La familia de enzimas Glutacionina S-transferasa tiene diversas funciones en el metabolismo celular, incluyendo la detoxificación de sustratos potencialmente tóxicos. El gen *GSTP1* localizado en 11q13.2, codifica para una de las enzimas de dicha familia y funciona como un detoxificador al neutralizar radicales libres y se ha descrito que la expresión de este gen se encuentra disminuida o ausente en casi el 100% de los tejidos con CaP y en el 50% de las neoplasias intraepiteliales prostáticas (NIP), comparado con células normales de la próstata o células de HBP (Syeed et al. 2010; Meiers, Shanks, and Bostwick 2007). En CaP, la alteración molecular más frecuente es la disminución de la expresión del gen Glutacionina S-transferasa (*GSTP1*) por hipermetilación del promotor. De acuerdo a los resultados de diversos estudios se calcula que el rango de sensibilidad de este marcador genético es del 82 al 98% y su especificidad del

100% para la detección de CaP en tejido prostático (Harden, Guo, et al. 2003; Trock et al. 2012)

Alteraciones en la metilación de *GSTP1* también se han detectado en orina, plasma y suero con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 70-100% (Tabla 1) para la detección de CaP (Bastian et al. 2005; Mulero-Navarro and Esteller 2008; Trock et al. 2012; Wu et al. 2011)

Tabla 1.- Sensibilidad y especificidad del estudio de la HMP de *GSTP1* y *RASSF1A* para la detección del cáncer de próstata

MUESTRA	% DE SENSIBILIDAD	% DE ESPECIFICIDAD	REFERENCIA
<i>GSTP1</i>			
Biopsia	91 (10/11)	100	(Jeronimo et al. 2001)
Biopsia	73 (11/15)	100	(Harden, Guo, et al. 2003)
Biopsia	75 (46/61)	100	(Harden, Sanderson, et al. 2003)
Eyaculado	44 (4/9)	NA	(Suh et al. 2000)
Eyaculado	50 (4/8)	100	(Goessl et al. 2000)
Plasma	72 (23/32)	100	(Goessl et al. 2000)
Orina	27 (6/22)	100	(Cairns et al. 2001)
Orina posterior a un masaje prostático	36 (4/11)	100	(Goessl et al. 2000)
Orina posterior a un masaje prostático	73 (29/40)	98	(Goessl et al. 2001)
Orina posterior a una biopsia	39 (7/18)	NA	(Gonzalzo et al. 2003)
<i>RASSF1A</i>			
Tejido	68(36/53)	71	(Bastian et al. 2005)
Plasma	60	93	(Pan et al. 2013)
Sedimento Urinario	73	98	(Liu et al. 2002).

II.4.2.2 Hipermetilación del promotor de *RASSF1A*:

Otro gen relacionado al CaP es *RASSF1A* (isoforma A de la proteína de la familia con dominio de asociación a Ras), un gen supresor de tumor que actúa río abajo en la vía apoptótica de Ras debido a su capacidad de unirse a RAS en un mecanismo dependiente de GTP y cuyo promotor se encuentra hipermetilado en tejido tumoral con una frecuencia del 54 al 96%. De acuerdo a los resultados en diversos estudios se calcula que la especificidad de *RASSF1A* es de 59 al 83% y su sensibilidad del 55 al 80% para el diagnóstico de CaP en tejido

prostático (Mulero-Navarro and Esteller 2008) mientras que en sedimento urinario su especificidad es casi del 73% (Liu et al. 2002). La HMP de *RASSF1A* se ha descrito en las NIP con una frecuencia del 64% y en el CaP de se ha asociado con el avance del tumor según la clasificación de Gleason, por lo cual se ha considerado que HMP de este gen podrían ser indicador del inicio del cáncer, así como de su progresión (Liu et al. 2002; Bastian et al. 2005)

II.5 Diagnóstico del cáncer de próstata

II.5.1 Diagnóstico clínico:

Los principales métodos diagnósticos para evidenciar la presencia de un CaP incluyen el tacto rectal (TR), la determinación de la concentración de APE en suero y la ultrasonografía transrectal. El diagnóstico definitivo se basa en la presencia del adenocarcinoma en muestras de biopsia de próstata o en piezas quirúrgicas. El examen histopatológico permite la determinación de la extensión del tumor y tiene valor pronóstico.

II.5.1.1 Tacto Rectal:

La mayoría de los casos de CaP, se localizan en la zona periférica de la glándula y pueden ser detectados por tacto rectal (TR) cuando el volumen es de 0.2 ml o mayor. La sospecha de CaP por TR es indicación absoluta para la realización de una biopsia prostática. Cerca del 18% de los casos se detectan por este método independientemente del nivel de APE. Un TR con sospecha de CaP en pacientes con niveles de APE mayores a 2 ng/ml tienen un valor predictivo positivo de 5-30% (Abdel-Wahab and Silva 2008).

II.5.1.2 Biopsia

Es un método preciso para establecer el tipo de cáncer, pero también posible de que pueda complicarse con hemorragia, infección y especialmente septicemia y diseminación tumoral. La gran mayoría de las biopsias resultan negativas, incluso en presencia de cáncer (National Cancer Institute (U.S.) 2004). Es importante considerar que el diagnóstico histopatológico por biopsia cuenta con algunas limitaciones debido a que para realizar el análisis histopatológico de una biopsia es necesario contar con una cantidad suficiente del mismo y que este tenga un patrón de crecimiento característico del tipo de tumor, atipia nuclear, ausencia de células basales y presencia de material extracelular proveniente de la glándula. La falta de alguna de estas características puede limitar en ciertas ocasiones la precisión del diagnóstico (Abdel-Wahab and Silva 2008)

II.5.1.3 Ultrasonografía transrectal:

Ecografía prostática convencional: permite tener una idea aproximada del tamaño de la próstata, pero debido a su baja sensibilidad se acostumbra complementarla con la biopsia prostática (National Cancer Institute (U.S.) 2004).

II.5.2 Biomarcadores protéicos

II.5.2.1 Fosfatasa ácida:

Uno de los primeros marcadores séricos para el diagnóstico del CaP fue la fosfatasa ácida (FA). A principios de 1930, se describió un incremento de la actividad de la FA en el sitio de metástasis así como niveles elevados de la

proteína en suero. Esta observación permitió establecer a la FA como un biomarcador de progresión y respuesta a la terapia de privación de andrógenos en el cáncer metastásico . Whitesel y colaboradores (1984) reportaron que hombres con niveles elevados de FA previo a la cirugía tuvieron nodulos positivos y desarrollaron metástasis comparados con aquellos con FA normal y que además podría predecir el pronóstico combinado con otros factores (Whitesel et al. 1984). Con el uso del APE, los niveles séricos de FA fueron siendo menos utilizados y debido a su menor sensibilidad no se emplea para el tamizaje, estadiaje o pronóstica del CaP. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que FA es un buen marcador para el pronóstico de pacientes en tratamiento con enfermedad agresiva y que tienen un alto riesgo a una recaída (Taira et al. 2007).

II.5.2.2 Antígeno prostático específico:

El antígeno prostático específico (APE) es una serina proteasa del tipo calicreína, producida exclusivamente en las células del epitelio prostático y es considerada como una proteína órgano específica pero no cáncer específica. Los niveles de APE suelen elevarse en pacientes HBP, prostatitis y otro tipo de enfermedades prostáticas no malignas (McKenzie et al. 2011). Se propone que existe una correlación en cuanto al nivel de APE y un incremento en la probabilidad de manifestar CaP. Se han descrito varias modificaciones con respecto al valor del APE en suero para incrementar su especificidad en la detección temprana del CaP. Estas incluyen la densidad del APE, la densidad de la zona de transición y los niveles de derivados de APE, los cuales tienen un uso

limitado en la práctica clínica. El APE se determina como normal <4 ng/ml, intermedio 4.1-10 ng/ml y altamente sospechoso arriba de 10 ng/ml. Estos dos últimos requieren de biopsia, ya que las dos terceras partes de cáncer prostático se observan en personas con resultados de 10 y más de 10ng/ml. En la tabla 1 se presenta un cálculo de riesgo de CaP en relación con el nivel de APE sérico en 2950 varones y con valores normales de APE (Loeb 2011).

Tabla 2. Concentración de APE (ng/ml) y Riesgo para CaP

APE (ng/ml)	RIESGO PARA CaP
0-0,5	6,6 %
0,6-1	10,1 %
1,1-2	17,0 %
2,1-3	23,9 %
3,1-4	26,9 %

II.5.3 Bioarcadores moleculares

II.5.3.1 Marcador PCA3

A diferencia de los marcadores séricos el marcador de ARNm no codificante específico de la próstata PCA3, se detecta en el sedimento urinario obtenido después de un masaje prostático. Las principales ventajas del PCA3 sobre el APE son su sensibilidad y especificidad. La concentración de PCA3 presenta mayor sensibilidad y especificidad en biopsias positivas más no en HBP ni en la prostatitis (Hessels et al. 2010). Hay datos contradictorios acerca de si

los valores de PCA3 están relacionados con la agresividad del tumor. Aunque el PCA3 podría tener utilidad para identificar CaP en los varones con biopsias inicialmente negativas a pesar de un APE elevado, la determinación de PCA3 sigue siendo experimental. Hasta ahora, ninguno de los biomarcadores señalados se utiliza habitualmente para asesorar a pacientes sobre la necesidad de practicar una biopsia de próstata para descartar un CaP (Shappell 2008).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte y el de próstata resulta ser la segunda neoplasia más común en el hombre en edad post-productiva con una tasa de 71.7 por 100,000 habitantes. Durante la década de 1990 a 1999, la tasa de mortalidad por esta enfermedad ascendió de 2.79 a 3.75 por 100 mil habitantes y aunque no se cuentan con datos precisos, el Sector Salud considera que la tasa de mortalidad sigue en aumento. De 1995 a 1999, el número de defunciones por CaP fue de 17,099, de las cuales el 87.3% correspondió al grupo de 65 y más años de edad, el 12.66% al grupo de 15 a 64 años y el restante, 0.4% a menores de 15 años.

De acuerdo con los datos de la SSa un programa eficaz de diagnóstico temprano en las instituciones públicas del país, evitaría casi 3,800 muertes por esta enfermedad en un periodo de 6 años. Hasta la fecha no se cuenta con marcadores diagnósticos y pronósticos precisos para CaP, si bien la determinación de niveles séricos de APE es ampliamente usada en la práctica clínica, su baja sensibilidad y especificidad hacen de este un método diagnóstico poco preciso debido a que los niveles de APE pueden elevarse como resultado de otras patologías diferentes al cáncer de próstata y a que individuos con CaP (20-30% de los casos) pueden tener niveles normales de APE. Hay que tomar en cuenta que la determinación de niveles del antígeno, tiene que ir acompañada por otros métodos de diagnóstico como el TR o la biopsia con aguja delgada. Por otra parte, los niveles de APE no tienen una utilidad pronóstica es decir no se ha

encontrado alguna correlación constante entre los niveles de APE y las características clínicas y anatomopatológicas del CaP

IV. HIPOTESIS

La detección de cambios epigenéticos específicos en el ADN de tumores de CaP incrementa la sensibilidad y especificidad diagnóstica de los criterios clínicos y del antígeno prostático específico mediante su hallazgo en muestras de sedimento urinario y/o en plasma

V. JUSTIFICACIÓN

1. De acuerdo con lo revisado en la literatura, queda de manifiesto la urgente necesidad de contar con marcadores diagnósticos y pronósticos que por una parte detecten al cáncer en etapas curables y por otra permitan predecir el comportamiento del tumor. Esto podría significar una mayor supervivencia y mejor calidad de vida para el paciente.

