



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DEL MONOETILHEXIL FTALATO (MEHP) SOBRE LA EXPRESIÓN
DE SIRTUINAS EN LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE PRÓSTATA**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA
MIGUEL MORALES PACHECO

TUTOR PRINCIPAL
DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
Facultad de Química

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ELIZABETH LANGLEY MCCARRON
Instituto Nacional de Cancerología

DR. MAURICIO RODRÍGUEZ DORANTES
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad de México. Enero, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Morales Pacheco Miguel
Estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas
Presente

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del 18 de octubre del presente año, conocieron su solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestría en Ciencias**, con la réplica de la tesis "**Efecto de Monoetilhexil ftalato (MEHP) sobre la expresión de sirtuinas en líneas celulares de cáncer de próstata**", dirigida por el Dr. **Cerbón Cervantes Marco Antonio**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado integrado por los doctores:

PRESIDENTE	Ángel Alfonso Zarain Herzberg
VOCAL	Mirelle Vanessa González Covarrubias
VOCAL	María Cristina Regina Fernández Mejía
VOCAL	Greco Hernández Ramírez
SECRETARIO	Ana María Salazar Martínez

A LOS MIEMBROS DEL JURADO:

Es obligación de los tutores de este programa participar en éstas y otras actividades académicas encomendadas por nuestro Comité Académico. Sin embargo, en caso de que tenga un impedimento académico o de salud para cumplir con esta encomienda, es muy importante contar con su respuesta (Formato anexo) en un plazo no mayor a una semana.

Tome en cuenta que usted tiene **20(Maestría)** días hábiles para emitir su voto con las rondas de revisión que considere necesarias.

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA, HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de octubre de 2021
COORDINADORA



Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas UNAM

A la Facultad de Química UNAM

Al Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)

Índice

Resumen	1
Abstract	2
1. Disruptores endocrinos	3
1.1 Sistema endocrino.....	3
1.2 Químicos disruptores endocrinos.....	3
1.3 Ftalatos.....	5
1.3.1 Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)	6
1.3.2 Mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP)	8
1.3.2.1 Mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP) y cáncer	9
2. Cáncer de próstata	11
2.1 Cáncer	11
2.2 Epidemiología.....	11
2.3 Historia natural de la enfermedad	12
2.4 Etiología y factores de riesgo.....	15
2.5 Diagnóstico.....	17
2.6 Clasificación	19
2.7 Tratamiento	21
3. Epigenética y cáncer	23
3.1 Modificación de histonas	24
3.1.1 Desacetilación de histonas.....	25
3.2 Sirtuinas	25
3.2.1 SIRT1 y cáncer.....	27
3.2.2 SIRT1 Promotor tumoral en cáncer de próstata	27
3.2.3 SIRT1 Supresor tumoral en cáncer de próstata.....	31
3.3 MEHP y sirtuinas.....	34
4. Planteamiento del problema y justificación	36
5. Pregunta de investigación	36
6. Hipótesis	36
7. Objetivo general	37
7.1 Objetivos específicos	37
8. Material y métodos	38
9. Resultados	45
10. Discusión	58
11. Conclusiones	62
12. Perspectivas	62
13. Referencias	63

Resumen

El incremento en la incidencia y prevalencia de algunos tipos de cáncer regulados por hormonas, incluido el de próstata se ha asociado al aumento en la utilización y exposición a químicos disruptores endocrinos. Algunos de los químicos disruptores endocrinos más frecuentes provienen de una familia química conocida como ftalatos. El di(2-etilhexil) ftalato (DEHP) es el plastificante más ampliamente utilizado a nivel mundial, siendo el mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP) su metabolito principal, al cual se le atribuyen las propiedades nocivas para la salud. Debido a la ubicuidad de los ftalatos, la población humana está altamente expuesta a estos compuestos y sus concentraciones han aumentado en los biofluidos. Evidencia reciente destaca una relación entre la exposición a MEHP y la alteración en la expresión de los reguladores epigenéticos denominados sirtuinas, sin embargo, este efecto no ha sido caracterizado en el cáncer de próstata. Las sirtuinas conforman la familia de desacetilasas de histonas de clase III dependientes de NAD⁺. La sirtuina 1 (SIRT1) es la sirtuina más ampliamente estudiada en el contexto del cáncer. SIRT1 tiene una expresión diferencial en diversos tipos de cáncer, donde muestra propiedades oncogénicas y supresoras de tumores según el contexto celular.

En este estudio evaluamos el efecto de MEHP sobre la expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata, así como el efecto sobre la progresión de la enfermedad. La exposición a MEHP promovió la expresión génica de SIRT1, sin embargo, la expresión proteica no se modificó. Posteriormente se evaluó el efecto de MEHP sobre la proliferación y migración celular a diferentes dosis y tiempo de exposición. La exposición a MEHP no mostró efectos significativos sobre la migración celular, mientras que la proliferación celular disminuyó en células PC3. Este estudio demostró ser un enfoque valioso para estudiar los mecanismos moleculares de MEHP en las células de cáncer de próstata; sin embargo, aún se necesitan más investigaciones

Abstract

The increased incidence and prevalence of some hormone-regulated cancers, including prostate cancer, have been related to the augmented use of endocrine disruptor chemicals. Some of the most prevalent endocrine disruptor chemicals come from a chemical family known as phthalates. DI (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is the most widely used plasticizer worldwide, and mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) is its main metabolite, to which harmful health properties are attributed. Due to their ubiquitous nature, people are highly exposed to these compounds, therefore the concentration of these compounds in biofluids has increased. Recent evidence indicates a relationship between MEHP exposure and alteration in the expression of epigenetic regulators called sirtuins, however, this effect has not been characterized in prostate cancer. Sirtuins are NAD⁺ dependent histone deacetylases of class III. SIRT1 is the most widely studied sirtuin in the context of cancer. SIRT1 has a differential expression in various types of cancer, where it shows oncogenic and tumor suppressor properties according to the cellular context.

In this work, we evaluated the effect of MEHP on the SIRT1 expression in prostate cancer cell lines. Even though SIRT1 expression was promoted by MEHP, protein expression was not modified. Then, the effect of MEHP on cell proliferation and migration of different doses and exposure time was measured. Exposure to MEHP had no statistically significant effects on cell migration, while cell proliferation decreased in PC3 cells. This study proved to be a valuable approach to the molecular mechanisms of MEHP in prostate cancer cells, nevertheless further research is still needed.

1. Disruptores endocrinos

1.1 Sistema endocrino

El sistema endocrino está compuesto por glándulas que incluyen el hipotálamo, la glándula pituitaria, las glándulas suprarrenales, las gónadas, la glándula tiroidea, las glándulas paratiroides y el páncreas. Estas glándulas, en respuesta a estímulos específicos secretan mensajeros químicos denominados hormonas. Las hormonas son moléculas de señalización que viajan a través de la sangre hacia los tejidos y órganos distantes donde puede unirse a sus receptores ya sea en la membrana celular o en el interior de la célula. La interacción entre la hormona y su receptor desencadena una cascada de reacciones bioquímicas en los órganos blanco. A través de este mecanismo, el sistema endocrino regula el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo sexual (Hiller-Sturmhöfel & Bartke, 1998; Watamura, 2008). Sin embargo, la acción del sistema endocrino puede ser alterado por sustancias químicas del entorno que imitan o bloquean las funciones endocrinas.

1.2 Químicos disruptores endocrinos

Se denomina químicos disruptores endocrinos a las sustancias o mezclas exógenas que alteran las funciones del sistema endocrino y causan efectos nocivos en la salud (International Programme on Chemical Safety, 2002). Los químicos disruptores endocrinos en función de sus características, pueden interferir en la regulación y acción del sistema endocrino a través de uno o varios mecanismos. Además, algunos químicos disruptores endocrinos pueden compartir mecanismos de acción, por ello recientemente se describieron sus características clave (La Merrill et al., 2019).

Los químicos disruptores endocrinos pueden:

1. Interactuar con los receptores hormonales y causar agonismo.
2. Antagonizar los receptores hormonales.
3. Alterar la expresión de los receptores hormonales

4. Alterar la transducción de señales (incluidos cambios en la expresión de RNA o proteínas, modificaciones postraduccionales y / o flujo de iones) en células que responden a hormonas.
5. Inducir modificaciones epigenéticas en células productoras de hormonas o que responden a hormonas (modificaciones de cromatina, metilación del DNA y expresión de RNA no codificante).
6. Alterar la síntesis de hormonas.
7. Alterar el transporte de hormonas a través de las membranas celulares.
8. Modificar la distribución o los niveles hormonales circulantes.
9. Alterar el metabolismo o el aclaramiento hormonal (inactivación, descomposición, reciclaje, depuración, excreción o eliminación de hormonas).
10. Alterar el destino de las células productoras de hormonas o que responden a las hormonas (atrofia, hiperplasia, hipertrofia, diferenciación, migración, proliferación o apoptosis).

Los químicos disruptores endocrinos pueden ser de origen natural o sintético, dentro de los químicos disruptores endocrinos naturales se encuentran los fitoestrógenos. Los químicos disruptores endocrinos sintéticos incluyen los pesticidas y herbicidas (dicloro-difenil-tricloroetano, DDT), fungicidas (vinclozolin), disolventes o lubricantes industriales (bifenilos policlorados, bifenilos polibromados, dioxinas), agentes farmacéuticos (dietilestilbestrol), componentes de cosméticos (parabenos) y componentes de plásticos (bisfenol, ftalatos) (C. Frye et al., 2012; Monneret, 2017).

Entre los efectos sobre la salud, la exposición a químicos disruptores endocrinos se ha relacionado con enfermedades crónicas como la obesidad, diabetes y el síndrome metabólico, además de alteraciones en el desarrollo y función reproductiva, alteraciones en el sistema neuroendocrino y tiroides, así como en el desarrollo y progresión del cáncer (Diamanti-Kandarakis et al., 2009).

1.3 Ftalatos

Los ftalatos son ésteres del ácido 1,2-bencenodicarboxílico (ácido ftálico) y son utilizados principalmente en la fabricación de plásticos (Oliver et al., 2005). Los ftalatos más comunes engloban al ftalato de dibutilo (DBP), el ftalato de dimetilo (DMP) y el di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) (Oliver et al., 2005).

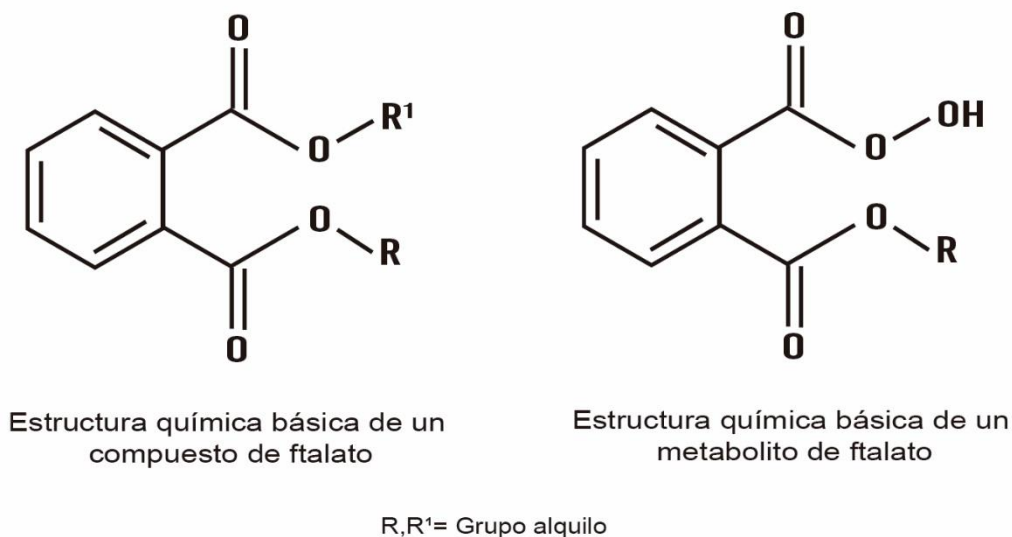


Figura 1. Estructura química básica de un compuesto de ftalato y su metabolito.

Modificado de (Jaakkola & Knight, 2008).

Su uso como plastificantes se remonta al año 1920, donde se utilizaron como aditivos del cloruro de polivinilo (PVC) (Oehlmann et al., 2009). Para la década de 1990 se estima que la producción mundial de ftalatos fue de 2.7 millones de toneladas métricas por año (Bauer & Herrmann, 1997), mientras que para el año 2006 la producción mundial fue de 4.7 millones de toneladas métricas y aproximadamente 8 millones de toneladas métricas en el año 2015 (Y. Wang et al., 2019). De estos, el ftalato más utilizado es el DEHP, con un consumo global aproximado de 3 millones de toneladas métricas entre el año 2012 y 2018 (Encarnação et al., 2019).