2. Las características de la hipermetilación del ADN hacen de este un marcador interesante en el cáncer, ya que puede ser determinada en una variedad de tipos de muestras de fácil obtención por medios no invasivos y sin un procedimiento especial para la conservación de la misma. A diferencia de las mutaciones que pueden ocurrir en cualquier región del gen, la HMP ocurre en regiones definidas del mismo como las islas CpG. Los niveles de HMP pueden ser observados en una copia de ADN metilada por cada 100,000 copias no metiladas.

3. Se ha reportado que existen perfiles de metilación específicos en genes para cierto tipos de cáncer, por ejemplo: *GSTP1* en CaP, *VHL* en cáncer renal, *MLH1* en cáncer de colon y *APC* en cáncer esofágico. Esto permite distinguir un CaP de otros tipos de tumores. Si bien se ha incrementado el número de genes descritos con metilación aberrante, hay todavía muchas interrogantes por ser contestadas para entender el significado biológico y las consecuencias de este proceso en la aparición y desarrollo del CaP.

4. Es importante considerar que el diagnóstico histopatológico por biopsia con aguja delgada cuenta con algunas limitaciones debido que para realizar el análisis histopatológico de una biopsia es necesario contar con una cantidad suficiente del mismo y que este tenga un patrón de crecimiento característico del tipo de tumor, atipia nuclear, ausencia de células basales y presencia de material extracelular proveniente de la glándula. La falta de alguna de estas características puede limitar en ciertas ocasiones la precisión del diagnóstico. Por su parte, el análisis de expresión génica, permite analizar en menor tiempo marcadores empleados para el diagnóstico histológico por inmunohistoquímica.

5. El análisis por PCR en tiempo real permite la cuantificación de la metilación del promotor y de la expresión génica. A partir de estos datos y el análisis de las características clínicas y morfológicas del tumor, sería posible evaluar de una forma más precisa el diagnóstico temprano y pronóstico del CaP.

6. Por todo lo mencionado, es necesario generar nuevas opciones para la prevención del CaP, atención oportuna de los pacientes e implementación de medidas en todos los sectores de la población con mayor riesgo por su edad y antecedentes familiares, para la promoción de salud por medio de campañas

de sensibilización dirigidas a vencer la resistencia de los hombres a realizarse exámenes médicos periódicos invasivos, en general no aceptados por una gran proporción de la población masculina, por otros no invasivos y confiables.

VI. OBJETIVOS:

VI.1 Objetivo general:

Determinar la utilidad de ciertos marcadores genéticos y moleculares que permitan la detección temprana, evaluar el pronóstico y contribuir al seguimiento del cáncer de próstata a través de métodos no invasivos.

VI.2 Objetivos específicos:

1. Cuantificar el grado de metilación en promotores de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en ADN de tejido prostático, plasma y sedimento urinario (SUR) de pacientes con cáncer de próstata y de pacientes con hiperplasia benigna de la próstata.

2. Determinar la sensibilidad, especificidad, el valor predictivo positivo (VPP) y el valor predictivo negativo (VPN) diagnósticos del porcentaje de metilación de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* individualmente y en conjunto.

3. Determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos del antígeno prostático específico (APE).

4. Determinar la sensibilidad, especificidad, VPP y VPN diagnósticos del APE en conjunto con el porcentaje de metilación de los genes *GSTP1* y *RASSF1A*.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

VII.1 Diseño del estudio:

Evaluación de una prueba diagnóstica.

VII.1.1 Descripción del estudio:

A todos los pacientes se les informó de los objetivos y procedimientos del estudio y todos aquellos pacientes que otorgaron su consentimiento informado por escrito fueron incluidos en el estudio con la seguridad de que la información recabada para este estudio era confidencial, que su participación era voluntaria pudiéndose negar a participar en cualquier momento y que eso no repercutiría en su tratamiento ni seguimiento dentro de las instituciones que colaboraron en este protocolo. El estudio tuvo un carácter observacional y no experimental, por lo que careció de maniobras activas que influyeran directamente en la historia natural de su enfermedad ya que solo se tomaron muestras sanguíneas y de orina, y las muestras de tejido prostático fueron obtenidas de biopsias y cirugías programadas como parte de su seguimiento clínico. De cada participante se obtuvo una muestra de sangre, orina y tejido prostático y de dichas muestras se realizó la extracción de ADN para cuantificar el grado de metilación de los genes *GSTP1* y *RASSF1A*. De las muestras de suero se determinó el APE.

VII.2 Población de estudio:

La unidad de análisis en este estudio fueron biopsias de tejido prostático, muestras de plasma, suero y orina de pacientes que asistieron a la consulta del Departamento de Urología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán” (INCMNSZ) y del Instituto Nacional de Cancerología (INCAN) de enero de 2008 a diciembre de 2010.

VII.3 Criterios de selección

Casos: se incluyeron pacientes que contaban con un diagnóstico histológico confirmado de CaP y que autorizaron su participación por escrito para someterse a los exámenes clínicos y de laboratorio propuestos en este protocolo.

Controles: se incluyeron pacientes que contaban con un diagnóstico histológico confirmado de HBP y que autorizaron su participación por escrito a someterse a los exámenes clínicos y de laboratorio propuestos en este protocolo.

Criterios de eliminación: Los casos y controles se eliminaron cuando las muestras no tenían suficiente cantidad para realizar todos los estudios propuestos

VII.4 Tamaño de muestra:

Se decidió un valor alfa de 0.05 y un poder del 80%, estimándose de esta manera una muestra de 80 pacientes con CaP y 80 pacientes con HBP. En este estudio pudieron analizarse 83 pacientes con CaP y 103 con HBP todos ellos con un diagnóstico confirmado mediante un análisis histopatológico de tejido prostático.

VII.5 Métodos de laboratorio:

VII.5.1 Toma de muestras

Se extrajo un volumen de 12 ml separados en 4 tubos Vacutainer con EDTA. Después de su obtención, en un lapso no mayor a 1 hora, el plasma fue separado por centrifugación a 3000 rpm durante 10 minutos y fue fraccionado y

congelado inmediatamente a -70°C . El paquete globular de los tubos con EDTA fue empleado para extracción de ADN.

VII.5.2 Determinación de APE en suero:

La determinación se realizó antes de la cirugía u obtención de una biopsia con aguja delgada y se cuantificó en el Laboratorio Central del INCMNSZ y del INCAN mediante la prueba específica de la línea ACCESS (Beckman Coulter Inc.), un ensayo que tiene una sensibilidad analítica de 0,008 ng de antígeno por ml de suero.

VII.5.3 Extracción de ADN de sangre, tejido prostático, sedimento urinario y plasma:

Esta se llevó a cabo por medio de kits comerciales (QiAmp DNA Micro Kit de QIAGEN) de acuerdo con las condiciones reportads por el proveedor. Por espectrofotometría (Equipo Nanodrop-Termofisher®) se determinó la concentración cada muestra y su pureza de acuerdo a las razones 260/280 y 260/230, el ADN se mantuvo a -70°C hasta su uso.

VII.5.4 Conversión del ADN con bisulfito de sodio:

Para la conversión con bisulfito de sodio, se usaron 1.5 microgramos de ADN empleando un método comercial (EpiTect Bisulfite Kit, QIAGEN). El ADN modificado se cuantificó nuevamente por espectrofotometría (Equipo Nanodrop-Termofisher®) y se mantuvo a -70°C hasta su uso.

XII.5.5. PCR cuantitativo metilación-específica

La cuantificación de la metilación en regiones promotoras ricas en dinucleótidos CpG se hizo mediante PCR en tiempo real con SYBR green empleando primers específicos (Tabla 3) para ADN convertido por bisulfito y que amplifican regiones promotoras de los distintos genes, además del gen de referencia (*ACTB*: β -*ACTINA*) en ADN de muestras de tejido prostático, sedimento urinario y plasma.

Todos los ensayos de PCR, se realizaron con 2 controles: alelos no metilados (ADN de la línea celular Jurkat tratados con Azacitidina), alelos metilados (ADN de la línea celular Jurkat tratados in vitro con Sss I metiltransferasa, New England Biolabs). La cuantificación de la metilación se representó en porcentaje de copias metiladas del promotor y se calculó mediante la fórmula $\%MP = (\text{no. de copias metiladas gen de interés} / \text{total de copias del gen } ACTB \text{ en la muestra}) \times 100$ (Bastian et al. 2005)

Tabla 3. Secuencia de primers para reacciones de PCR-Metilación específica.

PRIMER	SECUENCIA	CONDICIONES DE AMPLIFICACION
<i>GSTP1</i>	For M 5-GTCGTG ATT TAGTAT TGGGGC-3 Rev M 5-CTA ATA ACG AAA ACTACG ACG ACG-3	40 x (94°C 45s, 56°C 45s, 72°C 1 m)
<i>RASSF1A</i>	For M 5-GCGTTGAAGTCGGGGTTC-3 Rev M 5- CCCGTA CTT CGC TAA CTT TAA ACG-3	40 x (94°C 45s, 56°C 45s, 72°C 1 m)
<i>ACTB</i>	For 5- TGGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3 Rev 5-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTAA -3	40 x (94°C 45s, 56°C 45s, 72°C 1 m)

Referencia (Bastian et al. 2005)

VII.6 Análisis estadístico

Mediante el uso del paquete estadístico SPSS Ver 10 y STATA Ver 9 se realizaron los siguientes análisis:

Análisis univariado: Se caracterizó a la población de estudio mediante el uso de estadística descriptiva tomando en cuenta variables sociodemográficas y antecedentes clínicos. Se calculó la mediana del %MP de *GSTP1* y *RASSF1*, en cada muestra biológica de los pacientes con HBP y CaP. De igual forma se describieron las características de los tumores tales como estadio, grado histológico y presencia de metástasis.

Análisis Bivariado: Mediante el uso de estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney) se compararon los niveles de metilación en las regiones promotoras de *GSTP1* y *RASSF1A* en muestras de ADN de tejido prostático, plasma y SUR de los dos grupos de pacientes (CaP e HBP). Se realizó además el análisis de sensibilidad y especificidad mediante el uso de curvas ROC (Receiver Operating Characteristic) o curvas de rendimiento diagnóstico. Se analizó el área bajo la curva (AUC) considerando que esta área posee un valor comprendido entre 0,5 y 1, donde 1 representa un valor diagnóstico perfecto y donde 0,5 es una prueba sin capacidad discriminatoria diagnóstica. Es decir, si el AUC para una prueba diagnóstica es 0,8 significa que existe un 80% de probabilidad de que el diagnóstico realizado a un enfermo sea más correcto que el de una persona sana escogida al azar. Se evaluó la sensibilidad y especificidad así como valores predictivos individuales de los diferentes tipos de muestras analizadas. A continuación se definen los conceptos mencionados así como la forma de realizar el cálculo de los mismos (Tabla 4)

Sensibilidad (S): Probabilidad de clasificar correctamente a un individuo enfermo = Verdaderos Positivos (VP)

Especificidad (E): Probabilidad de identificar correctamente a un individuo sano = Verdaderos Negativos (VN)

Valor predictivo positivo (VPP): Indica la probabilidad de que un individuo con una prueba positiva realmente se encuentre enfermo = probabilidad post-prueba de tener la enfermedad.

Valor predictivo negativo (VPN): Es la probabilidad de que un individuo con una prueba negativa realmente se encuentre libre de la enfermedad en estudio.

Tabla 4: Cálculo de Sensibilidad, Especificidad y valores predictivos

Resultado de la prueba	Verdadero diagnóstico		
	Enfermo	Sano	
Positiva	Verdadero Positivo (VP)	Falso Positivo (FP)	<u>Valor predictivo positivo</u> VPP= VP/(VP+FP)
Negativa	Falso Negativo (FN)	Verdadero Negativo (VN)	<u>Valor predictivo negativo</u> VPN= VN/(VN+FN)
	VP + FN	VN + FP	
	<u>Sensibilidad</u> = VP/(VP + FN)	<u>Especificidad</u> = VN/(VN + FP)	

El valor predictivo positivo (VPP) del % de metilación de los promotores en conjunto y con el antígeno prostático específico (APE) se calculó mediante un análisis bayesiano usando la siguiente fórmula:

$$\text{Pr (CP|M+)} = \frac{P(\text{CP}) * P(\text{M}_1|\text{CP}) * P(\text{M}_2|\text{CP})}{[P(\text{CP}) * P(\text{M}_1|\text{CP}) * P(\text{M}_2|\text{CP})] + [P(\bar{\text{CP}}) * P(\text{M}_1|\bar{\text{CP}}) * P(\text{M}_2|\bar{\text{CP}})]}$$

Donde:

VALOR PREDICTIVO POSITIVO (VPP)	PROBABILIDAD DE QUE UN PACIENTE CON UN MARCADOR POSITIVO (M_n+) TENGA CaP TENIENDO ANTECEDENTES CLINICOS POSITIVOS.
--	---

$P(\text{CaP}) =$ Prevalencia del CaP en la muestra estudiada.

$P(\bar{\text{CaP}}) =$ Prevalencia de no CaP en la muestra estudiada.

$P(M_n+|\text{CaP}) =$ Probabilidad de tener un M_n+ dado que el paciente tiene CaP.

$P(M_n+|\bar{\text{CaP}}) =$ Probabilidad de tener un M_n+ dado que el paciente no tiene CaP

VIII. RESULTADOS

VIII.1 Características del grupo de estudio.

La muestra analizada estuvo conformada por 83 pacientes con CaP y 103 con HBP. Del grupo de pacientes con CaP, 25 (30.1%) fueron pacientes del INCAN y 58 (69.9%) fueron pacientes del INCMNSZ. En cuanto a los pacientes con HBP, 26 (25.2%) fueron pacientes del INCAN y 77 (74.8%) fueron pacientes del INCMNSZ. El grupo de pacientes con CaP tuvo un promedio de edad de 67.2 años con un rango de 52 a 88 años y el grupo de pacientes con HBP tuvo un promedio de edad de 65.4 años con un rango de 41 a 78 años. Al comparar el promedio de edad entre ambos grupos no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0.13$). Se propone que la obesidad y el tabaquismo son factores de riesgo para el desarrollo de CaP, por lo que se determinó el índice de masa corporal en ambos grupos siendo el promedio para el grupo de CaP de 25.27 y de 25.25 para los pacientes con HBP. Del grupo de pacientes con CaP, el 46.8% de ellos fueron fumadores, mientras que el hábito de fumar se observó en el 47.5% de los pacientes con HBP, para estos dos factores de riesgo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos.

En cuanto a las características tumorales del CaP en 79 de los pacientes se pudo realizar la clasificación de Gleason, siendo más frecuente el grado 6 que se observó en 39 (49.4%) pacientes, seguido del grado 7 y el grado 9 que se observaron en 16 (20.2%) y 14 (17.7%) pacientes respectivamente. El grado 8 se observó en 8 (10.1%) pacientes y el grado 3 y 10 en un solo paciente para cada uno de dichos estadíos (1.3% cada uno).

VIII.2 Niveles de Antígeno Prostático Específico (APE)

A todos los pacientes se les determinaron niveles de antígeno prostático específico (APE). Para comparar los niveles de APE entre pacientes con CaP y pacientes con HBP, los pacientes de cada grupo fueron estratificados de acuerdo a niveles de APE empleados en la práctica clínica para el diagnóstico de CaP: normal < 4 ng/ml, intermedio $\geq 4 < 10$ ng/ml, altamente sospechoso ≥ 10 ng/ml. Al comparar los niveles de APE entre los pacientes con CaP e HBP, no se observaron diferencias estadísticamente significativas $X^2=5.976$ ($p=0.0504$) (Tabla 5)

Tabla 5.- Niveles de antígeno prostático específico en los grupos estudiados.

NIVELES DE APE	CaP N= 83	HBP N=103	P
<4 ng/ml	5	6	
$\geq 4 < 10$ ng/ml	38	65	
≥ 10 ng/ml	40	32	0.0504

VIII.3 Porcentaje de metilación de los promotores GSTP1 y RASSF1A

El porcentaje de metilación del promotor (%MP) fue determinado mediante cuantificación absoluta de copias metiladas de las regiones promotoras de los genes de interés empleando PCR de tiempo real. De acuerdo a lo descrito en la metodología, cada muestra de interés fue convertida con bisulfito de sodio y amplificada por triplicado el cual fue promediado. La figuras 5A y 6A muestran un ejemplo de las curvas de amplificación de muestras con una cantidad conocida de copias de ADN convertidas del gen *ACTB* y una cantidad conocida copias

metiladas a partir de las cuales se realizó una curva estándar para determinar la cantidad de copias convertidas de *ACTB* (gen endógeno) y metiladas de *GSTP1* y *RASS1A* en muestras de pacientes. Como se puede observar en ambas figuras, la amplificación de 200 copias inicia entre el ciclo 18 y 20 para ambos genes. La sensibilidad establecida para este ensayo permitió cuantificar correctamente desde 200 copias hasta 0.2 copias convertidas (Tablas 6 y 7). En las figuras 5B y 6B, se representa gráficamente la regresión lineal a partir de la cual se determinó la concentración de secuencias convertidas y metiladas en las muestras de pacientes. Para validar las curvas se consideraron 3 parámetros propuestos en la literatura: el valor de R^2 cercano a 0.99, la pendiente (M) lo más cercano a 3.2 y una eficacia de reacción cercana a 1.0.

Para corroborar que la amplificación que se estaba cuantificando fuera específica de la secuencia de los promotores, se realizó un análisis de desnaturalización. Como puede observarse en las figuras 5C y 6C, es posible observar un solo pico a la temperatura de desnaturalización correspondiente a cada gen. Para *ACTB*, la temperatura de desnaturalización fue cercana a 75 °C mientras que para *GSTP1* fue más cercana a los 80 °C al igual que para *RASSF1A*.

Una vez cuantificado se realizó el cálculo del número de copias de *ACTB* (Tabla 6), *GSTP1* y de *RASSF1A* en las muestras de pacientes con CaP y con HBP y se determinó el %MP como la razón de la (*cantidad del gen de interés / cantidad del gen endógeno*) $\times 100$. En la tabla 7 se muestra un ejemplo del cálculo efectuado en muestras de SUR.

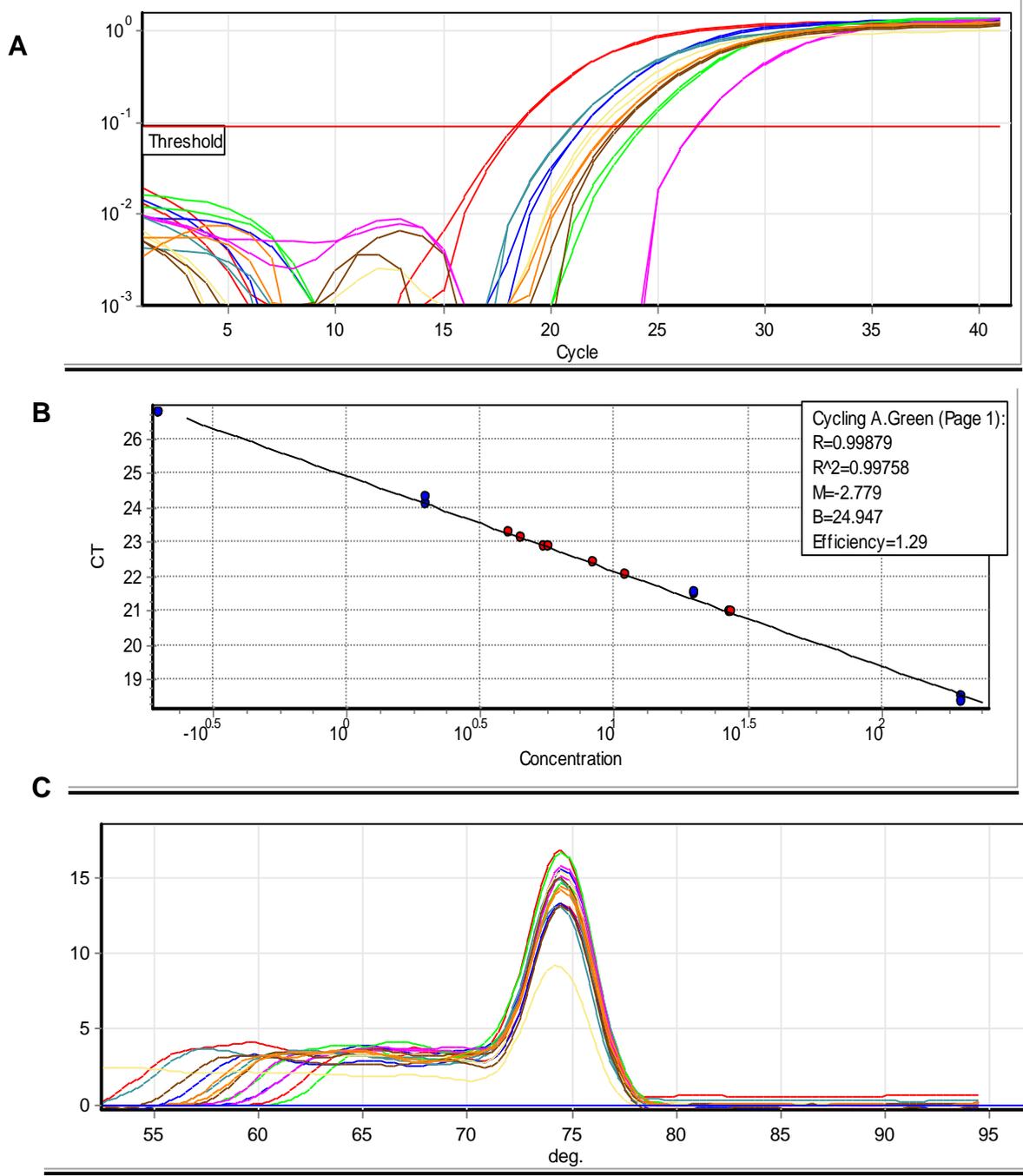


Figura 5. Cuantificación absoluta de ADN convertido con bisulfito de sodio. A: curva de amplificación de secuencias convertidas del gen *ACTB*; B: curva estándar para la cuantificación absoluta de secuencias convertidas de *ACTB*, la cual se realizó empleando diluciones logarítmicas (círculos azules) ; C: curva de desnaturalización del producto amplificado de *ACTB* donde se observa un solo pico lo que indica que el producto y la incorporación de SYBR Green fueron específicos.