La exposición a ftalatos en humanos se da a través de la ingestión dietética, inhalación y contacto dérmico, así como por vía parenteral debido al uso de éstos en dispositivos médicos (Hauser et al., 2004; Yaghjyan et al., 2016). Estos compuestos tienen semivida biológica corta de aproximadamente 6-12 horas, se metabolizan rápidamente, no se bioacumulan y se excretan rápidamente en la orina; no obstante, la exposición frecuente puede dar como resultado niveles de estado semi-estacionario. Después de la exposición y absorción de los ftalatos de diéster, éstos se metabolizan a metabolitos de monoéster, los cuales pueden ser medidos en orina (Figura 1) (Duty et al., 2005).

Diversos estudios han evaluado el impacto de los ftalatos en la salud humana, reportando alteraciones en el metabolismo (Perng et al., 2017), desarrollo de diabetes (Radke et al., 2019), alteraciones en la función reproductiva femenina (Hlisníková et al., 2020) y masculina (Radke et al., 2018) entre otros. En México se ha reportado la presencia de ftalatos en productos alimenticios, así como en recipientes utilizados para la alimentación (González-Castro et al., 2011), además de encontrarse altos niveles de exposición a estos compuestos, medido por concentraciones urinarias (Martínez-Ibarra et al., 2019).

1.3.1 Di (2-etilhexil) ftalato (DEHP)

El di (2-etilhexil) ftalato (DEHP) es el ftalato más ampliamente utilizado a nivel mundial. El DEHP consta de un par de ésteres de ocho carbonos unidos a un anillo de ácido bencenodicarboxílico con un peso molecular igual a 390.56 g/mol y una fórmula química de $C_{24}H_{38}O_4$ (National Center for Biotechnology Information, 2021). El DEHP es un líquido incoloro, viscoso y lipofílico que brinda flexibilidad a los plásticos. Es utilizado en la fabricación de calzado, bolsas plásticas, cosméticos, juguetes, materiales de embalaje, cables, muebles y pisos de PVC, así mismo, es ampliamente utilizado en dispositivos médicos como catéteres, tubos de infusión, bolsas de sangre, bolsas de diálisis y bolsas para nutrición enteral (Sampson & Korte, 2011). Por lo tanto, la población que está en contacto con dispositivos

médicos que contienen PVC tienen mayor exposición a DEHP que la población en general. Específicamente pacientes expuestos a procedimientos médicos como hemodiálisis, diálisis peritoneal, oxigenación extracorpórea, transfusión sanguínea, nutrición parenteral y enteral parecen tener mayor exposición a los ftalatos; el grado de exposición depende de la frecuencia y duración de los procedimientos, así como del tipo de dispositivos a usar (Testai et al., 2016). Además, los ftalatos no están unidos covalentemente a la matriz polimérica y en consecuencia pueden liberarse fácilmente de las cadenas de polímeros hacia el entorno circundante (Figura 2) (Encarnação et al., 2019). Debido a este fenómeno, más el uso excesivo en gran cantidad de productos, es frecuente encontrar estos compuestos o sus metabolitos en el aire, agua y suelo (Rowdhwal & Chen, 2018).

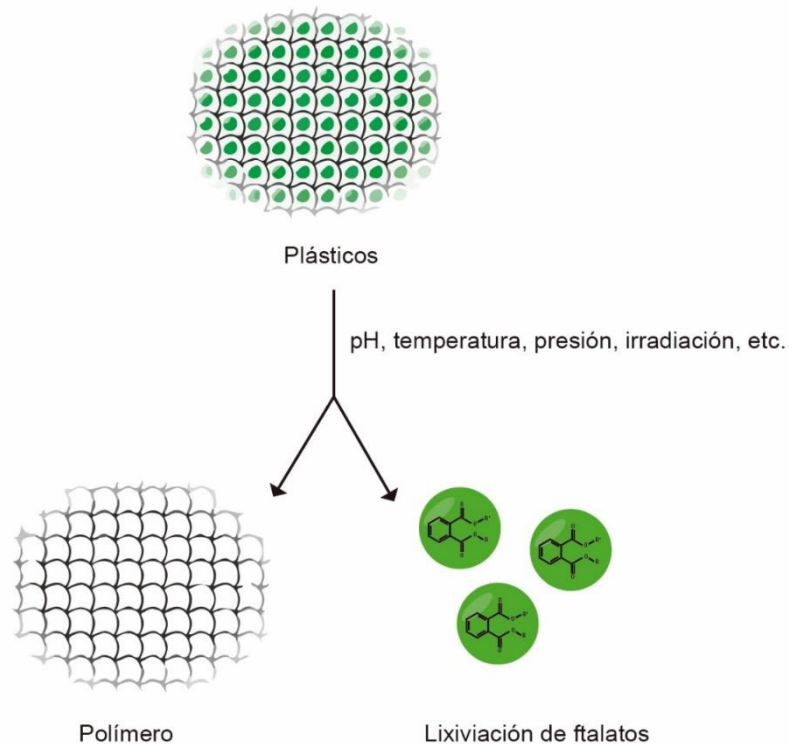


Figura 2. Migración de ftalatos al medio ambiente desde los plásticos.

Modificado de (Benjamin et al., 2017).

1.3.2 Mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP)

El mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP), es el principal metabolito del DEHP. El MEHP es un éster de ocho carbonos unido a un anillo de ácido bencenodcarboxílico con un peso molecular de 278.34 g/mol y una fórmula química de $C_{16}H_{22}O_4$ (Jaakkola & Knight, 2008). Una vez que el DEHP es absorbido a través de la ingestión, inhalación y/o contacto dérmico, el DEHP se hidroliza a su metabolito MEHP, a quien se le atribuyen las propiedades tóxicas de este ftalato y en 2-etilhexanol (2-EH) por acción catalítica de la lipasa. Esta enzima se encuentra en la mayoría de los tejidos, predominando en el jugo pancreático, mucosa intestinal, hígado y pulmón. Posteriormente, el MEHP se oxida por varios citocromos P450 (CYP), seguido de alcohol deshidrogenasa (ADH) o aldehído deshidrogenasa (ALDH), para producir ácido dicarboxílico o cetonas. El MEHP restante se excreta directamente o en forma de conjugación por acción de la UDP-glucuroniltransferasa (UGT) (Albro & Lavenhar, 1989; Hopf et al., 2014; Ito et al., 2014). El DEHP y sus metabolitos se excretan principalmente por la orina y en menor medida en las heces (por medio de la excreción biliar y de la fracción no metabolizada y/o absorbida) (Figura 3) (Rusyn et al., 2006). Estos compuestos tienen una vida media corta y no se acumulan en el cuerpo humano. No obstante, debido a la ubicuidad de estos compuestos, existe una exposición continua en la población humana (Araki & Jensen, 2020; Sharma et al., 2018). La exposición de la población humana en general al DEHP/MEHP varía de 3 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$, pero la concentración sistémica de DEHP/MEHP en pacientes bajo cuidados intensivos puede incrementarse hasta el nivel de 8.5 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ debido a la lixiviación de estos compuestos en dispositivos médicos (Y.-H. Chen et al., 2020).

Respecto a los efectos de MEHP sobre la salud humana, se ha reportado que este compuesto ocasiona alteraciones en la salud reproductiva (Chauvigné et al., 2009; L.-P. Huang et al., 2011; Kalo et al., 2019; Lambrot et al., 2009; Martínez-Razo et al., 2021), alteraciones en la síntesis y señalización de hormonas (Kim et al., 2019; N. Li et al., 2018; C. Zhou et al., 2019), además de que pueden promover el desarrollo de dislipidemias (Akin et al., 2020) y obesidad (Hao et al., 2012; Y. ling Li

et al., 2020). Asimismo, se ha reportado una asociación entre la exposición a MEHP con el desarrollo y progresión del cáncer.

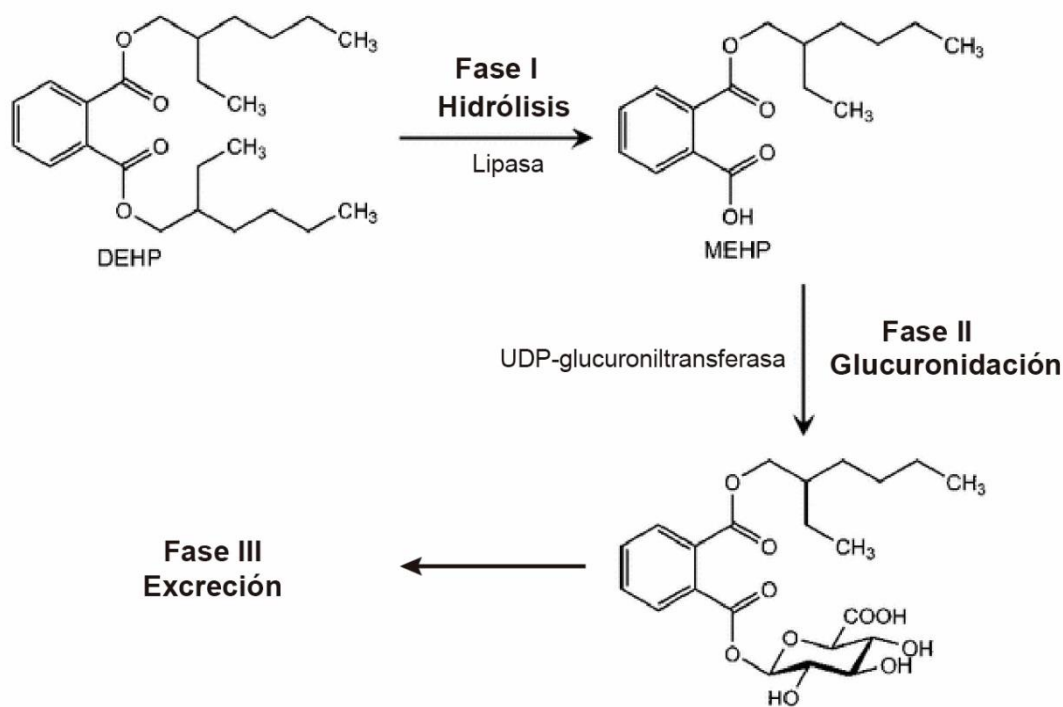


Figura 3. Metabolismo de DEHP en humanos. Modificado de (Benjamin et al., 2017).

1.3.2.1 Mono(2-etilhexil) ftalato (MEHP) y cáncer

Se ha demostrado que la exposición a MEHP puede tener un impacto en el desarrollo y progresión de diversas neoplasias. Algunos estudios *in vitro* han demostrado que MEHP puede desencadenar la proliferación del carcinoma oral de células escamosas a través del aumento de la expresión del antígeno nuclear de células proliferantes (PCNA) (M. Wang et al., 2019). El aumento de PCNA por MEHP y el consecuente aumento en la proliferación celular también fue reportado

en líneas celulares de neuroblastoma (Guo et al., 2021). En las líneas celulares de melanoma maligno WM983A y A375, se demostró que MEHP aumenta la migración e invasión celular, al promover un aumento en la expresión del factor de crecimiento transformante β (TGF- β) (Fan et al., 2020). Igualmente, MEHP promueve la migración e invasión celular en células de cáncer de mama MCF-7 al actuar como agonista del receptor de hidrocarburos de arilos (AhR), receptor implicado en la progresión tumoral (Shan et al., 2020). El MEHP también promueve la expresión de la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2), favoreciendo la migración e invasión celular en el carcinoma embrionario de testículo (P.-L. Yao et al., 2012). En cáncer de colon, MEHP también puede promover migración celular a través de la señalización de β -catenina (H.-P. Chen et al., 2018; Luo et al., 2018). Asimismo, MEHP promueve la progresión del cáncer de ovario mediante la activación de la vía PI3K / Akt / NF- κ B (Leng et al., 2021).

En el cáncer de próstata, la vía Hedgehog (Hh) tiene un papel relevante en la progresión de la enfermedad y se ha reportado que MEHP favorece la expresión de *PTCH* y *SMO* genes críticos de esta vía en líneas células de cáncer de próstata (Yong et al., 2016). Más tarde se evaluó si esta expresión de *PTCH* y *SMO* por MEHP pudiera estar relacionada por alteraciones en la metilación de sus promotores, pero MEHP no causó cambios significativos. No obstante, se demostró que MEHP causa hipometilación del DNA en una relación dosis respuesta, por lo tanto, pudiera estar alterando la expresión de otros genes y favorecer la progresión del cáncer de próstata (Hui et al., 2017). En contraste, se ha reportado que MEHP induce menor viabilidad en líneas celulares de cáncer de próstata, posiblemente por aumento en las especies reactivas de oxígeno (Erkekoğlu et al., 2011; Erkekoğlu et al., 2010).

2. Cáncer de próstata

2.1 Cáncer

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define al cáncer como un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, caracterizadas por mantener alteraciones en los mecanismos que regulan el crecimiento, proliferación y muerte celular, que a su vez pueden invadir órganos adyacentes o propagarse a otras áreas del cuerpo (Organización Mundial de la Salud, 2021). De acuerdo con Hanahan y Weinberg, los diversos tipos de cáncer comparten características que adquieren conforme progresan hacia un estado neoplásico maligno como proliferación sostenida, evasión de las señales supresoras de crecimiento, evasión del sistema inmune, inmortalidad replicativa, promoción de inflamación por el tumor, activación de la invasión y metástasis, inducción de angiogénesis, mutaciones e inestabilidad genómica, resistencia a muerte celular y desregulación del metabolismo celular (Hanahan & Weinberg, 2011).

2.2 Epidemiología

El cáncer de próstata es uno de los tipos de cáncer más comunes en todo el mundo y en los últimos años ha mostrado un importante crecimiento. Este cáncer representa la cuarta neoplasia maligna más comúnmente diagnosticada a nivel mundial y la segunda más común en hombres, además de ser una de las principales causas de mortalidad relacionadas con el cáncer (Ferlay et al., 2021).

Existen diferencias importantes en la incidencia y la mortalidad específica por cáncer de próstata entre los países desarrollados y en desarrollo. La incidencia del cáncer de próstata, probablemente reflejada por la mejora en las técnicas de diagnóstico y cribado de la patología, tiende a ser mayor en los países desarrollados de América del Norte, Europa occidental y Australia. Por el contrario, las tasas altas de mortalidad por cáncer de próstata son notoriamente más altas en el Caribe,

algunas regiones de África, partes de América del Sur y Europa del Este (International Agency for Research on Cancer, 2021).

En México, el cáncer de próstata se sitúa como la segunda neoplasia con mayor incidencia en toda la población y la primera en hombres, además de ser la segunda causa de mortalidad por cáncer en la población (International Agency for Research on Cancer, 2021). La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012, estima que para el año 2050, en México, los adultos mayores conformarán cerca del 28% de la población (Instituto Nacional de Salud Pública, 2012), lo que sitúa al cáncer de próstata como un importante reto para el Sistema Nacional de Salud.

2.3 Historia natural de la enfermedad

En la actualidad aún no se han dilucidado por completo los mecanismos específicos que conducen al desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Generalmente, el cáncer de próstata se desarrolla a partir del epitelio prostático dañado y se le considera como un adenocarcinoma (Rosenberg et al., 2010). A diferencia de otros tipos de cáncer, el cáncer de próstata regularmente se manifiesta como un tumor preclínico de progresión lenta que no exhibe manifestaciones clínicas, permaneciendo en un estado latente (Estebanez et al., 2014). La mayoría de los focos de cáncer de próstata latente pueden no experimentar eventos de activación críticos o pueden permanecer bajo supresión activa suficiente para mantener un estado subclínico. Alternativamente, el cáncer de próstata que subyace a la progresión y presentación de manifestaciones clínicas podría tener aparición desde un programa patogénico diferente al cáncer de próstata latente. Una característica importante de los tumores primarios de esta neoplasia es que a menudo contienen múltiples focos histológicos independientes y genéticamente distintos, por lo que se le considera multifocal (Abate-Shen & Shen, 2000; Testa et al., 2019).

La próstata es un órgano en el que los trastornos preneoplásicos son relativamente comunes, entre los que destacan la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA) y la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) (Rosenberg et al., 2010). Una posible ruta

de carcinogénesis de próstata apunta a que el daño al epitelio prostático por inflamación aguda o crónica puede conducir a la formación de la atrofia inflamatoria proliferativa. En condiciones fisiológicas la homeostasis del tejido prostático está controlado por señales proliferativas y antiproliferativas, pero en las lesiones de atrofia inflamatoria proliferativa este balance podría alterarse como consecuencia de los repetidos procesos de daño y reparación tisular secundarios a la acción de diversos factores tóxicos que producirían una inestabilidad celular favorecedora de la carcinogénesis (Celma et al., 2014).

Por otra parte, la neoplasia intraepitelial prostática se caracteriza por una hiperplasia dentro de los acinos prostáticos, siendo bioquímica, genética y fenotípicamente similar al cáncer de próstata, aunque carece de cualquier alteración de la membrana basal y generalmente se clasifica como bajo grado (Packer & Maitland, 2016). Debido a que la neoplasia intraepitelial prostática satisface casi todos los requisitos para una condición premaligna, el tipo de alto grado es aceptado como un precursor de cáncer de próstata (Brawer, 2005; Packer & Maitland, 2016). La transición de la neoplasia intraepitelial prostática a adenocarcinomas se caracteriza por varios cambios histológicos en las células epiteliales invasivas como morfogénesis ramificada excesiva, pérdida de la capa de células basales y atipia citológica con agrandamiento de núcleos y nucléolos (Knudseon & Vasioukhin, 2010). En síntesis, la transformación maligna de la próstata inicia como neoplasia intraepitelial prostática de alto grado, seguida de adenocarcinoma de próstata localizado, para después convertirse en carcinoma localmente invasivo a medida que se degrada la capa de células basales y las células cancerosas invaden a través de la lámina basal (G. Wang et al., 2018).

El crecimiento y la supervivencia de las células de cáncer de próstata dependen de los andrógenos, hormonas esteroides sexuales masculinas, de las cuales la testosterona y la dihidrotestosterona son los principales miembros que activan y se unen al receptor de andrógenos (Yiqiao Huang et al., 2018). Por lo que el manejo para pacientes con cáncer de próstata es la terapia de privación de andrógenos con análogos de la hormona liberadora de gonadotropina y antiandrógenos (Karantanos

et al., 2013). Sin embargo, después de aproximadamente 18 a 24 meses bajo terapia de privación de andrógenos, un alto número de pacientes progresan a un cáncer de próstata resistente a la castración (Yiqiao Huang et al., 2018; Rebello et al., 2021). El cáncer de próstata resistente a la castración se define por la progresión de la enfermedad a pesar de la terapia de privación de andrógenos y suele presentarse como un aumento continuo de los niveles séricos del antígeno prostático específico, la progresión de cáncer de próstata preexistente, y/o la aparición de nuevas metástasis (Moghadam et al., 2018). Datos indican que entre el 10 y el 20% de los pacientes con cáncer de próstata desarrollan resistencia a la castración en aproximadamente 5 años de seguimiento y al momento del diagnóstico de cáncer de próstata resistente a la castración, más del 80% de los pacientes presentan metástasis (Figura 4) (Kirby et al., 2011).

En años recientes se han mostrado avances significativos en el estudio, diagnóstico y tratamiento del cáncer, no obstante, la aparición de la enfermedad metastásica avanzada conduce a un aumento significativo de la mortalidad. La mayoría de las muertes asociadas al cáncer son causadas por enfermedad metastásica, más que por tumores primarios (Lambert et al., 2017). Aproximadamente el 80% de los pacientes diagnosticados con cáncer de próstata presentan una enfermedad localizada, mientras que el 15% presentan metástasis locorregional y el 5% metástasis a distancia, siendo estos últimos lo que tiene una supervivencia general menor de solo el 30% a los 5 años (Rebello et al., 2021). Los sitios más comunes de diseminación metastásica en cáncer de próstata incluyen los ganglios linfáticos locorregionales y tejido óseo. Aproximadamente el 90% de los pacientes que progresan a metástasis muestran evidencia de metástasis esqueléticas, siendo los sitios más comunes la pelvis, cadera y esqueleto axial. La metástasis esquelética se asocia con mayor riesgo de fractura, dolor óseo, discapacidad y supervivencia más corta (Furesi et al., 2021; Gandaglia et al., 2014). En esta etapa, todos los pacientes inevitablemente se deterioran hasta una etapa incurable.

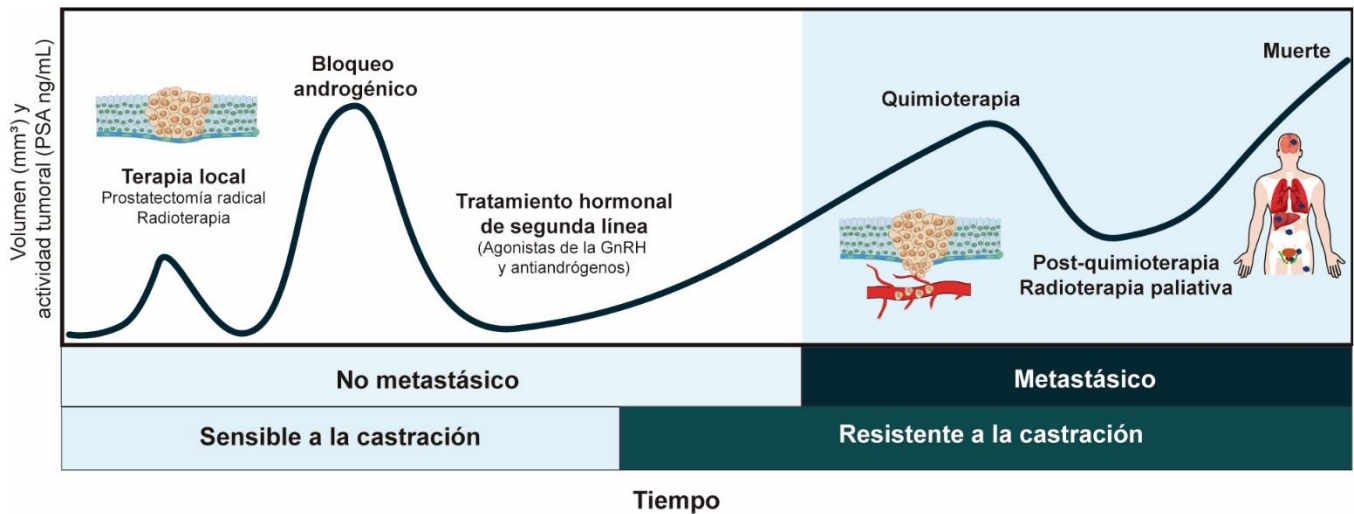


Figura 4. Historia Natural de la enfermedad. La carga tumoral, estimada por el nivel de antígeno prostático específico (PSA) a lo largo del tiempo desde el diagnóstico, aumenta en pacientes cuyo cáncer no responde a las terapias locales y sistémicas a medida que la enfermedad progresa a enfermedad metastásica. En etapas tempranas el cáncer de próstata se considera sensible a la castración, posterior a la terapia de privación de andrógenos el cáncer progresa hacia la resistencia a la castración. En etapas avanzadas el cáncer de próstata se considera incurable. Modificado de (Rebello et al., 2021).

2.4 Etiología y factores de riesgo

La etiología del cáncer de próstata es objeto de diversos estudios y sigue siendo en gran medida no completamente conocida. Se ha establecido que algunos factores de riesgo modificables y otros no modificables, pudieran contribuir al desarrollo de esta patología. Dentro de los factores de riesgo no modificables bien establecidos se incluye la edad, el origen étnico y los factores genéticos, los modificables incluyen el estilo de vida, hiperglucemia, inflamación, infecciones y exposición ambiental a productos químicos o radiación ionizante (Rawla, 2019).

A) Edad

El cáncer de próstata es la neoplasia maligna más frecuente entre hombres de edad avanzada. El diagnóstico de esta neoplasia en hombres menores de 50 años es poco frecuente, la mayoría suele diagnosticarse en hombres con edad mayor a 65 años; por lo que a mayor edad el riesgo de cáncer de próstata incrementa (Vaidyanathan et al., 2016). Además, con el aumento de la edad, los hombres tienen una probabilidad significativamente mayor de tener cáncer de próstata de alto riesgo (Bechis et al., 2011).

B) Origen Étnico

La incidencia y mortalidad por cáncer de próstata tiene una distribución desproporcionada. Los hombres afroamericanos tienen el doble de probabilidades de desarrollar o morir a causa de esta neoplasia en comparación con su contraparte caucásica (Hur & Giovannucci, 2020). Mientras que en hombres de descendencia asiática se observa una menor incidencia. Aproximadamente el 50% de los hombres asiáticos tienen tumores de cáncer de próstata latentes a los 90 años, mientras que esta misma proporción se observa en caucásicos a los 80 años y a los 60 años en hombres afrodescendientes. Asimismo, los casos de cáncer de próstata en menores de 40 años son poco frecuentes, en hombres asiáticos estos representan aproximadamente el 4%, mientras que en los afrodescendientes alrededor del 37% de los casos ya se presentan antes de los 40 años (Rebbeck, 2018; Rebbeck & Haas, 2014).

C) Factores genéticos

Estudios epidemiológicos han establecido que los antecedentes familiares de cáncer de próstata aumentan significativamente el riesgo. En consecuencia, se ha propuesto que puede existir un componente hereditario para el desarrollo de esta

neoplasia, pudiendo atribuirse hasta un 40% de los casos a factores genéticos (Perdana et al., 2016; G. Wang et al., 2018).