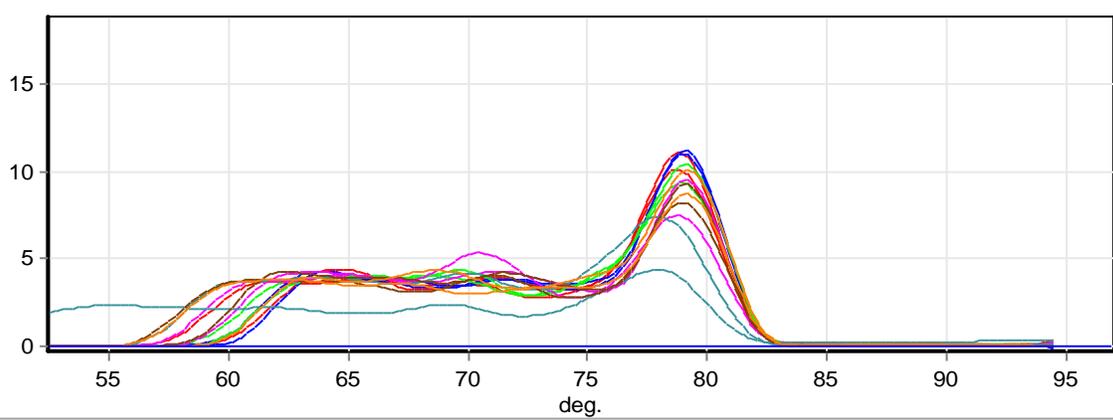
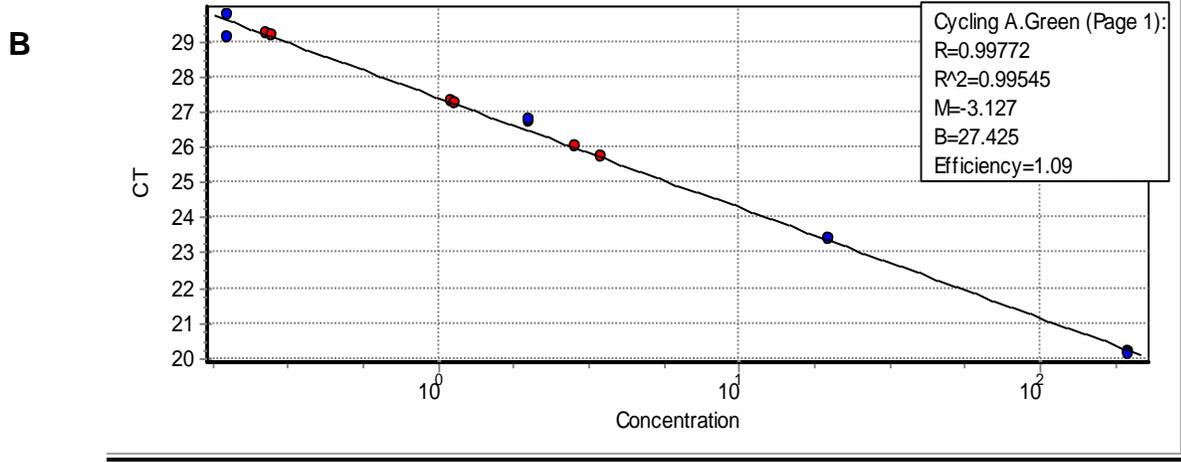
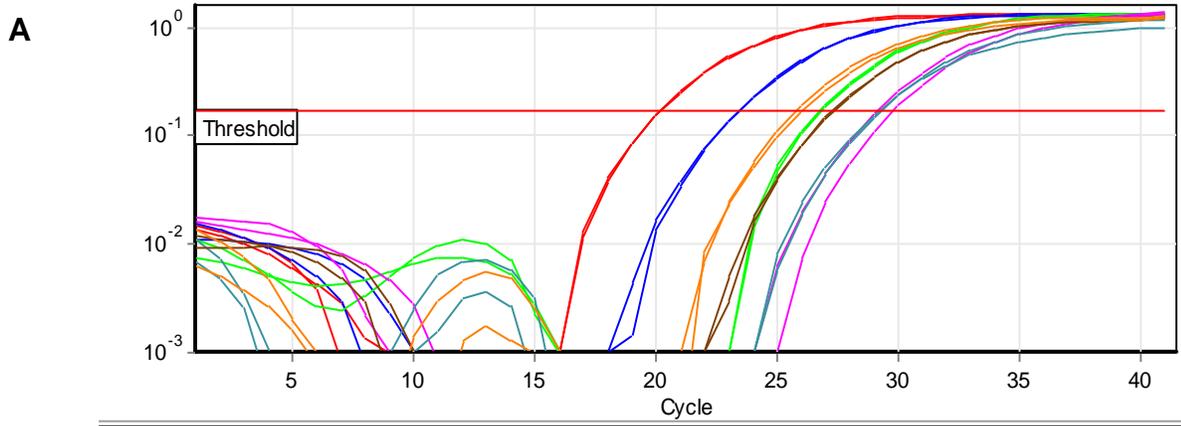


Figura 6. Cuantificación absoluta de *GSTP1* metilado. A: curva de amplificación de secuencias metiladas del gen *GSTP1*; B: curva estándar para cuantificación absoluta de secuencias metiladas de *GSTP1* la cual se realizó empleando diluciones logarítmicas (círculos azules) las muestras problema o de interés se observan en la grafica como círculos rojos; C: curva de desnaturalización del producto amplificado de *GSTP1* donde se observa un solo pico lo que indica que el producto y la incorporación de SYBR Green fueron específicos.

Tabla 6. Resultados de la cuantificación absoluta de *ACTB* convertido.

<i>ACTB</i>	Ct	copias/reacción	
ST 200 ng	18.47	213.33	221.61
ST 200 ng	18.33	229.88	
ST 20 ng	21.49	19.56	19.37
ST 20 ng	21.51	19.17	
ST 2 ng	24.11	1.99	1.84
ST 2 ng	24.32	1.69	
ST 0.2 ng	26.77	0.22	0.22
ST 0.2 ng	26.75	0.22	
AZA	20.95	27.37	27.23
AZA	20.96	27.09	
SUR-140	22.39	8.34	9.71
SUR-140	22.04	11.08	
SUR-154	23.25	4.07	4.29
SUR-154	23.13	4.50	
SUR-161	22.88	5.52	5.62
SUR-161	22.84	5.71	

ST: estándar de ADN de la línea celular Jurkat metilado en secuencias CaPG; AZA: ADN de la línea celular Jurkat tratado con 5-azacitidina; SUR: ADN de sedimento urinario.

Tabla 7. Resultados de la cuantificación absoluta de *GSTP1* metilado.

<i>GSTP1</i>	Ct	copias/reacción	copias/ reacción	% MP DE <i>GSTP1</i>
ST 200 ng	20.14	212.87	216.22	
ST 200 ng	20.10	219.56		
ST 20 ng	23.37	19.45	19.35	
ST 20 ng	23.40	19.26		
ST 2 ng	26.70	1.70	1.65	
ST 2 ng	26.79	1.60		
ST 0.2 ng	29.75	0.18	0.22	
ST 0.2 ng	29.10	0.25		
AZA				
AZA				
SUR-140	29.16	0.28	0.28	2.88
SUR-140	29.21	0.27		
SUR-154	27.25	1.13	1.12	26.11
SUR-154	27.29	1.10		
SUR-161	26.00	2.85	3.17	56.41
SUR-161	25.73	3.49		

ST: estándar de ADN de la línea celular Jurkat metilado en secuencias CaPG; AZA: ADN de la línea celular Jurkat tratado con 5-azacitidina; SUR: ADN de sedimento urinario.

VIII.4 Comparación de los porcentajes de metilación de promotores en muestras de pacientes con CaP e HBP

Las figuras 7A y 7B muestra gráficamente la distribución de los porcentajes de metilación en los diferentes tipos de muestras analizadas en pacientes con CaP e HBP. Los mayores %MP de *GSTP1* y *RASSF1A* fueron observados en tejido prostático de CaP con medianas de 17.20% y 17.25%, respectivamente seguido del SUR en el mismo grupo de pacientes con porcentajes de 8.8 y 4.2 respectivamente y por último el plasma con niveles no mayores de 2.5% en los pacientes con CaP (Tabla 8). Mediante el uso de estadística no paramétrica (U de Mann-Whitney) se compararon los niveles de metilación en las regiones promotoras de *GSTP1* y *RASSF1A* en muestras de ADN de tejido prostático, SUR y plasma de los dos grupos de pacientes. Cuando se compararon los %MP de *GSTP1* en las muestras de tejido y SUR, se pudo observar una mayor frecuencia de metilación del promotor en los pacientes con CaP comparado con los pacientes con HBP, siendo estas diferencias estadísticamente significativas, fenómeno que no se observó en el análisis del plasma. En cuanto al análisis del promotor de *RASSF1A*, los resultados muestran un mayor %MP en las muestras de ADN de tejido, SUR y plasma correspondientes a los pacientes con CaP comparado con los pacientes con HBP, siendo estas diferencias estadísticamente significativas (Tabla 8).

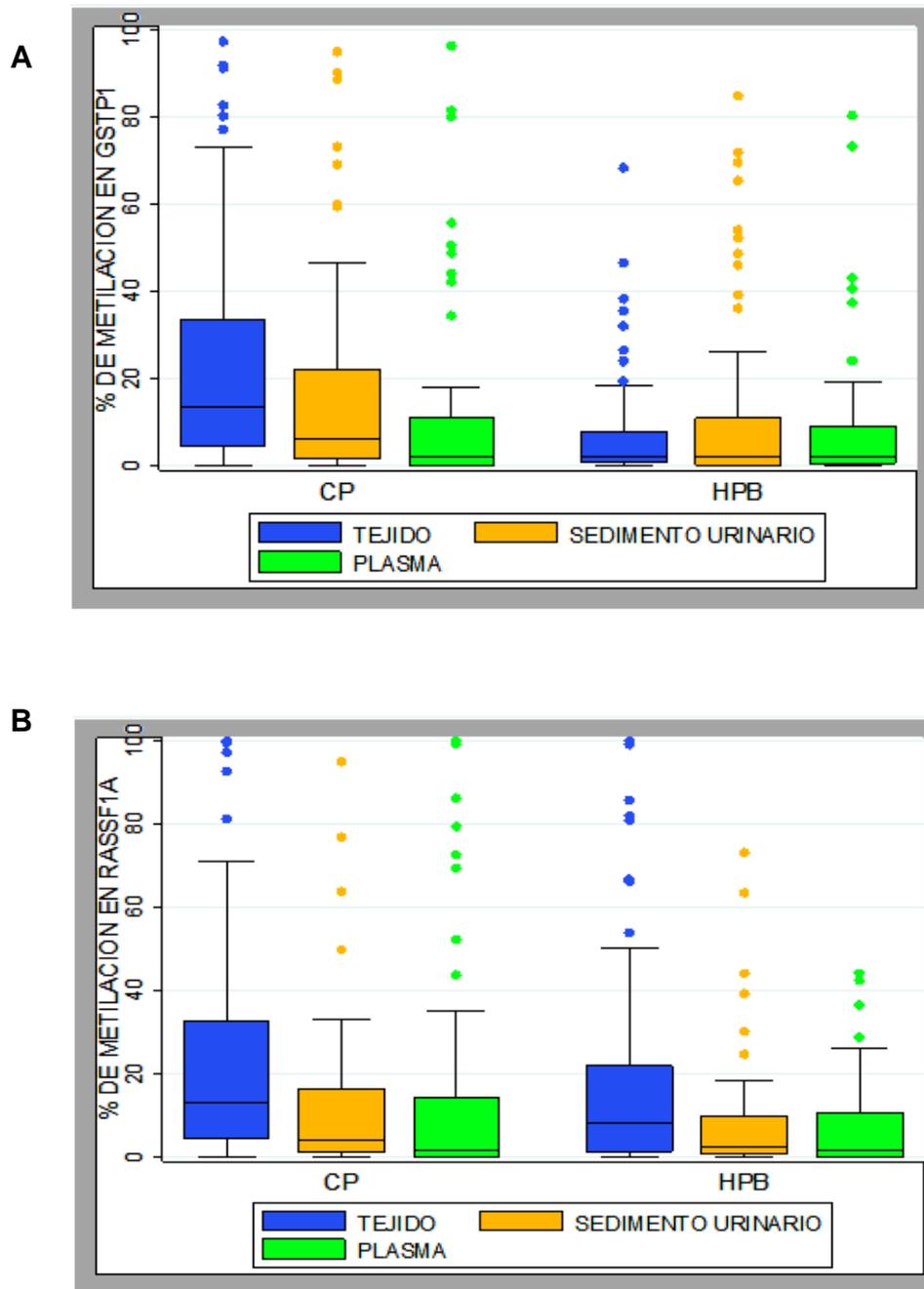


Figura 7 Distribución del % de metilación de promotores en muestras de ADN de pacientes con CaP y pacientes con HBP. **A**: % de metilación del promotor de *GSPT1* en muestras de ADN de tejido, SUR y plasma; **B**: %MP de *RASSF1A* en muestras de ADN de tejido, SUR y plasma.