D) Estilo de vida

Los factores dietéticos, principalmente un alto consumo de grasas saturadas y bajos niveles de antioxidantes se han asociado con mayor riesgo para el desarrollo de cáncer de próstata (Fabiani et al., 2016; Mandair et al., 2014). En contraste, los patrones dietéticos basados en la dieta mediterránea se han asociado a menor riesgo de padecer este tipo de cáncer (Schneider et al., 2019). Asimismo, se ha establecido una asociación entre la obesidad con mayor grado de malignidad y peor pronóstico para el cáncer de próstata (Vidal et al., 2016; Y. D. Yu et al., 2018). Por otro lado, aunque no existe un mecanismo claro por el cual el tabaquismo pudiera favorecer el desarrollo de esta neoplasia, se ha reportado una asociación entre el tabaquismo con la incidencia y mortalidad para este tipo de cáncer (Huncharek et al., 2010).

2.5 Diagnóstico

Generalmente el cáncer de próstata surge en la periferia de la glándula prostática, por lo que la presentación de síntomas se observa cuando el tumor ha crecido hasta comprimir la uretra o invadir el esfínter (Hamilton & Sharp, 2004). Los síntomas incluyen alteraciones en el flujo de orina, micción frecuente, dificultad para vaciar la vejiga completamente, dolor al orinar y sangre en la orina o el semen, descritos previamente como síntomas del tracto urinario inferior y en algunos casos disfunción eréctil (Merriel et al., 2018). Por lo que el diagnóstico de cáncer de próstata puede surgir en pacientes asintomáticos después de una prueba de detección, en pacientes con síntomas del tracto urinario inferior o en pacientes con metástasis (Hamilton & Sharp, 2004).

Los métodos de diagnóstico actuales se basan principalmente en el análisis de sangre del antígeno prostático específico, complementado mediante el tacto rectal, seguido de una biopsia guiada por ecografía transversal (TRUS) (Descotes, 2019).

El antígeno prostático específico es una enzima serina proteasa que tiene la finalidad de prevenir la coagulación seminal a través de su acción catalítica y su producción es impulsada por andrógenos en el epitelio prostático. En condiciones fisiológicas el antígeno prostático específico se encuentra en mínima proporción en la sangre, sin embargo, en el cáncer de próstata debido a alteraciones en la arquitectura prostática, puede filtrarse a la circulación sistémica (Tabayoyong & Abouassaly, 2015). El antígeno prostático específico sérico total en valores superiores a 4 ng/ml puede ser indicativo de cáncer de próstata. Sin embargo, este método de detección no es lo suficientemente sensible para detectar el cáncer de próstata en estadio temprano y algunos tumores agresivos. Además, los valores anormales del antígeno prostático específico puede ser resultados falsos positivos, que pueden ser causados por hiperplasia prostática benigna (HPB), prostatitis o cistitis, así como también un valor normal del antígeno prostático específico no puede excluir el cáncer de próstata (Hippisley-Cox & Coupland, 2021). A pesar de ello, el antígeno prostático específico se sigue considerando una herramienta validada en la detección de cáncer de próstata en compañía de otras pruebas como el tacto rectal digital. El examen digital consiste en la exploración física de la próstata con la finalidad de buscar anomalías en la zona al detectar cambios en la rigidez de la próstata asociado a cáncer de próstata (Zheng, 2012). Al igual que el antígeno prostático específico, el tacto rectal digital tiene limitaciones para el diagnóstico de cáncer de próstata, sin embargo, el tacto rectal sigue siendo una indicación de biopsia de próstata independientemente del nivel del antígeno prostático específico (Descotes, 2019).

El diagnóstico de cáncer de próstata también puede apoyarse de estudios de imagen. Las imágenes de resonancia magnética multiparamétrica (mpMRI) proporcionan información no solo sobre la anatomía del tejido, sino también sobre las características del tejido, como el volumen de la próstata, celularidad y

vascularización. Este método es útil para una mejor detección de cáncer de próstata, así como para reducir el sobre diagnóstico de la enfermedad y uso de biopsias innecesarias (Ahmed et al., 2017).

Ante la sospecha de cáncer de próstata evidenciado por antígeno prostático específico elevado y tacto rectal anormal, suele realizarse biopsia en la glándula prostática. La biopsia transrectal guiada por ecografía es considerada el estándar para el diagnóstico de esta enfermedad. Con ayuda de la información reportada por imágenes de resonancia magnética, este método permite la realización de la biopsia en áreas específicamente sospechosas (Brock et al., 2015). En conjunto estas pruebas permiten establecer el diagnóstico de cáncer de próstata, el grado de tumor y pronóstico de la enfermedad (Shariat & Roehrborn, 2008).

2.6 Clasificación

El sistema de clasificación de cáncer de próstata fue desarrollado entre los años 1966 y 1974 por Donald Gleason y colaboradores (Gleason et al., 1974). A través de los años, este sistema ha sufrido algunas actualizaciones, la primera en el año 2005 y recientemente en 2014, ambas por la Sociedad Internacional de Patología Urológica (ISUP).

En general, el método consiste en clasificar los patrones histológicos por el grado de diferenciación glandular y el patrón de crecimiento del tumor en el estroma prostático. El sistema Gleason establece cinco patrones histológicos de crecimiento, Gleason 1 se asigna a un tejido mejor diferenciado y se correlaciona con un pronóstico más favorable y a medida que este avanza, el pronóstico empeora, siendo Gleason 5 la escala mayor y el menos diferenciado. En el análisis histológico frecuentemente albergan dos o más patrones de Gleason, siendo el primario el de mayor presencia al que se le suma la puntuación del patrón secundario, obteniendo el valor final denominado puntaje Gleason. En aquellos casos con un solo patrón, este se multiplica por dos para obtener el puntaje Gleason (N. Chen & Zhou, 2016).

A continuación, se expone una breve descripción para la asignación de los patrones Gleason (Humphrey, 2004).

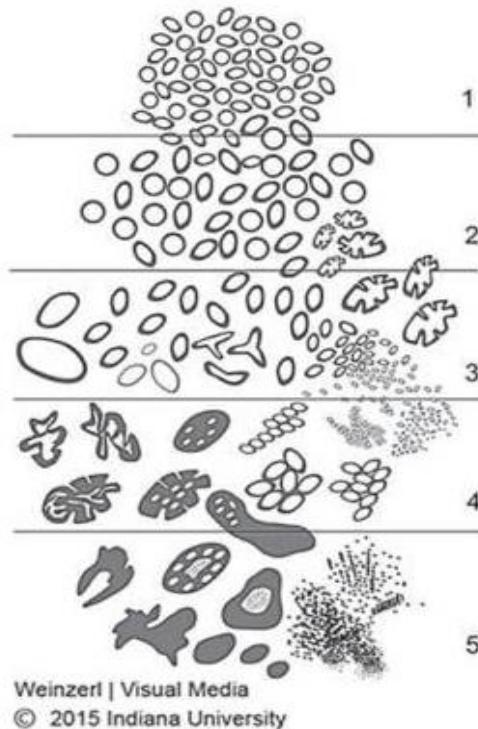


Figura 5. Esquema de clasificación de Gleason para cáncer de próstata.

- Gleason 1 es un patrón raro de crecimiento caracterizado por un crecimiento uniforme y compacto muy bien diferenciado con acinos redondos a ovalados.
- Gleason 2 es un patrón bien diferenciado que forma masas regularmente definidas y circunscritas; con un límite tumor-estroma no tan redondeado como el patrón 1.
- Gleason 3 es el patrón de crecimiento más común del adenocarcinoma de próstata. Este patrón a su vez se compone de subpatrones, 3A se caracteriza por glándulas individuales infiltrantes de tamaño mediano, de forma y espaciamiento irregular, generalmente con separación estromal amplia; 3B es prácticamente igual a 3A excepto por que las glándulas son de tamaño

menor; 3C se compone de cilindros o conductos expandidos con masas de tumor cribiforme o papilar.

- Gleason 4 es un patrón de crecimiento de carcinoma de alto grado y poco diferenciado, con masas infiltrativas desiguales. Los arreglos celulares pueden fusionarse en forma microacinar, cribiforme o papilar.
- Gleason 5 es el patrón de crecimiento menos diferenciado que se presenta en dos formas: 5A y 5B. 5A contiene masas lisas redondeadas, cordones o cilindros de carcinoma con necrosis típicamente central rodeada de masas papilares cribiformes o sólidas de carcinoma. 5B se compone de masas y láminas irregulares de células de adenocarcinoma anaplásico, con muy poca diferenciación.

Posterior a la identificación y suma de los patrones primario y secundario, se obtiene el puntaje Gleason. Aunque se puede obtener un valor entre 2 y 5, en la actualidad ya no se asignan. Según el nuevo sistema de clasificación Gleason, una puntuación 6 abarca tumores de grado 1, el puntaje 7 ($3+4=7$) es grado 2, mientras que grado 3 es para tumores con puntuación 7 ($4+3=7$), el grado 4 comprende al puntaje Gleason 8 y grado 5 son puntajes Gleason 9 o 10 (Epstein et al., 2016).

2.7 Tratamiento

El tratamiento del cáncer de próstata depende del grado del tumor, el estadio y la edad. El tratamiento puede variar desde la vigilancia activa hasta una combinación de cirugía, quimioterapia, radiación y/o terapia de privación de andrógenos. En pacientes diagnosticados con enfermedad localizada y de bajo riesgo, el abordaje de elección es la vigilancia activa, la cual consiste en la realización periódica de pruebas de antígeno prostático específico, exámenes físicos, biopsias de próstata o una combinación de estos para monitorear la progresión de la enfermedad, con la finalidad de realizar una intervención mayor en aquellos que desarrollen una enfermedad significativa (Litwin & Tan, 2017). El manejo con vigilancia activa puede ser una alternativa para reducir la frecuencia de resultados adversos que representa

el tratamiento activo inmediato para hombres con cáncer de próstata de bajo riesgo que probablemente nunca experimenten síntomas relacionados con el cáncer (Garisto & Klotz, 2017; Tosoian et al., 2011).

El tratamiento de la enfermedad localmente avanzada y de alto riesgo consiste en cirugía, que incluye prostatectomía radical seguida de linfadenectomía pélvica. Este método puede ayudar a reducir la mortalidad, riesgo de metástasis y la progresión local de cáncer de próstata (F. Chen & Zhao, 2013). Como terapia adyuvante posterior a la prostatectomía radical con márgenes de resección positivos o como parte del tratamiento primario, la radioterapia también es utilizada. La braquiterapia es un tipo de radioterapia que está indicada en pacientes con enfermedad de bajo riesgo a intermedio sin evidencia clínica o radiológica de afectación fuera de la próstata, mientras que la radioterapia de haz externo generalmente es utilizada en pacientes con enfermedad local de alto grado, en los cuales la prostatectomía radical no está indicada (Evans, 2018).

Los hombres cuya enfermedad recae después de la prostatectomía se tratan con radioterapia de rescate y/o terapia de privación de andrógenos para la recaída local, o con terapia de privación de andrógenos combinada con quimioterapia o nuevos agentes dirigidos a la señalización de andrógenos para la recaída sistémica.

Las hormonas sexuales masculinas, específicamente la testosterona y la dihidrotestosterona tienen la capacidad de unirse y activar al receptor de andrógenos, mecanismo esencial en el desarrollo y mantenimiento de la fisiología de la próstata. En el contexto de cáncer de próstata, los andrógenos promueven la supervivencia y crecimiento de estos tumores, por lo que la supresión en la síntesis o señalización de los andrógenos representan una terapia de gran utilidad para este tipo de cáncer (C. Dai et al., 2017). El objetivo de esta terapia es lograr el bloqueo máximo de andrógenos, a través de la castración médica o quirúrgica, siendo esta última la menos utilizada en la actualidad (Nordeen et al., 2021).

La castración médica o también conocida como terapia de privación de andrógenos consiste en el uso de fármacos que bloquean la síntesis de testosterona o bloquean el receptor de andrógenos. Los fármacos que bloquean la síntesis de testosterona

abarcan los agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), antagonistas de LHRH e inhibidores del citocromo p450. Los antagonistas del receptor de andrógenos son agentes utilizados para bloquear la señalización androgénica. La terapia de privación de andrógenos se utiliza comúnmente en pacientes cuya enfermedad recae posterior a la prostatectomía radical, como un método para prolongar la supervivencia general y alivio de los síntomas (Evans, 2018).

A diferencia de la mayoría de los tumores sólidos, la quimioterapia no es el tratamiento principal para el cáncer de próstata, sin embargo, ha demostrado beneficio mediante el uso de docetaxel y cabazitaxel. Estos fármacos actúan previniendo la despolimerización de la tubulina acarreado disminución en la división celular y posteriormente muerte celular (Nevodomsкая et al., 2018; Quinn et al., 2017)

3. Epigenética y cáncer

La epigenética se refiere al estudio de los cambios heredables en la expresión génica sin alteraciones en las secuencias de DNA, estos cambios epigenéticos son reversibles e incluyen procesos como la metilación del DNA, la expresión de RNA no codificantes y modificaciones de histonas (Kanwal et al., 2015). El resultado de las alteraciones en estos procesos biológicos conlleva a una regulación transcripcional aberrante que puede conducir a cambios en los patrones de expresión de genes implicados en la proliferación, supervivencia y diferenciación celular, por lo que mantienen una significancia en la patogénesis del cáncer (Lo & Sukumar, 2008).

3.1 Modificación de histonas

El DNA genómico de las células eucariotas se empaqueta en una estructura altamente ordenada denominada cromatina. La unidad repetitiva de la cromatina es el nucleosoma, éste a su vez se forma envolviendo ~147 pares de bases (pb) de DNA alrededor de un núcleo de octámero de histonas; el octámero consta de dos copias de histonas centrales (H2A, H2b, H3, H4) (Rothbart & Strahl, 2014). Los nucleosomas se encuentran conectados por DNA conector de aproximadamente 50-100 pb de largo, una parte de la cual puede estar unida a otra histona (H1). Estos nucleosomas experimentan interacciones de corto alcance con nucleosomas vecinos para formar las fibras de cromatina (Kimura, 2013), las posteriores interacciones fibra-fibra contribuyen al alto grado de compactación observado en los cromosomas condensados (Luger et al., 2012).

El alto grado de compactación de la cromatina sugeriría que los nucleosomas representan una barrera para la expresión génica, sin embargo, estudios han revelado que las histonas funcionan tanto positiva como negativamente en la regulación de la expresión génica (Kimura, 2013). En particular, su participación en la modulación de la expresión génica se atribuye a modificaciones postraduccionales en la cola N-terminal de los aminoácidos de histonas como: acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación, ribosilación, citrulinación e isomerización de prolina; cada una de estas modificaciones es realizada por una enzima específica, además de contar con otras enzimas que eliminan tal modificación (Kouzarides, 2007). Claramente, las alteraciones globales de los patrones de modificación de histonas tienen el potencial de afectar la estructura e integridad del genoma y alterar los patrones normales de expresión génica que al igual que la metilación del DNA, podrían ser factores causales en el cáncer (Esteller, 2007).

3.1.1 Desacetilación de histonas

La acetilación de histona lisina es altamente reversible, esta reacción es catalizada por las histonas desacetilasas (HDAC). En humanos, se localizan 18 enzimas HDAC divididas en cuatro clases denominadas clase I, II, III, IV; En conjunto, las clases I, II y IV se denominan HDAC “clásicas” y se caracterizan por ser dependientes de Zn^{2+} , mientras que las de clase III son llamadas sirtuinas y son dependientes de nicotinamida adenina dinucleótido (NAD^+) (Seto & Yoshida, 2014). La función principal de las HDAC es devolver la condensación original al recuperar la carga positiva de las histonas, permitiendo que éstas interactúen con el DNA, lo que resulta en una condensación de la estructura de la cromatina y represión génica (Chrun et al., 2017).

3.2 Sirtuinas

En los mamíferos se localizan siete homólogos de Sir2 de *S. cerevisiae*, denominadas sirtuinas (SIRT1-7) que pertenecen a la clase III de HDAC. Estas proteínas se caracterizan por tener un dominio catalítico central dependiente de NAD^+ altamente conservado (R. A. Frye, 2000). A pesar del dominio conservado, debido a cambios en sitios amino y carboxilo terminales, estas proteínas pueden ejercer funciones divergentes, además de tener una localización subcelular y patrón de expresión distinto (Figura 6) (Haigis & Sinclair, 2010).

Como se expuso previamente, la función principal atribuida a las sirtuinas es la de histonas desacetilasas realizada principalmente por SIRT1-3, 6 y 7, pero también se ha informado que un tipo de sirtuinas (SIRT1-3, 5, 7) pueden desacetilar proteínas no histonas; otras más pueden realizar ADP-ribosilación (SIRT4) y desuccinilación de varias proteínas (SIRT5) (Audia & Campbell, 2016). Respecto a la localización subcelular, SIRT1, 2, 6 y 7 se encuentran en el núcleo y de éstas, SIRT1 y 2 también pueden estar presentes en el citoplasma. Por otra parte, SIRT3,4 y 5 se localizan únicamente en la mitocondria (Aditya et al., 2017; Kupis et al., 2016).

El mecanismo mediante el cual las sirtuinas realizan su acción catalítica es muy similar independientemente del tipo de sustrato a modificar. En la desacetilación catalizada por sirtuinas, el NAD⁺ ataca nucleofílicamente a un grupo acilo de un sustrato lisina, el intermedio resultante se escinde para formar 2'-O-acil-ADP ribosa y nicotinamida, de esta manera el grupo acilo se elimina del residuo de lisina durante el proceso. En tanto, para el proceso de ribosilación de ADP por sirtuinas se realiza cuando NAD⁺ ataca al sustrato, que regularmente es un residuo de arginina o también puede ser cisteína; en esta reacción la porción ADP-ribosa de NAD⁺ se transfiere al residuo del sustrato produciendo nicotinamida como producto secundario (German & Haigis, 2015).

En particular, existe evidencia de que las sirtuinas regulan una gran cantidad de vías celulares, además de tener asociación en procesos de envejecimiento y patologías relacionadas con la edad como la neurodegeneración, la diabetes, enfermedades cardiovasculares y el cáncer (Chalkiadaki & Guarente, 2015).

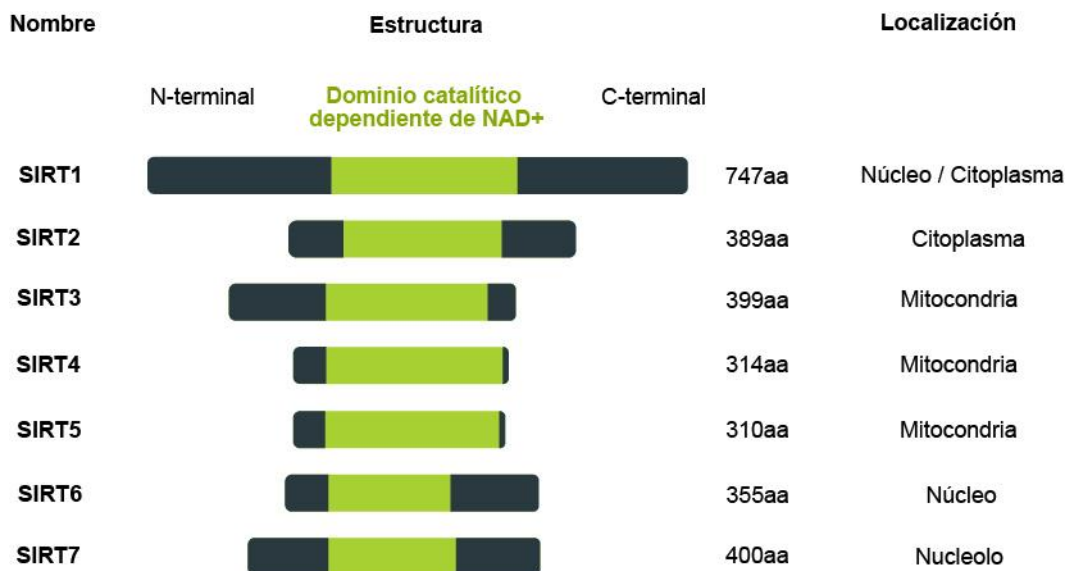


Figura 6. Estructura y localización de las sirtuinas de mamíferos. aa: aminoácidos. Modificado de (Wu et al., 2018).

3.2.1 SIRT1 y cáncer

SIRT1 es la proteína más estudiada de las sirtuinas de mamíferos, dentro de sus funciones principales se encuentra la desacetilación de histonas en residuos de lisina como H1K26, H3K9, H3K14, H4K16 y a través de este mecanismo SIRT1 puede regular procesos biológicos, incluyendo el silenciamiento génico. Además, SIRT1 regula ciertos procesos mediante la desacetilación de proteínas no histonas implicadas en múltiples vías de señalización (H. Yang et al., 2015). Diversos estudios destacan la relación de SIRT1 con el cáncer. Respecto al cáncer de próstata, el papel de SIRT1 es controvertido, ya que existe evidencia que apunta a que SIRT1 puede actuar como promotor y supresor tumoral.

3.2.2 SIRT1 Promotor tumoral en cáncer de próstata

La regulación positiva de SIRT1 se ha reportado en algunos tipos de cáncer, incluido el de próstata (J. Chen et al., 2019; X. Zhang et al., 2015). Utilizando un modelo *in vivo* de cáncer de próstata, Kuzmichev et al., 2005 observaron mayor expresión de SIRT1 en tejido cancerígeno en comparación con la neoplasia intraepitelial prostática y tejido no cancerígeno. Resultados similares fueron descritos por Huffman et al., 2007 en un modelo *in vivo*, además mediante análisis histológico de muestras derivadas de cáncer de próstata humano, observaron sobreexpresión de SIRT1 en células cancerígenas en comparación con aquellas no involucradas en el tumor. La alta expresión de SIRT1 también se ha descrito en líneas celulares de cáncer de próstata, siendo mayor en células no sensibles a andrógenos como DU145 y PC3 en comparación con LNCaP y líneas celulares de epitelio de próstata humana (Jung-Hynes et al., 2009; Kojima et al., 2008). Incluso, algunos estudios sugieren que la sobreexpresión de SIRT1 en cáncer de próstata conduce a la activación aberrante de vías de señalización involucradas en la progresión tumoral como PI3K / Akt / mTOR (Vanessa Byles et al., 2010; Z. W. Zhou et al., 2015).

A raíz de estas observaciones era lógico proponer la inhibición de SIRT1 como un mecanismo para detener la progresión tumoral en cáncer de próstata. Diversos estudios apuntan a la inhibición de SIRT1 como un potencial objetivo para la detención de la progresión tumoral. Z. W. Zhou et al., 2015 demostraron que la inhibición de SIRT1 es capaz de promover autofagia y apoptosis en células PC3 y DU145. Por otra parte, Jung-Hynes et al., 2011 identificaron una molécula endógena capaz de contrarrestar los efectos tumorigénicos de SIRT1. Específicamente reportaron que la melatonina, una hormona que disminuye con el envejecimiento y que es la encargada de regular el ciclo circadiano, es capaz de inhibir la expresión de SIRT1, lo que favorece la inhibición de la progresión tumoral en líneas celulares de cáncer de próstata y en ratones TRAMP. La inhibición de SIRT1 también puede favorecer la disminución en la progresión del ciclo celular, además de incrementar la tasa de apoptosis en cáncer de próstata, debido a que SIRT1 es capaz de desacetilar e inhibir a la proteína supresora de tumores forkhead box protein O1 (FOXO1) (Jung-Hynes et al., 2009; Y. Yang et al., 2005).

Asimismo, Nakane et al., 2012 reportaron que la inhibición de SIRT1 inhibe la progresión de cáncer de próstata a través de la atenuación en la migración e invasión celular. Mecánicamente, SIRT1 puede asociarse y desacetilar a la metaloproteínasa de matriz 2 (MMP2), enzima capaz de degradar la matriz extracelular para promover la invasión de células cancerígenas (Lovaas et al., 2013). Otro evento crucial para la progresión del cáncer es la transición epitelial-mesenquimal, ya que a través de este mecanismo las células cancerígenas de tejido epitelial como el de la próstata, invaden y hacen metástasis (Voulgari & Pintzas, 2009). La transición epitelial-mesenquimal se caracteriza por la pérdida o disminución en la expresión de E-cadherina y un aumento de vimentina y N-cadherina. Interesantemente, el silenciamiento de SIRT1 en células PC3 ha mostrado disminuir los niveles de vimentina y N-cadherina, acompañado de un aumento en los niveles de E-cadherina (Cui et al., 2016). Asimismo, el silenciamiento de SIRT1 puede reducir la expresión de factores de transcripción inductores de transición epitelial-mesenquimal como ZEB1, ZEB2, Snail y Slug en células PC3 y DU145 (V. Byles et al., 2012). Otro mecanismo que conlleva en la

progresión de cáncer de próstata es la diferenciación neuroendocrina (NED), evento crítico para el desarrollo de cáncer de próstata resistente a la castración. Se ha reportado que, en condiciones de privación de andrógenos las especies reactivas de oxígeno (ROS) incrementan y esto a su vez favorece la expresión de SIRT1, siendo esta última quien activa a Akt, promoviendo el desarrollo de diferenciación neuroendocrina. Mientras que la inhibición de SIRT1 fue capaz de revertir este proceso (Ruan et al., 2018).