Tabla 8. Distribución del % de metilación de promotores en muestras de ADN de pacientes con CaP y pacientes con HBP.

PROMOTOR	P ₅₀ DEL % DE MP		p
	CaP n=83	HBP n=103	
GSTP1			
Tejido	17.20	2.28	0.000
SUR	8.80	2.30	0.001
Plasma	2.10	2.10	0.522
RASSF1A			
Tejido	17.25	8.50	0.009
SUR	4.12	2.70	0.002
Plasma	2.40	1.30	0.044

SUR: Sedimento urinario

VIII.5 Validez diagnóstica del APE y del porcentaje de metilación de los promotores GSTP1 y RASSF1A para el diagnóstico de cáncer de próstata.

Mediante el análisis de curvas ROC (Fig 8; Tabla 9), se determinó la exactitud diagnóstica de APE y el %MP de *GSTP1* y *RASSF1a*, como puede observarse en la fig. 8A, la determinación del %M de *GSTP1* en tejido muestra un área bajo la curva mucho mayor que el APE, seguido del %M de *GSTP1* en SUR y plasma. Esto se documenta en la Tabla 9 que muestra el área bajo la curva de cada uno de los marcadores analizados así como los IC_{95%} lo que indica la precisión diagnóstica de la prueba, es decir con que seguridad esta determinación distingue a un individuo con CaP y a quien no lo tiene. De igual forma en la Fig. 8B se muestra el mismo análisis para *RASSF1A* y en la Tabla 9 las áreas bajo la curva observadas para este marcador en esta muestra de estudio. Es notable la diferencia en cuanto a la exactitud diagnóstica de %MP de *GSTP1* y *RASSF1a* en tejido tumoral y sedimento urinario comparado con el APE. Se determinaron como puntos de corte para hacer el cálculo de sensibilidad, especificidad y

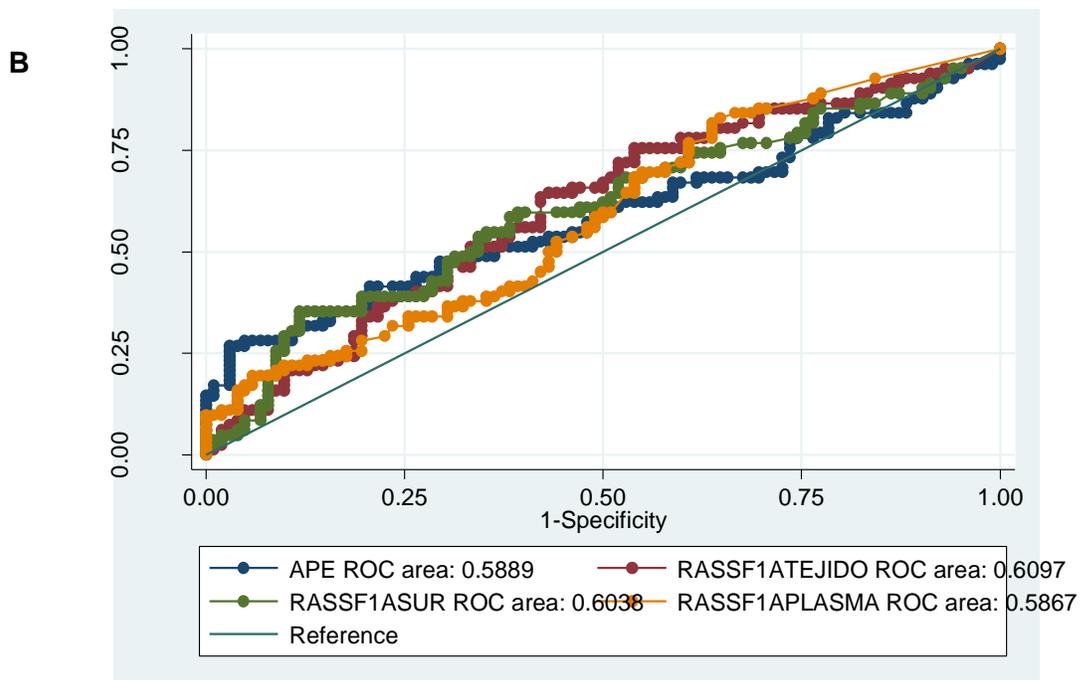
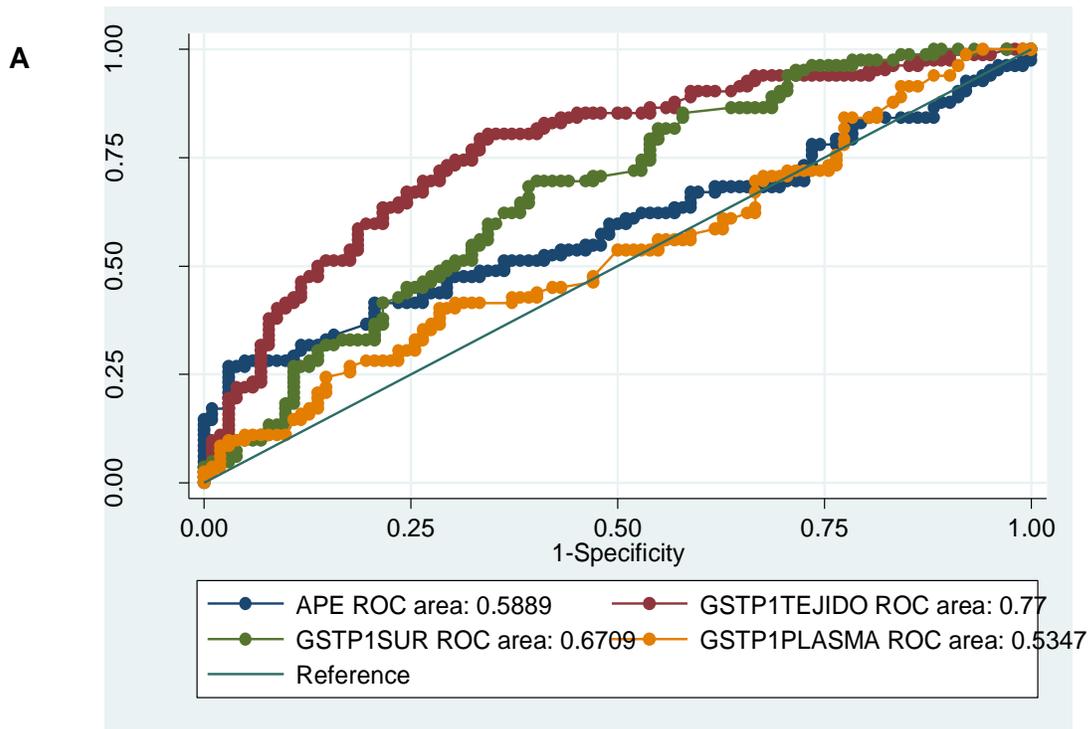


Fig 8. Curvas ROC (Reciever Operator Curve) A) Representación gráfica de la precisión diagnóstica del APE y %MP de GSTP1 en tejido, SUR y plasma B) Representación gráfica de la precisión diagnóstica del APE y el %MP de RASSF1A en tejido, SUR y plasma.

valores predictivos positivo (VPP) y negativo (VPN) niveles $\geq 10\%$ y $\geq 20\%$ de MP. La elección de dos puntos de corte se realizó en función de identificar un valor que permitiera el diagnóstico con la mejor sensibilidad y especificidad posible y que pudiera proporcionar un VPP superior al APE.

Tabla 9. Exactitud diagnóstica de APE y el %MP en *GSTP1* y *RASSF1A*

MARCADOR	ÁREA ROC	IC _{95%}
APE	0.5889	0.50298-0.67480
<i>GSTP1</i>		
Tejido	0.7700	0.70101-0.83893
SUR	0.6709	0.59368-0.74802
Plasma	0.5347	0.45000-0.61946
<i>RASSF1A</i>		
Tejido	0.6097	0.53202-0.69560
SUR	0.6038	0.52423-0.69075
Plasma	0.5867	0.50743-0.67187

Los cálculos de sensibilidad y especificidad se muestran en la Tabla 10, pudiéndose observar que para el caso del APE, niveles ≥ 4 ng/ml considerados como de riesgo en la práctica clínica muestran una sensibilidad de 93.98% pero una especificidad de 5.83%.

El análisis de *GSTP1* y *RASSF1A* en tejido prostático a niveles $\geq 10\%$ fueron los que mostraron mayor sensibilidad (62.65% y 65.06% respectivamente). Mientras que los niveles de *GSTP1* en plasma $\geq 20\%$ así como los niveles de *RASSF1A* en SUR $\geq 20\%$ fueron los que mostraron la mayor especificidad al analizarse individualmente (93.20% y 92.16% respectivamente) (Tabla 10).

Al evaluar la utilidad diagnóstica de estos marcadores en tejido prostático se observó que para un %MP > 10 de *GSTP1* y de *RASSF1A*, el valor predictivo

positivo (VPP) fue de 70.27% y 52.94% respectivamente y de 78.12% en conjunto, mientras que para un %MP>20 el VPP fue de 75.55% y 54.84% respectivamente y de 83.21% en conjunto.

Tabla 10. Valores de sensibilidad y especificidad mostradas por los marcadores estudiados en diferentes tipos de muestras biológicas.

GEN	TIPO DE MUESTRA	% DE METILACIÓN	SENSIBILIDAD	ESPECIFICIDAD
APE	Suero	>4	93.98	5.83
<i>GSTP1</i>	Tejido	≥10	62.65	78.64
	Tejido	≥20	40.96	89.32
	SUR	≥10	47.56	72.55
	SUR	≥20	26.83	88.24
	Plasma	≥10	27.71	78.64
	Plasma	≥20	10.84	93.20
<i>RASSF1A</i>	Tejido	≥10	65.06	53.40
	Tejido	≥20	40.96	72.82
	SUR	≥10	39.02	74.51
	SUR	≥20	17.07	92.16
	Plasma	≥10	32.53	74.76
	Plasma	≥20	20.48	90.29

SUR: Sedimento urinario

En esta muestra de la población el APE mostró un VPP de 46.53% a niveles ≥ 4 ng/ml y un VPP de 57.49% a niveles ≥10 ng/m (Tabla 11).

Al evaluar la utilidad diagnóstica de estos marcadores en fluidos corporales se observó que para un %MP>10 de *GSTP1* y de *RASSF1A* en SUR, el valor predictivo positivo (VPP) fue de 58.74% y 55.71% respectivamente y de 69.81% en conjunto, mientras que para un %MP>20 el VPP fue de 86.05% y 64.15% respectivamente y de 81.24% en conjunto. (Tabla 11)

En plasma, se observaron diferencias menores en cuanto al VPP teniendo un %MP>10 de *GSTP1* y *RASSF1A*, 51.11% y 50.95% respectivamente y en conjunto de 59.31%, mientras que para un %MP>20% el VPP fue de 44.38% y 62.96% respectivamente y de 74.57% en conjunto (Tabla 11)

TABLA 11. Validez diagnóstica conjunta del grado de metilación de los promotores de *GSTP1*, *RASSF1A* Y DEL APE

BIOMARCADOR	VPP EN TEJIDO	VPP EN SUR	VPP EN PLASMA	VPP EN SUERO
<i>GSTP1</i> ≥ 10%	70.27	58.74	51.11	
<i>GSTP1</i> ≥ 20%	75.55	86.05	44.38	
<i>RASSF1A</i> ≥ 10%	52.94	55.71	50.95	
<i>RASSF1A</i> ≥ 20%	54.84	64.15	62.96	
APE > 4 ng/ml				46.53
APE > 10 ng/ml				57.49
<i>GSTP1</i> ≥10 + <i>RASSF1A</i> ≥10	78.12	69.81	59.31	
<i>GSTP1</i> ≥20 + <i>RASSF1A</i> ≥20	83.21	81.24	74.57	
<i>GSTP1</i> ≥10 + <i>RASSF1A</i> ≥10+APE >4	78.09	69.77	59.27	
<i>GSTP1</i> ≥20 + <i>RASSF1A</i> ≥20+APE >4	83.18	81.21	74.53	

VPP: Valor predictivo positivo

IX. DISCUSIÓN

Un método no invasivo de presunción diagnóstica para el cáncer de próstata (CaP) es la cuantificación de niveles séricos de antígeno prostático específico (APE) cuyo valor mayor o igual a 4ng/ml puede asociarse a un proceso neoplásico, sin embargo a pesar de mostrar una sensibilidad cercana al 90% a las concentraciones mencionadas este método de detección temprana muestra con mucha frecuencia resultados falsos negativos debido a que su especificidad varía entre un 10% a un 30% (Duffy 2011; Hessels et al. 2004; Hitzeman and Molina 2011). De acuerdo con los resultados del presente estudio, en el grupo de la población mexicana estudiada los valores de APE mayores o iguales a 4ng/ml mostraron una sensibilidad de 93% pero una especificidad de solo 5.83%. Del total de pacientes con hiperplasia benigna de la próstata (HBP) el 94.17% (97/103) tuvieron niveles iguales o superiores a 4ng/ml lo que no permitió diferenciar en la mayoría de los casos a un paciente con HBP de aquellos con CaP (Tabla 5).

La baja especificidad del APE en el diagnóstico del CaP, ha motivado la búsqueda de nuevos biomarcadores que pudieran incrementar la especificidad del mismo (Hitzeman and Molina 2011). Una de las principales alteraciones moleculares con potencial diagnóstico en el CaP son las alteraciones epigenéticas, entre ellas la hipermetilación de islas CpG en los promotores de ciertos genes y se propone como uno de los eventos que caracterizan a las etapas iniciales de esta neoplasia (Kulis and Esteller 2010; Hoque 2009; Hessels et al. 2004). Además de la alta frecuencia con que se presenta en el CaP, la metilación de promotores (MP) a nivel de ADN tiene ventajas importantes para su

estudio, por ejemplo, son modificaciones estables en casi cualquier tipo de muestra (tejido fresco, tejido parafinado, fluidos corporales tales como el plasma, el suero o la orina y eyaculado) sin requerir de condiciones especiales para su colecta y/o almacenamiento (Ellinger et al. 2008; Ellinger et al. 2011). Distintos estudios han demostrado que algunos fluidos corporales tales como plasma, suero u orina pueden ser de gran utilidad para detectar estas alteraciones moleculares específicos de ciertos tipos de cáncer incluido el de próstata (Ellinger et al. 2008; Kulis and Esteller 2010). Por todos estos antecedentes, en este estudio se propuso el análisis de la metilación de los promotores de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en muestras de tejido, sedimento urinario (SUR) y plasma para evaluar su utilidad en el diagnóstico de CaP de forma individual y en conjunto con el APE. Los resultados de este estudio, muestran diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la magnitud de la MP de *GSTP1* y *RASSF1A* presente en el ADN de tejido tumoral comparado con el que se presenta en el ADN de tejido hiperplásico (Tabla 8) lo cual se confirmó al hacer el análisis de curvas ROC (Fig 8; Tabla 9). Las diferencias estadísticamente significativas se mantienen al comparar en el ADN de orina el %MP para *GSTP1* y para *RASSF1A* tanto en el ADN de sedimento urinario como en el de plasma de pacientes con CaP e HBP, lo que confirma la utilidad de este tipo de muestras en el estudio de marcadores moleculares por métodos no invasivos.

De acuerdo con los antecedentes de la literatura, la frecuencia de metilación de *GSTP1* en tejido (sensibilidad) así como la especificidad usando como punto de corte valores de metilación de 10%, resultó ser menor en la población estudiada comparada con poblaciones caucásicas donde la sensibilidad es de entre el 73-

97% con una especificidad cercana al 100% (Ahmed 2010), sin embargo para los fluidos corporales fue muy similar al rango de sensibilidad previamente reportada para otras poblaciones (Ahmed 2010).

Para los dos niveles de metilación (10% y 20%) usados como punto de corte, el VPP del %MP individual o conjunto de *GSTP1* y *RASSF1A* en tejido y SUR, fue siempre mayor al observado para APE>4ng/ml en suero y éste no incrementa el VPP si se incluye en la estimación del valor conjunto de metilación de los promotores. Esto mismo pudo observarse también en el plasma de los pacientes. Comparando nuestros resultados con estudios previos. Este estudio permitió la estandarización de ensayos de alta sensibilidad y especificidad para la cuantificación de la metilación de promotores tanto en ADN tumoral así como en fluidos corporales como plasma y orina mediante PCR en tiempo real. Estos resultados sugieren que el análisis del %MP de *GSTP1* y *RASSF1A* en el ADN de fluidos corporales, principalmente en SUR y plasma, ofrece una mayor la probabilidad de diagnosticar temprana y correctamente a un paciente con CaP y diferenciarlo de una HBP comparado con el APE.

La frecuencia de cambios epigenéticos en las regiones promotoras de *GSTP1* y *RASSF1A* en los tumores prostáticos y el hallazgo de estos mismos cambios en fluidos corporales, permitieron confirmar la importancia y factibilidad del estudio de este tipo de marcadores para su uso en el diagnóstico presuntivo del CaP por métodos no invasivos.

Dada la validez diagnóstica de estos marcadores en el análisis de ADN de SUR y plasma observada en este estudio, consideramos que el incluir la cuantificación

en ese tipo de muestras del %MP de *GSTP1* y *RASSF1A* como otra herramienta de diagnóstico en hombres a partir de la edad recomendada como de inicio del incremento del riesgo para CaP así como en los que presentan alguna enfermedad prostática benigna, contribuiría a la detección temprana de esta neoplasia.

Es posible que la aplicación de un nuevo método diagnóstico más sensible y específico que el APE, contribuya en gran medida a la disminución del gasto que implica tanto para el paciente como para las instituciones de salud el tratamiento y seguimiento de la enfermedad aún después de una prostatectomía radical pues hay que considerar que el paciente tiene que continuar con un control para evitar recidiva.

El análisis de este tipo muestras resulta interesante ya que por una parte son muestras de fácil obtención, no requieren de un proceso invasivo que pudiera complicar el estado de salud del paciente y además se ha demostrado que en pacientes con cáncer existe un incremento de más del doble en cuanto a la presencia de ácidos nucleicos circulantes comparado con individuos sanos; específicamente en el caso del ADN en plasma, en un individuo sano es posible encontrar de 2-30ng/ml mientras que en pacientes con cáncer es posible encontrar hasta 1 microgramo de ADN por cada ml de plasma (Vlassov, Laktionov, and Rykova 2007). Actualmente estas alteraciones en la MP, pueden ser analizadas por diversos tipos de técnicas como aquellas basadas en la amplificación por PCR de tiempo real, lo que hace posible su detección con una sensibilidad un evento de metilación aberrante en 1 de 10 000 células (Hoque 2009). Como técnica de análisis molecular se empleó la PCR de tiempo real para

la cuantificación de secuencias metiladas mediante el uso de SYBR green empleando ADN tratado previamente con bisulfito de sodio (Bastian et al. 2005). El tratamiento del ADN con bisulfito de sodio convierte las citosinas no metiladas en uracilos mientras que las citosinas metiladas permanecen como citosinas. La PCR-metilación específica empleando primers que reconozcan secuencias que sufren dichos cambios, ha permitido el análisis de cambios en la metilación de regiones promotoras del genoma. Varias son las ventajas descritas para esta metodología, es un ensayo rápido para el análisis de un número considerable de muestras, de interpretación sencilla y permite el análisis cuantitativo del número de copias metiladas con alta sensibilidad en ADN de diferentes tipos de tumores (Hoque 2009; Fackler et al. 2004; Fruhwald and Plass 2002; Bastian et al. 2005). Por estas características este tipo de tecnología podría ser implementada en centros de referencia, donde puedan coordinarse protocolos de tamizaje en población en riesgo usando métodos sensibles y específicos de bajo costo.

X. CONCLUSIONES

1. Este estudio demuestra que las alteraciones en la metilación son frecuentes en el cáncer de próstata de una muestra de la población mexicana.
2. Los resultados de este protocolo ofrecen la posibilidad de incluir en la práctica clínica el uso de dos marcadores moleculares que pueden contribuir a mejorar los valores de sensibilidad, especificidad y valores predictivos positivo y negativo del antígeno prostático específico.
3. Es posible que el estudio de otros marcadores podrían incrementar la precisión diagnóstica y minimizar el número de biopsias de próstata necesarias para el diagnóstico
4. El desarrollo de este tipo de marcadores moleculares, podría identificar a aquellos individuos asintomáticos que podrían en un futuro desarrollar esta patología.
5. Es posible que en algún momento este tipo de marcadores podrían tener algún beneficio como marcadores pronóstico de respuesta terapéutica y contribuir además en el análisis pronóstico de progresión clínica de la enfermedad o para el estudio de la sobrevida del paciente.
6. Por otra parte los resultados de este estudio confirman la utilidad de las muestras de plasma y sedimento urinario como una opción en la búsqueda alteraciones epigenéticas por métodos no invasivos.
7. Es importante tomar en cuenta que de acuerdo con datos de la SSA, es probable aumentar hasta tres años más la sobrevida en las personas con cáncer de próstata detectado tempranamente comparada con aquellas cuya detección fue en un estadio avanzado de la enfermedad. Por lo que los resultados de este

estudio podrían contribuir a generar nuevas opciones para la prevención del CaP y atención oportuna así como para la promoción de salud por medio de campañas de sensibilización dirigidas a vencer la resistencia de los hombres a realizarse exámenes médicos periódicos no aceptados por una gran proporción de la población masculina ofreciéndoles alternativas de diagnóstico no invasivo y confiable.

XI. ANEXOS

ANEXO 1

Sistema TNM de clasificación de Cáncer de Próstata y calificación histopronóstica de Gleason

1. La Clasificación sólo se aplica a los adenocarcinomas.
2. El carcinoma de células transicionales de la próstata se clasifica como un tumor uretral.
3. Debe existir confirmación histológica de la enfermedad.

Los procedimientos para valorar la Clasificación T, N y M son:

Categoría T: Exploración física, técnicas de imagen, endoscopia, biopsia y test bioquímicos.

Categoría N: Exploración física y técnicas de imagen.

Categoría M: Exploración física, técnicas de imagen, estudios esqueléticos y test bioquímicos.

Los ganglios linfáticos regionales son los ganglios de la pelvis menor que, fundamentalmente, son los ganglios ilio pélvicos localizados por debajo de la bifurcación de las arterias ilíacas primitiva

La lateralidad no afecta a las categorías N.