En adición a la búsqueda de mecanismos de regulación de la expresión SIRT1 y su relevancia en la biología del cáncer de próstata, otros estudios se han enfocado a identificar microRNAs (miRNAs) capaces de modular la expresión génica y actividad de SIRT1. El miR-34a se ha propuesto como un supresor tumoral capaz de regular la expresión y actividad de SIRT1 (Yamakuchi, 2012). Particularmente, se ha descrito una regulación negativa de este miRNA en cáncer de próstata. Fujita et al., 2008 observaron baja expresión de miR-34a acompañado de un incremento en la expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata, siendo este fenómeno más pronunciado en aquellas líneas independientes de andrógenos (PC3, DU145). Por su parte, Duan et al., 2015 también observaron una baja regulación de miR-34a en tejidos de cáncer de próstata humano y reportaron que la inducción de sobreexpresión de este miRNA en células PC3, se asoció con menor expresión de SIRT1, disminución en la proliferación celular y detención del ciclo celular. Otros estudios destacan el papel de la reposición de miR-34a en la quimioresistencia. Kojima et al., 2010 describieron que la sobreexpresión de miR-34a en células PC3 es capaz de revertir la resistencia a paclitaxel, fármaco utilizado en cáncer de próstata refractario a hormonas, esto a través de la regulación negativa de SIRT1. Igualmente, C. Yao et al., 2016 informaron que una terapia en esquema de combinación que utiliza doxorubicina y miR-34a mejora sinérgicamente las propiedades antitumorales del fármaco en células de cáncer de próstata independientes de andrógenos (PC3 y DU145) mediante la regulación negativa de SIRT1. Resultados similares fueron reportados por Wen et al., 2017 utilizando paclitaxel. Esta evidencia resalta el papel de miR-34a y su objetivo potencial SIRT1 en cáncer de próstata. La baja regulación de miRNA-34a puede originar el

incremento de SIRT1 y esta última a su vez favorece la progresión tumoral. Incluso, la reposición de miR-34a así como la supresión de SIRT1 se han propuesto como objetivos terapéuticos en cáncer de próstata quimiorresistente.

Igualmente, otros miRNAs se han reportado como moduladores de SIRT1. Se ha reportado que el miR-212 regula la actividad transcripcional de SIRT1 y este miRNA está regulado negativamente en cáncer de próstata por lo que favorece la expresión de SIRT1 y consecuentemente se ha observado inducción de autofagia, promoción de la supervivencia y mantenimiento de las células tumorales (Ramalinga et al., 2015). Shu et al., 2017 también describieron que SIRT1 es un gen diana del miR-204, un miRNA regulado negativamente en cáncer de próstata. Además, mostraron que la reposición de miR-204 es capaz de revertir la expresión de SIRT1 y mejorar la sensibilidad de las células cancerígenas a la doxorubicina. Por su parte, X. Wang et al., 2016 también observaron un aumento en la sensibilidad a otro fármaco para cáncer de próstata, específicamente a docetaxel, por un mecanismo semejante. Ellos propusieron la implicación del eje regulador UCA1/miR-204/SIRT1. Mecánicamente, la regulación positiva de UCA1 causa atenuación en la expresión de miR-204 y este a su vez desencadena el incremento de SIRT1, favoreciendo la resistencia a la quimioterapia. No obstante, Kumar et al., 2016 también atribuyeron la regulación positiva de SIRT1 por atenuación de otro miRNA. Específicamente, observaron que la baja regulación de miR-449a en cáncer de próstata positivo para la fusión *TMPRSS2-ERG* favorece la migración e invasión celular, mediante el incremento de SIRT1. Al parecer un mecanismo de regulación positiva de SIRT1 en cáncer de próstata, puede originarse a partir de la baja expresión de miRNAs que tienen actividad supresora de tumores.

Otra de las múltiples funciones de SIRT1 es su activación en respuesta al daño al DNA, una actividad controversial en el cáncer, ya que a través de este mecanismo se podría favorecer la supervivencia de las células cancerígenas (Peng et al., 2015). Se ha observado que la sobreexpresión de SIRT1 podría causar resistencia a los fármacos antineoplásicos, por lo que la inhibición de SIRT1 podría representar un mecanismo para bloquear la reparación del DNA e incrementar la sensibilidad a los

fármacos antineoplásicos en cáncer de próstata. En este sentido, Madhav et al., 2018 demostraron que TRC105, un anticuerpo monoclonal parcialmente humanizado que bloquea el complejo de señalización CD105/BMP promueve la supresión de SIRT1 lo que conduce a un aumento del daño al DNA, mayor acetilación de p53, inhibición de la supervivencia celular, además de agotamiento energético celular, resultando en mayor sensibilidad a la radiación en cáncer de próstata con p53 funcional. Finalmente, a través de un análisis global del transcriptoma en muestras derivadas de cáncer de próstata humano, se identificó a SIRT1 como un biomarcador clave de recurrencia bioquímica en este tipo de cáncer (Long et al., 2014). Por lo tanto, estos datos sugieren el papel oncogénico de SIRT1 en cáncer de próstata. No obstante, también existen hallazgos contradictorios que apuntan a una actividad de SIRT1 como proteína supresora de tumores.

3.2.3 SIRT1 Supresor tumoral en cáncer de próstata

A pesar de que diversos hallazgos concluyen en una regulación positiva de SIRT1 en cáncer de próstata, R. H. Wang et al., 2008 observaron mediante un análisis de datos disponibles de muestras de tejido humano, una menor expresión de SIRT1 en tejido cancerígeno y metastásico de cáncer de próstata en comparación con tejido normal adyacente al tumor y además atribuyen la baja regulación de SIRT1 a menor respuesta al daño del DNA, mayor inestabilidad genómica y tumorigénesis. Como se ha descrito anteriormente la expresión de SIRT1 en cáncer de próstata puede estar modulada por algunos miRNAs. X. Yang et al., 2014 observaron que miR-221 y miR-222 se expresan altamente en células PC3 en comparación con células LNCaP, por lo que atribuyeron la regulación positiva de estos miRNA con fenotipos más agresivos de la enfermedad. A través de la inhibición de miR-221 y miR-222 en PC3 observaron menores tasas de proliferación y migración celular con un aumento de la apoptosis, siendo estos efectos mediados por la regulación al alza de SIRT1, por lo tanto, sugieren que SIRT1 tiene un papel de supresor de tumores contra la acción promotora de tumores de estos miRNAs.

En cuanto al efecto de la inducción de SIRT1, está ampliamente descrito que el resveratrol (3,4'-trihidroxiestilbeno; RES) tiene la capacidad de incrementar la expresión de SIRT1 (Howitz et al., 2003). Harper et al., 2007 evaluaron el efecto de la intervención dietética con resveratrol en ratones TRAMP y observaron una supresión en el desarrollo de cáncer de próstata, sin embargo, no exploraron si este efecto fue causado directamente por la inducción de SIRT1. En el estudio de G. Li et al., 2013 a través de un modelo de ratón knockout de *PTEN* específico de próstata, también con intervención dietética con resveratrol, observaron una reducción significativa en la incidencia de lesiones neoplásicas intraepiteliales prostáticas de alto grado, una lesión precursora de cáncer de próstata, siendo estos efectos mediados por un incremento en la expresión de SIRT1. Este fenómeno también fue descrito por Powell et al., 2011, la delección de SIRT1 favoreció el desarrollo de neoplasia intraepitelial prostática y además, mediante el análisis de expresión génica por delección de *Sirt1* observaron que esta sirtuina regula diversos genes de vías de señalización implicadas en motilidad celular, quimiotaxis, autofagia, adhesión celular y ciclo celular, además, la pérdida de SIRT1 favoreció el incremento de la proliferación celular asociada con la expresión alterada de genes sensibles a andrógenos. Asimismo, Di Sante et al., 2015 observaron que la delección del gen *Sirt1* en ratones favoreció el desarrollo de neoplasia intraepitelial prostática y mostraron que niveles bajos de SIRT1 en pacientes con cáncer de próstata se asocia con menor supervivencia libre de recurrencia.

En general, la sobreexpresión de una proteína en tejido cancerígeno indica sus propiedades oncogénicas, mientras que a la expresión reducida de una proteína se le atribuyen propiedades supresoras de tumores y bajo esta premisa diversos estudios han tratado de identificar el papel de SIRT1 en cáncer de próstata, sin embargo, los resultados son controvertidos. Particularmente, la mayoría de los estudios *in vivo* y los análisis histológicos de muestras derivadas de cáncer de próstata humano sugieren que la expresión de SIRT1 es mayor en el tejido cancerígeno en comparación con tejido sano, e inclusive se ha correlacionado mayor expresión de SIRT1 con un mayor puntaje de Gleason, puntuación que determina el grado de cáncer de próstata (Lovaas et al., 2013). Contrariamente, se

ha observado que en ratones *Sirt1* $-/-$ se favorece el desarrollo de cáncer de próstata y apoyan el papel supresor de tumores de SIRT1. Una explicación viable a este fenómeno es que la alta expresión de SIRT1 en estadios más avanzados de la enfermedad, sea una consecuencia de la progresión de la enfermedad y no precisamente una causa. No obstante, esto no explica de manera consistente los hallazgos donde la inhibición de SIRT1 atenúa la progresión de la enfermedad.

Según Huffman, 2012, es probable que SIRT1 ejerza una dualidad en la tumorigénesis de la próstata y su función se correlacione con la etapa de la enfermedad. En las etapas iniciales, el cáncer de próstata depende de los andrógenos para su crecimiento, sin embargo, suele progresar a un fenotipo refractario a hormonas (Awad et al., 2018). En este contexto, es importante destacar que SIRT1 se expresa mayormente en líneas celulares que representan el fenotipo independiente de andrógenos, específicamente en PC3 y DU145 y el efecto de la inhibición de SIRT1 en estas células ha mostrado reducir la progresión tumoral. Por tanto, no se descarta la posibilidad de que la función de SIRT1 se relacione con la dependencia hormonal. El receptor de andrógenos tiene un papel relevante en el desarrollo de próstata al regular la transcripción, la proliferación celular y la apoptosis, por lo que es un regulador clave en la aparición y progresión del cáncer de próstata. A través de diversas modificaciones postraduccionales el receptor de andrógenos puede alterar su actividad transcripcional, estabilidad y localización celular (van der Steen et al., 2013). Particularmente, la acetilación del receptor de andrógenos es necesaria para su activación dependiente del ligando. Interesantemente, Fu et al., 2006 describieron que SIRT1 es capaz de asociarse y desacetilar al receptor de andrógenos, reprimiendo la señalización y función de este último. A diferencia de otros estudios que evaluaron el efecto de la supresión de SIRT1 en células independientes de andrógenos, Fu et al., 2006 evaluaron la sobreexpresión de SIRT1 en diferentes líneas celulares de cáncer de próstata y observaron inhibición de la proliferación celular inducida por dihidrotestosterona en células LNCaP, sin efecto discernible en células que carecen del receptor de andrógenos, lo que demuestra que la inhibición del crecimiento estaba directamente relacionada con la desacetilación e inhibición del receptor de andrógenos por

SIRT1. En adición, Y. Dai et al., 2007 demostraron que SIRT1 también puede actuar como un correpresor del receptor de andrógenos a través de su actividad de desacetilasa. Específicamente, reportaron que la represión transcripcional mediada por antagonistas de andrógenos requiere el reclutamiento de SIRT1, quien desacetila a la histona H3 en promotores de genes dependientes del receptor de andrógenos, causando represión transcripcional. En consecuencia, es posible que una baja regulación de SIRT1 aumente la sensibilidad de las células de cáncer de próstata a las acciones proliferativas y transcripcionales de los andrógenos. Estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que SIRT1 presenta actividad dicotómica según la etapa del cáncer de próstata. Sin embargo, es necesaria mayor evidencia que favorezca la comprensión de las interacciones y mecanismos de SIRT1 en la biología del cáncer de próstata.

3.3 MEHP y sirtuinas

Recientemente se ha demostrado que los ftalatos pudieran ejercer efectos sobre el epigenoma de las células. Específicamente MEHP se ha asociado con cambios en la expresión de los reguladores epigenéticos denominados sirtuinas, en líneas celulares de macrófagos (RAW 264.7) la exposición a MEHP condujo a una disminución en la expresión a nivel de mRNA y proteínas de las siete sirtuinas de mamífero (SIRT1-7), conduciendo a un ambiente proinflamatorio (Park et al., 2019). En otras células como adipocitos 3T3-L1, MEHP favoreció la expresión de SIRT3, sirtuina implicada en el metabolismo (Chiang et al., 2014). Otros ftalatos han mostrado causar efectos en la expresión de sirtuinas. El bencil butil ftalato (BBP) disminuyó la expresión de SIRT1 y SIRT3 en líneas celulares de hígado HepG2 y de células troncales C3H/10T1/2 (J. Zhang et al., 2015; J. Zhang & Choudhury, 2017). Mientras que el ftalato de diisononilo (DNIP) también redujo la expresión de SIRT1 y SIRT3 en células HepG2 (Gutiérrez-García et al., 2019).

La evidencia destaca que los ftalatos pudieran ejercer alteraciones en la expresión de las sirtuinas. Sin embargo, este efecto aún no ha sido caracterizado en líneas celulares de cáncer de próstata, así como también aún no ha sido explorado el efecto que pudieran ejercer sobre la progresión de este tipo de cáncer.

4. Planteamiento del problema y justificación

El incremento en la incidencia y prevalencia de algunos tipos de cáncer regulados por hormonas, incluido el de próstata se ha asociado al aumento en la utilización y exposición a disruptores endocrinos, dentro de los que se incluye a los ftalatos. La población humana tiene una exposición continua a los ftalatos debido a la ubicuidad de estos compuestos. El DEHP es el ftalato más ampliamente utilizado y su metabolito principal el MEHP se ha relacionado con múltiples efectos nocivos en la salud humana, además de que se ha relacionado con la progresión de diversos tipos de cáncer, incluido el de próstata.

Evidencia reciente destaca que los ftalatos, incluido el MEHP pueden ejercer alteraciones en la expresión de las sirtuinas, específicamente la expresión de SIRT1 ha mostrado mayor sensibilidad a la exposición de los ftalatos. El efecto que pudiera ejercer MEHP sobre SIRT1 en el cáncer de próstata aún no ha sido caracterizado. En este sentido, es de nuestro interés conocer si MEHP causa alteraciones en la expresión de SIRT1 y analizar si esto pudiera relacionarse con la progresión del cáncer de próstata. El desarrollo de esta investigación permitirá conocer los mecanismos moleculares que ejerce MEHP en las células de cáncer de próstata.

5. Pregunta de investigación

¿Existe relación entre la exposición a MEHP con la progresión del cáncer de próstata asociada a cambios en la expresión de SIRT1?

6. Hipótesis

La exposición a MEHP disminuirá la expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata lo que favorecerá el incremento de las propiedades neoplásicas en un modelo *in vitro*.

7. Objetivo general

Evaluar el efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 y su relación con las propiedades neoplásicas del cáncer de próstata en un modelo *in vitro*.

7.1 Objetivos específicos

- Analizar el efecto de la exposición a MEHP sobre la viabilidad celular en líneas celulares de cáncer de próstata.
- Analizar los cambios en la expresión de SIRT1 a nivel de mRNA y proteína por la exposición a MEHP.
- Evaluar la relación entre la exposición a MEHP y cambios en la expresión de SIRT1 sobre la progresión del cáncer de próstata, mediante ensayos de proliferación y migración celular.

8. Material y métodos

8.1 Análisis de bases de datos

El análisis de perfiles de expresión génica en diferentes tipos de cáncer se realizó para identificar la expresión de SIRT1. Inicialmente, se realizó un análisis en la plataforma GEPIA para conocer la expresión de SIRT1 en diversos tipos de cáncer y su contraparte normal. GEPIA contiene datos de expresión de secuenciación de RNA de 9736 tumores y 8587 muestras normales de los proyectos The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) y The Genotype-Tissue Expression (GTEx) (<http://gepia.cancer-pku.cn/>). Posteriormente se realizó la comparación del perfil de expresión de SIRT1 en tejidos de cáncer de próstata a partir de datos obtenidos de la plataforma Xena (<https://xena.ucsc.edu/>), la cual incluye datos de expresión génica de TCGA, además de realizarse la comparación con los datos de GTEx que comprenden datos de expresión génica de tejidos no cancerígenos. También se evaluó el perfil de expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata (GSE48812) mediante la base de datos Cáncer RNA-Nexus (<http://syslab4.nchu.edu.tw/>). Esta base de datos consta de 28 conjuntos de datos de TCGA y 26 conjuntos de datos Gene Expression Omnibus (GEO) y Sequence Read Archive (SRA). Igualmente se realizó una curva de Kaplan-Meier, la cual muestra la supervivencia general (SG) de los pacientes con cáncer de próstata estratificados según la expresión de SIRT1 en dos grupos, SIRT1 alto y bajo. Este análisis fue realizado en la plataforma Xena (<https://xena.ucsc.edu/>).

8.2 Cultivo celular

Las líneas celulares fueron obtenidas de ATCC (The American Type Culture Collection). El cultivo se estableció en frascos de 25cm², mantenidos con medio RPMI 1640 con rojo de fenol (Corning®, 10-040-CM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco®, 16000044). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C con una atmósfera de 5% de CO₂.

Las características de las líneas celulares utilizadas se describen a continuación:

- LNCaP (ATCC®, CRL-1740™): Células epiteliales adherentes derivadas a partir de una lesión metastásica a nódulo linfático de adenocarcinoma prostático humano. Receptor de andrógenos positivo, sensible a andrógenos.
- PC-3 (ATCC®, CRL-1435™): Células epiteliales adherentes derivadas a partir de metástasis ósea de un adenocarcinoma prostático de alto grado. Receptor de andrógenos negativo, independiente de andrógenos.

8.3 Exposición a MEHP

Para evaluar el efecto de la exposición a MEHP las células se mantuvieron en un ambiente libre de hormonas durante 24 horas previo a la exposición a MEHP, para lo cual se les reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 sin rojo de fenol suplementado con 10% de Charcoal Stripped Fetal Bovine Serum (CS-FBS) (Gibco™, 12676029). Posteriormente bajo estas condiciones se realizó la exposición a diferentes concentraciones de MEHP (Sigma, 796832). La elección de las concentraciones se realizó en base a estudios poblacionales que han reportado concentraciones plasmáticas de MEHP en humanos adultos, así como de concentraciones utilizadas previamente en estudios *in vitro* (Lind et al., 2012; Lorber et al., 2009; Song et al., 2020; Y. X. Wang et al., 2018; Yong et al., 2016).

8.4 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue evaluada por ensayo de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium] (Abcam, ab21109). Se sembraron 1×10^4 células LNCaP y 5×10^3 células PC3 en placas de 96 pozos, 48 horas después se reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 sin rojo de fenol con CS-FBS al 0.1%, 24 horas después se realizó la exposición a diferentes concentraciones de MEHP diluido en un volumen equivalente de DMSO al 0.1% que sirvió como vehículo. Después, el medio fue reemplazado por 50 μ L de medio sin suero y 50 μ L de MTT por 3 horas

a 37°C. Posteriormente, se añadieron 100 µL de SDS para solubilizar los cristales de formazán. La absorbancia se leyó a 590 nm en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (Biotek, Microplate Spectrophotometer).

8.5 Extracción, cuantificación e integridad de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el RNeasy Mini Kit (250) (Qiagen, 74106) siguiendo las instrucciones del fabricante. Después se cuantificó el RNA mediante el espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 UV-Vis de Thermo Fisher Scientific. Se determinó la absorbancia a 260 nm con el fin de obtener la concentración de RNA en ng/µL. Asimismo se determinaron los coeficientes 260/280 y 260/230 los cuales indican la pureza de la muestra, tomando como referencia un valor aproximado de 2.0 en el coeficiente 260/280 y un valor 1.8 a 2.2 en el cociente 260/230. El RNA obtenido se guardó a -80°C.

Antes de realizar la retrotranscripción, se verificó la integridad del RNA mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. El gel se preparó con 0.75 gramos de agarosa UltraPure™ ThermoFisher Scientific, los cuales se disolvieron en 50 ml de buffer TBE 0.5x. Posterior a la polimerización del gel se cargaron 200 ng de RNA, 2 µL de buffer de carga y 2 µL de Gel Red 1x. La electroforesis se realizó a 75 V durante 1 hora. Tras la electroforesis se reveló la integridad del RNA mediante el sistema transiluminador Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System.

8.6 Ensayo de retrotranscripción

Se llevó a cabo una reacción de retrotranscripción (RT) con el propósito de obtener el DNA complementario (c-DNA) para la PCR tiempo real. Para efectuar este ensayo, se utilizaron 400 ng de RNA por cada muestra, preparando la reacción con el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (ThermoFisher, K1691) a un volumen final de 20 µL, siguiendo el protocolo establecido por el fabricante. Las condiciones de tiempo y temperatura para la reacción fueron: 25°C por 5 minutos, 42°C durante

60 minutos, seguido de 70°C por 5 minutos. Después el c-DNA obtenido se diluyó con 80 µL de agua libre de RNasas y se almacenó a 4°C durante toda la noche.

8.7 Ensayos de expresión génica (RT-PCR)

El ensayo se realizó mediante el kit SYBR® Select Master Mix (Applied Biosystems, 4472908), siguiendo las instrucciones del fabricante en una placa óptica de 96 pozos, en los cuales se cargaron: 4 µL de cada muestra de c-DNA, 5 µL de SYBR® Select Master Mix (2X), 0.4 µL de forward primers [5 mM], 0.4 µL de reverse primers [5 mM] y 0.2 µL de agua libre de RNasas, para un volumen final de 10 µL por reacción. A continuación, se muestran los oligonucleótidos utilizados:

Gen	Secuencia		Longitud (bases)
SIRT1	F	GCACTAATTCCAAGTTCCATACC	23
	R	GGCATATTCACCACCTAACC	20
18s	F	CGCGGTTCTATTTTGTTGGT	20
	R	AGTCGGCATCGTTTATGGTC	20

Posteriormente se realizó la PCR tiempo real con el sistema Applied Biosystems QuantStudio™ 7 Real-Time PCR System, mediante el método curva estándar y 45 ciclos. Tras obtener los datos, se determinó la expresión relativa a nivel de mensajero de los genes mediante el método de $2^{-\Delta ct}$, el cual normaliza los niveles de expresión mediante el uso de un gen control endógeno (18s) (House-keeping gene) (Livak & Schmittgen, 2001).

8.8 Extracción de proteínas

La extracción de proteínas totales se realizó con buffer comercial RIPA (Sigma Aldrich®, R0278), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las proteínas fueron almacenadas a -20°C hasta la cuantificación. Las proteínas se cuantificaron con el sistema DC Protein Assay (Bio-Rad, #5000112).

8.9 Western blot

La elección de la concentración de proteína para la electroforesis se realizó mediante una curva de concentraciones de proteína (10, 15, 20, 30 µg), con la finalidad de identificar una concentración a la cual no existiera saturación de la señal de la proteína de interés (SIRT1) en el western blot. La señal se observó en todas las concentraciones manteniendo un rango lineal. A partir de estos hallazgos se decidió utilizar 20 µg de proteína para los siguientes experimentos. La electroforesis se realizó mediante SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 10% a 100 V durante 1.5 - 2 horas. Posteriormente, las proteínas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) (Bio-Rad, #1620177) mediante el sistema Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) a 20 V durante 40 minutos. Las membranas se bloquearon con leche libre de grasa al 5% en buffer TBS-Tween 1% por 2 horas a 4°C, después se incubó la membrana con anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 1% y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido en TBS-Tween 1% por 2 horas, después se realizaron 3 lavados con TBS-Tween al 1% y el revelado se realizó mediante el sistema Luminanta™ Forte Western HRP (Merck Millipore, WBLUF0100). Los anticuerpos utilizados fueron policlonal de conejo anti-SIRT1 (Merck, 07-131, 1:1000), policlonal de conejo anti-Lamina B1 (Abcam, ab16048, 1:10000) y policlonal de cabra anti-rabbit (Abcam, ab97051, 1:10000).

8.10 Ensayo de herida

Los ensayos de cicatrización de heridas se realizaron en placas de 24 pozos colocando 3×10^4 células PC3 y 1×10^5 células LNCaP en cada pozo. Cuando las células alcanzaron la confluencia, el medio fue reemplazado con RPMI 1640 con 0.1% de CS-FBS con la finalidad de inhibir la proliferación celular, después de 24 horas se procedió a realizar un rasguño mediante el apoyo de una punta de 200 μL , seguido de dos lavados con PBS. Posteriormente se aplicó la exposición a diferentes concentraciones de MEHP diluido en un volumen equivalente de DMSO al 0.1% que sirvió como vehículo. El registro fotográfico para la visualización del cierre de herida se realizó cada 24 horas. El análisis de las imágenes se realizó mediante el software Image J (versión 1.52j) y la herramienta MRI_Wound_Healing_Tool.ijm.

8.11 Ensayo de proliferación celular

La proliferación celular fue evaluada por ensayo de MTT [3-(4,5-dimetil-tiazol-2-yl)-2,5-difenil bromuro de tetrazolium] (Abcam, ab21109). Se sembraron 2×10^3 células PC3 y 5×10^3 células LNCaP en placas de 96 pozos, 48 horas después se reemplazó el medio de cultivo por RPMI 1640 sin rojo de fenol con CS-FBS al 10%, posterior a las 24 horas se realizó la exposición a diferentes concentraciones de MEHP diluido en un volumen equivalente de DMSO al 0.1% que sirvió como vehículo. Como control positivo se utilizó un grupo que contenía SFB al 10% y otro con $1 \mu\text{M}$ de 5α -dihidrotestosterona (DHT). Los tiempos de exposición a MEHP se realizaron durante 24, 48, 72, 96 y 120 horas. Después de este tiempo, el medio fue reemplazado por 50 μL de RPMI 1640 sin rojo de fenol sin suero y 50 μL de MTT por 3 horas a 37°C . Posteriormente, se añadieron 100 μL de SDS para solubilizar los cristales de formazán. La absorbancia se leyó a 590 nm en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ (Biotek, Microplate Spectrophotometer).