T: Tumor primario N: Ganglios linfáticos regionales M: Metástasis a distancia

Tx No se puede evaluar el tumor primario.

T0 No hay evidencia de tumor primario.

T1 Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen.

T1a Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión menor o igual al 5% del tejido resecado.

T1b Tumor detectado como hallazgo fortuito en una extensión mayor del 5% del tejido resecado.

T1c Tumor identificado mediante punción biopsica (por ejemplo a consecuencia de un APE elevado).

T2 Tumor limitado a la próstata.

T2a El tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos.

T2b El tumor abarca más de la mitad de un lóbulo pero no ambos lóbulos.

T2c El tumor abarca ambos lóbulos.

T3 Tumor que se extiende a través de la cápsula prostática.

T3a Extensión extracapsular unilateral o bilateral.

T3b Tumor que invade la/s vesícula/s seminal/es.

T4 Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales: cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica.

Nx No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales

N0 No se demuestran metástasis ganglionares regionales

N1 Metástasis ganglios linfáticos regionales.

Mx No se pueden evaluar las metástasis a distancia.

M0 No hay metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia

M1a Ganglio/s linfático/s no regionales.

M1b Hueso/s

M1c Otra/s localización/es

Clasificación anatomopatológica pTNM

Las categorías pT, pN y pM se corresponden con las categorías T, N y M

No hay categoría pT1 porque el tejido es insuficiente para valorar la categoría pT más alta.

Grado histopatológico

GX No se puede evaluar el grado de diferenciación

G1 Bien diferenciado (anaplasia débil) (Gleason 2-4)

G2 Moderadamente diferenciado (anaplasia moderada) (Gleason 5-6)

G3-4 Pobremente diferenciado/indiferenciado (marcada anaplasia) (Gleason 7-

10)

ANEXO 2

Hoja de informe al paciente

El cáncer de próstata, es el resultado de la interacción de factores genéticos y ambientales que favorecen la formación de tumores. En las primeras etapas de la enfermedad, el cáncer se limita a la próstata y puede erradicarse evitando la propagación y consecuente muerte del paciente, por ello la importancia de las acciones de detección muy temprana para prevenir la progresión de la enfermedad, así como para determinar un riesgo aumentado y la detección de los primeros signos de cambio de una lesión premaligna a su transformación cancerosa. El protocolo titulado **“USO DE MARCADORES EPIGENÉTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA POR MÉTODOS NO INVASIVOS”**, es un proyecto de investigación médica cuyo objetivo es analizar algunos genes que permitan la detección temprana, evaluar el pronóstico y contribuir al seguimiento del cáncer de próstata a través de métodos no invasivos. Para ello necesitamos su consentimiento por escrito para proporcionarnos información sobre sus antecedentes clínicos, la frecuencia de consumo de alimentos, una muestra de orina además de extraerle aproximadamente 15 ml de sangre venosa y su aprobación para disponer de un segmento de la pieza tumoral o de hiperplasia benigna que le será extraído cuando lo determine su médico tratante. Con dicho material podremos determinar la presencia alteraciones a nivel molecular en genes relacionados al desarrollo y gravedad del cáncer de próstata. Ninguno de estos procedimientos ponen en peligro su salud y los análisis realizados en este estudio no tendrán costo para usted. Su participación es confidencial y voluntaria, por lo que puede negarse a participar en cualquier momento, lo que no repercutirá en su tratamiento y seguimiento en el Instituto.

Esperamos que los resultados obtenidos en esta investigación permitan establecer un método de diagnóstico y pronóstico altamente sensible y específico que permitan la detección temprana del cáncer de próstata y que además permita identificar oportunamente aquellos pacientes que tienen mayor riesgo de desarrollar formas más agresivas de la enfermedad.

ANEXO 3

Carta de consentimiento informado.

Por este medio expreso que se me ha invitado a participar en el protocolo de investigación titulado: **“USO DE MARCADORES EPIGENÉTICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER DE PRÓSTATA POR MÉTODOS NO INVASIVOS.”** Se me ha explicado en forma clara que en este estudio se investigará la presencia de alteraciones genéticas, metabólicas y nutricionales que permitan establecer un método de diagnóstico y pronóstico para el cáncer de próstata. Estoy de acuerdo en proporcionar la información sobre mis antecedentes clínicos, mis hábitos alimenticios y proporcionar una muestra de orina y aproximadamente 15 ml de sangre venosa además de que podrán disponer de las muestras tumorales que me serán extraídas quirúrgicamente pues soy consciente de que ninguno de estos procedimientos ponen en peligro mi vida o mi salud.

Se me ha informado cual es el objetivo de este estudio y que toda la información obtenida en este estudio será confidencial y sólo podrá ser utilizada para fines de investigación, manteniéndose mi identidad en el anonimato, excepto para mi médico tratante si el resultado es de beneficio para mi tratamiento. Mi participación es voluntaria y podré negarme a participar en cualquier momento, lo que no repercutirá en mi tratamiento y seguimiento en el Instituto.

De acuerdo a lo anterior y en pleno uso de mis facultades mentales, acepto participar en este proyecto de investigación.

Paciente

Médico informante

Testigo

México, D.F. a _____ de _____ del año 200__.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Abate-Shen, C., and M. M. Shen. 2000. Molecular genetics of prostate cancer. *Genes Dev* 14 (19):2410-34.
- Abdel-Wahab, May, and Orlando E. Silva. 2008. *Prostate cancer : a practical guide*. Edinburgh ; New York: Elsevier/Saunders.
- Adami, H. O., H. Kuper, S. O. Andersson, R. Bergstrom, and J. Dillner. 2003. Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: a population-based case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12 (9):872-5.
- Agnihotri, S., R. D. Mittal, S. Ahmad, and A. Mandhani. 2014. Free to total serum prostate specific antigen ratio in symptomatic men does not help in differentiating benign from malignant disease of the prostate. *Indian J Urol* 30 (1):28-32.
- Ahmed, H. 2010. Promoter Methylation in Prostate Cancer and its Application for the Early Detection of Prostate Cancer Using Serum and Urine Samples. *Biomark Cancer* 2010 (2):17-33.
- Andriole, G. L. 2009. Prostate cancer risk: overview of the disease, predictive factors, and potential targets for risk reduction. Introduction. *Urology* 73 (5 Suppl):S1-3.
- Barry, S. A., M. C. Tammemagi, S. Penek, E. C. Kassan, C. S. Dorfman, T. L. Riley, J. Commin, and K. L. Taylor. 2012. Predictors of adverse smoking outcomes in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial. *J Natl Cancer Inst* 104 (21):1647-59.
- Bartova, E., J. Krejci, R. Hajek, A. Harnicarova, and S. Kozubek. 2009. Chromatin structure and epigenetics of tumour cells: a review. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 9 (1):51-61.
- Bastian, P. J., J. Ellinger, A. Wellmann, N. Wernert, L. C. Heukamp, S. C. Muller, and A. von Ruecker. 2005. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* 11 (11):4097-106.
- Baylin, S. B., M. Esteller, M. R. Rountree, K. E. Bachman, K. Schuebel, and J. G. Herman. 2001. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10 (7):687-92.
- Blair, A., S. H. Zahm, N. E. Pearce, E. F. Heineman, and J. F. Fraumeni, Jr. 1992. Clues to cancer etiology from studies of farmers. *Scand J Work Environ Health* 18 (4):209-15.
- Brandt, A., J. Sundquist, and K. Hemminki. 2012. Risk for incident and fatal prostate cancer in men with a family history of any incident and fatal cancer. *Ann Oncol* 23 (1):251-6.
- Bronner, C., T. Chataigneau, V. B. Schini-Kerth, and Y. Landry. 2007. The "Epigenetic Code Replication Machinery", ECREM: a promising drugable target of the epigenetic cell memory. *Curr Med Chem* 14 (25):2629-41.
- Cairns, P., M. Esteller, J. G. Herman, M. Schoenberg, C. Jeronimo, M. Sanchez-Cespedes, N. H. Chow, M. Grasso, L. Wu, W. B. Westra, and D.

- Sidransky. 2001. Molecular detection of prostate cancer in urine by GSTP1 hypermethylation. *Clin Cancer Res* 7 (9):2727-30.
- Catalona, William J., Donald S. Coffey, James P. Karr, and Organ Systems Program (National Cancer Institute). Prostate Cancer Working Group. 1989. *Clinical aspects of prostate cancer : assessment of new diagnostic and management procedures : proceedings of a workshop of the Prostate Cancer Working Group of the National Cancer Institute's Organ Systems Program, held October 16-19, 1988, at Prout's Neck, Maine, U.S.A.* New York: Elsevier.
- Chekhun, V. F. 2008. Cancer Epigenetics. *Exp Oncol* 30 (3):170.
- De Marzo, A. M., V. L. Marchi, J. I. Epstein, and W. G. Nelson. 1999. Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis. *Am J Pathol* 155 (6):1985-92.
- De Marzo, A. M., E. A. Platz, S. Sutcliffe, J. Xu, H. Gronberg, C. G. Drake, Y. Nakai, W. B. Isaacs, and W. G. Nelson. 2007. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 7 (4):256-69.
- Delcuve, G. P., M. Rastegar, and J. R. Davie. 2009. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 219 (2):243-50.
- Duffy, M. J. 2011. Prostate-specific antigen: does the current evidence support its use in prostate cancer screening? *Ann Clin Biochem* 48 (Pt 4):310-6.
- Ellinger, J., S. C. Muller, T. C. Stadler, A. Jung, A. von Ruecker, and P. J. Bastian. 2011. The role of cell-free circulating DNA in the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Urol Oncol* 29 (2):124-9.
- Ellinger, J., A. von Rucker, N. Wernert, R. Buttner, P. J. Bastian, and S. C. Muller. 2008. [Prostate cancer research. Biomarkers as promising options for optimized diagnosis and treatment]. *Urologe A* 47 (9):1190-2.
- Ellis, L., P. W. Atadja, and R. W. Johnstone. 2009. Epigenetics in cancer: targeting chromatin modifications. *Mol Cancer Ther* 8 (6):1409-20.
- Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R50-9.
- Fackler, M. J., M. McVeigh, J. Mehrotra, M. A. Blum, J. Lange, A. Lapidus, E. Garrett, P. Argani, and S. Sukumar. 2004. Quantitative multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of promoter hypermethylation in multiple genes in breast cancer. *Cancer Res* 64 (13):4442-52.
- Fruhwald, M. C., and C. Plass. 2002. Global and gene-specific methylation patterns in cancer: aspects of tumor biology and clinical potential. *Mol Genet Metab* 75 (1):1-16.
- Frumkin, H. 2003. Agent Orange and cancer: an overview for clinicians. *CA Cancer J Clin* 53 (4):245-55.
- Giovannucci, E., E. B. Rimm, A. Ascherio, G. A. Colditz, D. Spiegelman, M. J. Stampfer, and W. C. Willett. 1999. Smoking and risk of total and fatal prostate cancer in United States health professionals. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 8 (4 Pt 1):277-82.
- Glare, Paul, and Nicholas A. Christakis. 2008. *Prognosis in advanced cancer.* Oxford ; New York: Oxford University Press.

- Gleason, D. F. 1992. Histologic grading of prostate cancer: a perspective. *Hum Pathol* 23 (3):273-9.
- Goessl, C., H. Krause, M. Muller, R. Heicappell, M. Schrader, J. Sachsinger, and K. Miller. 2000. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 60 (21):5941-5.
- Goessl, C., M. Muller, R. Heicappell, H. Krause, B. Straub, M. Schrader, and K. Miller. 2001. DNA-based detection of prostate cancer in urine after prostatic massage. *Urology* 58 (3):335-8.
- Gonzalzo, M. L., C. P. Pavlovich, S. M. Lee, and W. G. Nelson. 2003. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res* 9 (7):2673-7.
- Gronbaek, K., C. Hother, and P. A. Jones. 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 115 (10):1039-59.
- Groom, H. C., A. Y. Warren, D. E. Neal, and K. N. Bishop. 2012. No evidence for infection of UK prostate cancer patients with XMRV, BK virus, *Trichomonas vaginalis* or human papilloma viruses. *PLoS One* 7 (3):e34221.
- Hanley, B., J. Dijane, M. Fewtrell, A. Grynberg, S. Hummel, C. Junien, B. Koletzko, S. Lewis, H. Renz, M. Symonds, M. Gros, L. Harthoorn, K. Mace, F. Samuels, and E. M. van Der Beek. 2010. Metabolic imprinting, programming and epigenetics - a review of present priorities and future opportunities. *Br J Nutr* 104 Suppl 1:S1-25.
- Harden, S. V., Z. Guo, J. I. Epstein, and D. Sidransky. 2003. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 169 (3):1138-42.
- Harden, S. V., H. Sanderson, S. N. Goodman, A. A. Partin, P. C. Walsh, J. I. Epstein, and D. Sidransky. 2003. Quantitative GSTP1 methylation and the detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 95 (21):1634-7.
- Hayen, A., D. P. Smith, M. I. Patel, and D. L. O'Connell. 2008. Patterns of surgical care for prostate cancer in NSW, 1993-2002: rural/urban and socio-economic variation. *Aust N Z J Public Health* 32 (5):417-20.
- Hemminki, K., and K. Czene. 2002. Attributable risks of familial cancer from the Family-Cancer Database. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (12):1638-44.
- Hessels, D., M. P. van Gils, O. van Hooij, S. A. Jannink, J. A. Witjes, G. W. Verhaegh, and J. A. Schalken. 2010. Predictive value of PCA3 in urinary sediments in determining clinico-pathological characteristics of prostate cancer. *Prostate* 70 (1):10-6.
- Hessels, D., G. W. Verhaegh, J. A. Schalken, and J. A. Witjes. 2004. Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 4 (4):513-26.
- Hitzeman, N., and M. Molina. 2011. Screening for prostate cancer: prostate-specific antigen testing is not effective. *Am Fam Physician* 83 (7):802-4.

- Hoffman, R. M., D. L. Clanon, M. Chavez, and J. C. Peirce. 2002. Using multiple cutpoints for the free-to-total prostate specific antigen ratio improves the accuracy of prostate cancer detection. *Prostate* 52 (2):150-8.
- Hoque, M. O. 2009. DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation. *Expert Rev Mol Diagn* 9 (3):243-57.
- Howlander N, Noone A, Krapcho M, Neyman N, Aminou R et al. 2011. *SEER Cancer Statistics Review 1975–2008*, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2011 [cited 2011]. Available from http://www.seer.cancer.gov/csr/1975_2008/.
- Huncharek, M., K. S. Haddock, R. Reid, and B. Kupelnick. 2010. Smoking as a risk factor for prostate cancer: a meta-analysis of 24 prospective cohort studies. *Am J Public Health* 100 (4):693-701.
- INEGI. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. Instituto Nacional de Geografía e Informática 2008 [cited. Available from <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&ep=50>].
- Jeronimo, C., H. Usadel, R. Henrique, J. Oliveira, C. Lopes, W. G. Nelson, and D. Sidransky. 2001. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93 (22):1747-52.
- Kawachi, M. H., R. R. Bahnson, M. Barry, P. R. Carroll, H. B. Carter, W. J. Catalona, J. I. Epstein, R. B. Etzioni, G. P. Hemstreet, 3rd, R. J. Howe, J. D. Kopin, P. H. Lange, H. Lilja, J. Mohler, J. Moul, R. B. Nadler, S. Patterson, A. Pollack, J. C. Presti, A. M. Stroup, D. A. Urban, R. Wake, and J. T. Wei. 2007. Prostate cancer early detection. Clinical practice guidelines in oncology. *J Natl Compr Canc Netw* 5 (7):714-36.
- Kenfield, S. A., M. J. Stampfer, J. M. Chan, and E. Giovannucci. 2011. Smoking and prostate cancer survival and recurrence. *JAMA* 305 (24):2548-55.
- Kolonel, L. N., D. Altshuler, and B. E. Henderson. 2004. The multiethnic cohort study: exploring genes, lifestyle and cancer risk. *Nat Rev Cancer* 4 (7):519-27.
- Kristal, A. R., K. B. Arnold, M. L. Neuhouser, P. Goodman, E. A. Platz, D. Albanes, and I. M. Thompson. 2010. Diet, supplement use, and prostate cancer risk: results from the prostate cancer prevention trial. *Am J Epidemiol* 172 (5):566-77.
- Kulis, M., and M. Esteller. 2010. DNA methylation and cancer. *Adv Genet* 70:27-56.
- Lichtenstein, P., N. V. Holm, P. K. Verkasalo, A. Iliadou, J. Kaprio, M. Koskenvuo, E. Pukkala, A. Skytthe, and K. Hemminki. 2000. Environmental and heritable factors in the causation of cancer--analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med* 343 (2):78-85.
- Liu, L., J. H. Yoon, R. Dammann, and G. P. Pfeifer. 2002. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 21 (44):6835-40.

- Loeb, S. 2011. Use of Baseline Prostate-Specific Antigen Measurements to Personalize Prostate Cancer Screening. *Eur Urol*.
- McKenzie, P., B. Delahunt, K. deVoss, B. Ross, H. Tran, and K. Sikaris. 2011. Prostate specific antigen testing for the diagnosis of prostate cancer. *Pathology* 43 (5):403.
- McNeal, J. E. 1972. The prostate and prostatic urethra: a morphologic synthesis. *J Urol* 107 (6):1008-16.
- Meiers, I., J. H. Shanks, and D. G. Bostwick. 2007. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology* 39 (3):299-304.
- Mulero-Navarro, S., and M. Esteller. 2008. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 68 (1):1-11.
- Mungall, A. J. 2002. Meeting review: Epigenetics in Development and Disease. *Comp Funct Genomics* 3 (3):277-81.
- Munoz-Pinedo, C., E. Gonzalez-Suarez, A. Portela, A. Gentilella, and M. Esteller. 2013. Exploiting tumor vulnerabilities: epigenetics, cancer metabolism and the mTOR pathway in the era of personalized medicine. *Cancer Res* 73 (14):4185-9.
- National Cancer Institute (U.S.). 2004. *Prostate cancer progress report : addressing the recommendations of the prostate cancer progress review group*. 1 vols. Washington, D.C.: U.S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health, National Cancer Institute.
- Pan, J., J. Chen, B. Zhang, X. Chen, B. Huang, J. Zhuang, C. Mo, and S. Qiu. 2013. Association between RASSF1A Promoter Methylation and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 8 (9):e75283.
- Powers, G. L., and P. C. Marker. 2013. Recent advances in prostate development and links to prostatic diseases. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 5 (2):243-56.
- Quinn, M., and P. Babb. 2002. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. *BJU Int* 90 (2):162-73.
- Ramon, J., and L. Denis. 2007. *Prostate cancer, Recent results in cancer research*,. Berlin ; New York: Springer.
- Sanchez-Barriga, J. J. 2013. [Mortality trends and years of potential life lost from prostate cancer in the 32 states and 7 socioeconomic regions of Mexico, 2000-2010]. *Gac Med Mex* 149 (5):576-85.
- Shappell, S. B. 2008. Clinical utility of prostate carcinoma molecular diagnostic tests. *Rev Urol* 10 (1):44-69.
- Sharma, S., T. K. Kelly, and P. A. Jones. 2010. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31 (1):27-36.
- Smith, Donald R., Emil A. Tanagho, and Jack W. McAninch. 1995. *Smith's general urology*. 14th ed. Norwalk, Conn.: Appleton & Lange.
- Suh, C. I., T. Shanafelt, D. J. May, K. R. Shroyer, J. B. Bobak, E. D. Crawford, G. J. Miller, N. Markham, and L. M. Glode. 2000. Comparison of telomerase activity and GSTP1 promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. *Mol Cell Probes* 14 (4):211-7.

- Sun, L., J. W. Moul, J. M. Hotaling, E. Rampersaud, P. Dahm, C. Robertson, N. Fitzsimons, D. Albala, and T. J. Polascik. 2007. Prostate-specific antigen (PSA) and PSA velocity for prostate cancer detection in men aged <50 years. *BJU Int* 99 (4):753-7.
- Syed, N., A. Syed Sameer, A. Hamid, Z. A. Shah, D. Afroze, R. Rasool, and M. A. Siddiqi. 2010. Promoter methylation profile of GSTP1 and RASSF1A in benign hyperplasia and metastatic prostate cancer patients in a Kashmiri population. *Mol Med Rep* 3 (5):883-7.
- Taira, A., G. Merrick, K. Wallner, and M. Dattoli. 2007. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. *Oncology (Williston Park)* 21 (8):1003-10.
- Trock, B. J., M. J. Brotzman, L. A. Mangold, J. W. Bigley, J. I. Epstein, D. McLeod, E. A. Klein, J. S. Jones, S. Wang, T. McAskill, J. Mehrotra, B. Raghavan, and A. W. Partin. 2012. Evaluation of GSTP1 and APC methylation as indicators for repeat biopsy in a high-risk cohort of men with negative initial prostate biopsies. *BJU Int* 110 (1):56-62.
- Troy, J. D., P. Hartge, J. L. Weissfeld, M. M. Oken, G. A. Colditz, L. E. Mechanic, and L. M. Morton. 2010. Associations between anthropometry, cigarette smoking, alcohol consumption, and non-Hodgkin lymphoma in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Am J Epidemiol* 171 (12):1270-81.
- Troyer, D. A., J. Mubiru, R. J. Leach, and S. L. Naylor. 2004. Promise and challenge: Markers of prostate cancer detection, diagnosis and prognosis. *Dis Markers* 20 (2):117-28.
- Van Maele-Fabry, G., V. Libotte, J. Willems, and D. Lison. 2006. Review and meta-analysis of risk estimates for prostate cancer in pesticide manufacturing workers. *Cancer Causes Control* 17 (4):353-73.
- Vlassov, V. V., P. P. Laktionov, and E. Y. Rykova. 2007. Extracellular nucleic acids. *Bioessays* 29 (7):654-67.
- Wagenlehner, F. M., J. E. Elkahwaji, F. Algaba, T. Bjerklund-Johansen, K. G. Naber, R. Hartung, and W. Weidner. 2007. The role of inflammation and infection in the pathogenesis of prostate carcinoma. *BJU Int* 100 (4):733-7.
- Wang, M. C., L. A. Valenzuela, G. P. Murphy, and T. M. Chu. 1979. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 17 (2):159-63.
- Whitesel, J. A., R. E. Donohue, J. H. Mani, S. Mohr, D. J. Scanavino, R. R. Augspurger, R. J. Biber, H. E. Fauver, J. N. Wettlaufer, and R. R. Pfister. 1984. Acid phosphatase: its influence on the management of carcinoma of the prostate. *J Urol* 131 (1):70-2.
- WHO, International Agency for Research on Cancer. 2012. Prostate Cancer Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012.
- Wu, T., E. Giovannucci, J. Welge, P. Mallick, W. Y. Tang, and S. M. Ho. 2011. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. *Br J Cancer* 105 (1):65-73.
- Yano, S., H. Matsuyama, K. Matsuda, H. Matsumoto, S. Yoshihiro, and K. Naito. 2004. Accuracy of an array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with

conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer.
Cancer Genet Cytogenet 150 (2):122-7.