8.12 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de cada ensayo fueron analizados en el software GraphPad Prism 7 (Software GraphPad, Versión 5.01, La Jolla, CA, EE. UU.). El análisis estadístico de los ensayos de viabilidad celular y ensayos de herida se realizó mediante ANOVA de una vía con la prueba de Dunnet. El análisis de los demás ensayos se realizó mediante ANOVA de dos vías seguido de una prueba de Tukey. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron estadísticamente significativos, donde $*=p \leq 0.05$, $**=p \leq 0.01$, $***=p \leq 0.001$, $****=p \leq 0.0001$. Para todos los ensayos se consideró una $n=3$ con su respectivo triplicado técnico.

9. Resultados

9.1 Expresión de SIRT1 en tejidos de cáncer de próstata

Se evaluó la expresión de SIRT1 en diferentes tipos de cáncer respecto a su contraparte sana mediante la plataforma GEPIA. Diversos tipos de cáncer tienen niveles de expresión altos de SIRT1, incluyendo el cáncer de próstata (**Figura 7**).

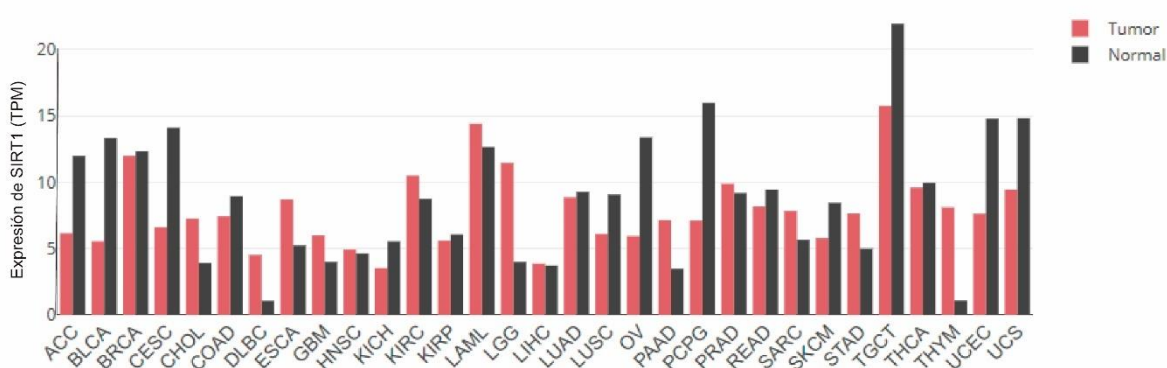


Figura 7. Expresión de SIRT1 en diversos tipos de cáncer respecto a su contraparte normal (tejido sano). Datos obtenidos de la plataforma GEPIA. (PRAD: Adenocarcinoma de próstata).

Posteriormente se realizó un análisis mayor con datos de cáncer de próstata, la expresión de SIRT1 se mostró significativamente menor en tejidos sanos, respecto al tejido normal adyacente al tumor y tejido cancerígeno (**Figura 8A**). También se evaluó la expresión de SIRT1 a partir de datos disponibles para líneas celulares de cáncer de próstata y células PrEC que corresponden a células epiteliales de próstata humana sana. A pesar de no existir diferencia significativa, existe una ligera tendencia a la alta expresión de SIRT1 en células PC3 que corresponden a un estadio más avanzado de la enfermedad (**Figura 8B**). De igual manera, no fue significativa la supervivencia general en pacientes con cáncer de próstata con alto y bajo nivel de expresión de SIRT1 (**Figura 8C**).

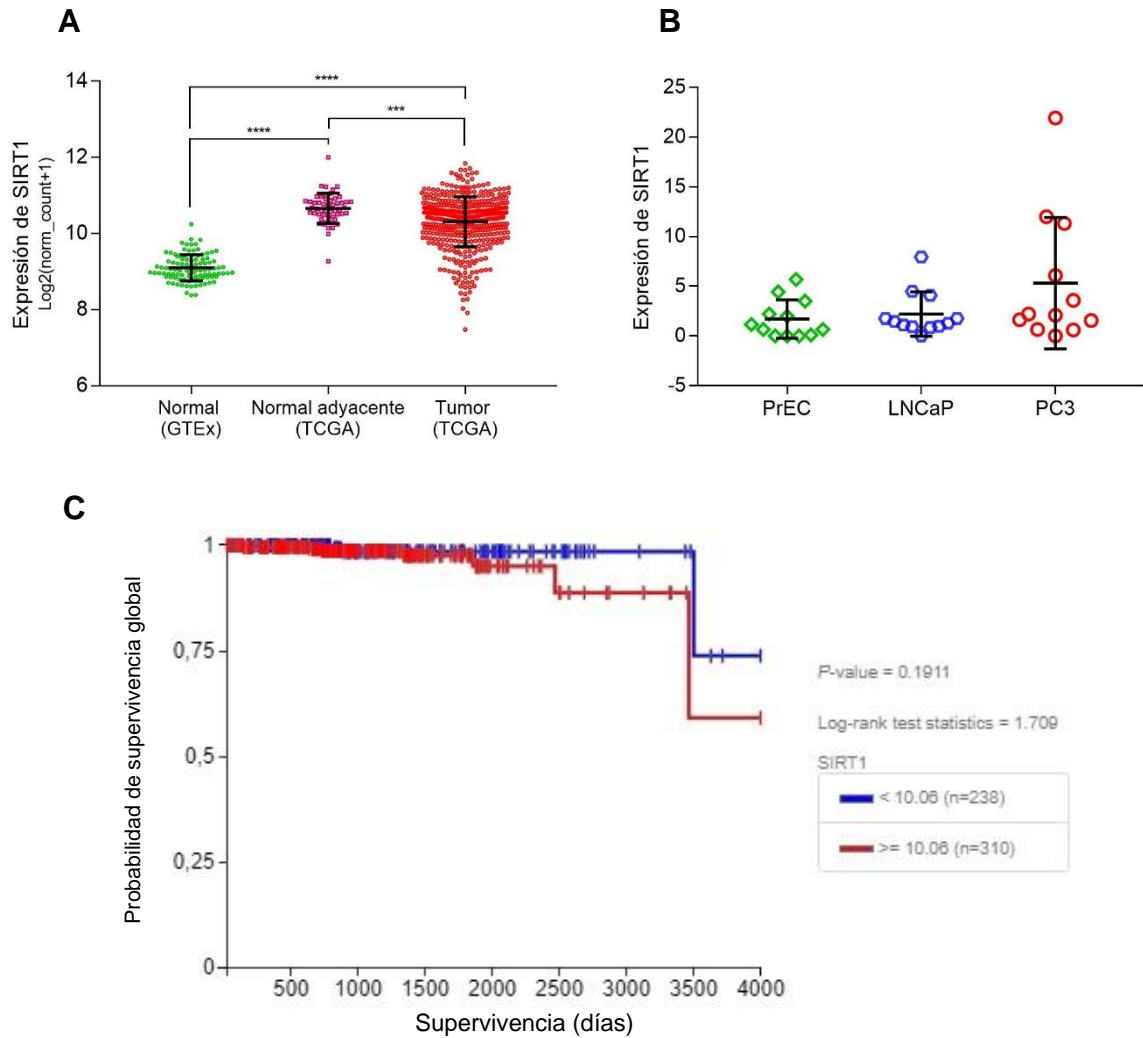


Figura 8. Expresión de SIRT1 en cáncer de próstata y supervivencia general. A) Comparación del perfil de expresión de SIRT1 en tejidos de cáncer de próstata en la base de datos GTEx y TCGA. El análisis se realizó a partir de datos obtenidos de la plataforma Xena. B) Perfil de expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata mediante la base de datos Cáncer RNA-Nexus (GSE48812). C) Curva de Kaplan-Meier, la cual muestra la supervivencia general de los pacientes con cáncer de próstata estratificados según la expresión de SIRT1 en dos grupos, SIRT1 alto y bajo. Este análisis fue realizado en la plataforma Xena.

9.2 Efecto de MEHP sobre la viabilidad celular

En células LNCaP, altas concentraciones de MEHP causaron disminución de la viabilidad celular. La exposición a 100 μM de MEHP disminuyó significativamente la viabilidad celular a partir de las 24 horas, mientras que la concentración de 50 μM causó disminución de la viabilidad celular a partir de las 48 horas. De igual manera 20 μM de MEHP disminuyó la viabilidad a partir de las 48 horas. La concentración más alta de MEHP a la cual no se observó un efecto adverso en la viabilidad celular corresponde a 10 μM (**Figura 9**).

Asimismo, en células PC3, altas concentraciones de MEHP afectaron la viabilidad celular. A partir de las 24 horas altas concentraciones de MEHP (50-100 μM) disminuyeron significativamente la viabilidad celular. A las 48 horas 20 μM de MEHP promovieron una disminución de la viabilidad celular (**Figura 10**). Al igual que en las células LNCaP, en las células PC3 la exposición igual o menor a 10 μM de MEHP no mostró efecto adverso sobre la viabilidad celular, por lo que estas concentraciones fueron elegidas para posteriores experimentos.

LNCaP

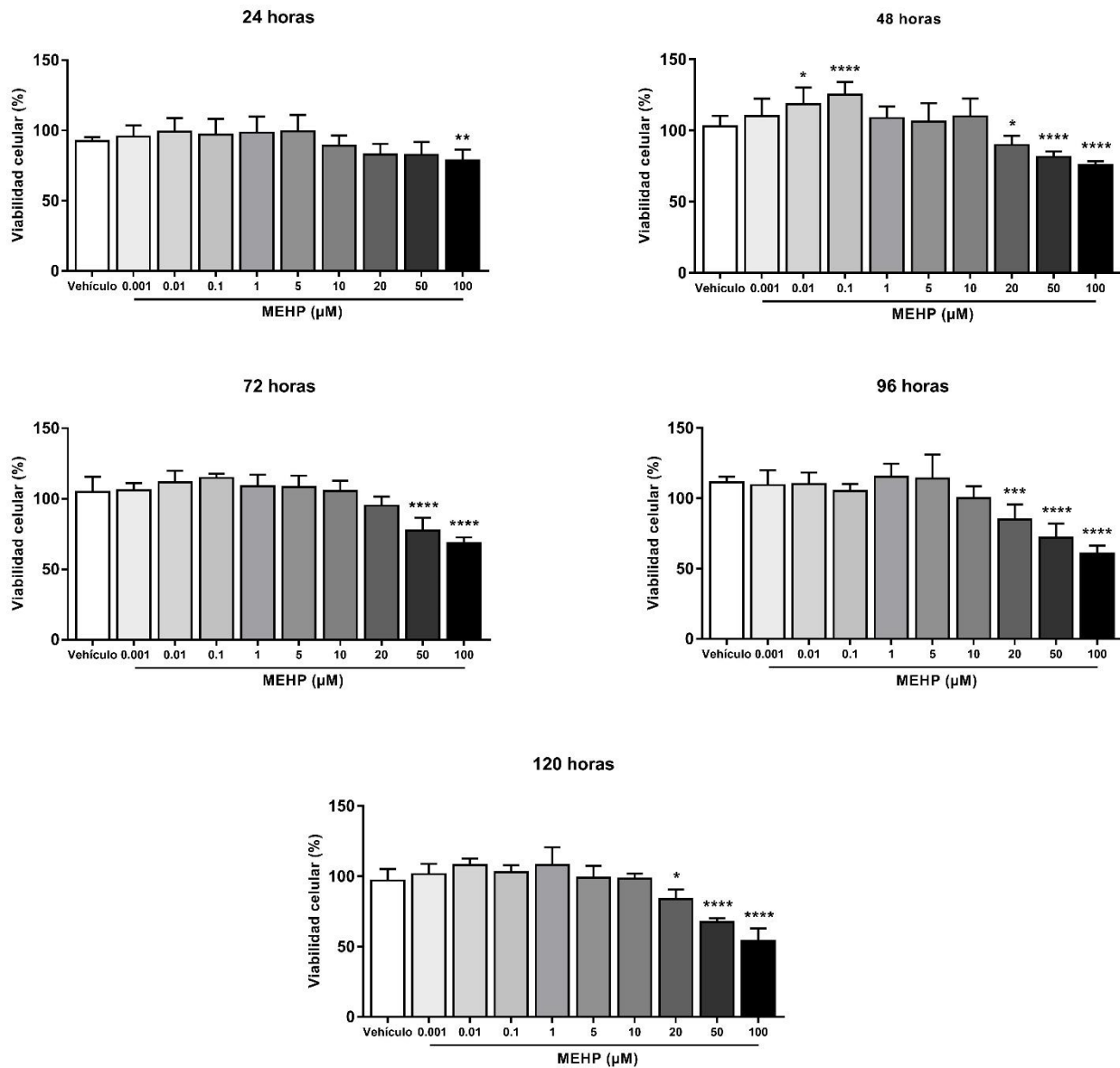


Figura 9. Viabilidad celular en células LNCaP por exposición a MEHP. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de MEHP (0.001-100 µM) por 24-120 horas sobre la viabilidad celular por ensayo de MTT. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

PC3

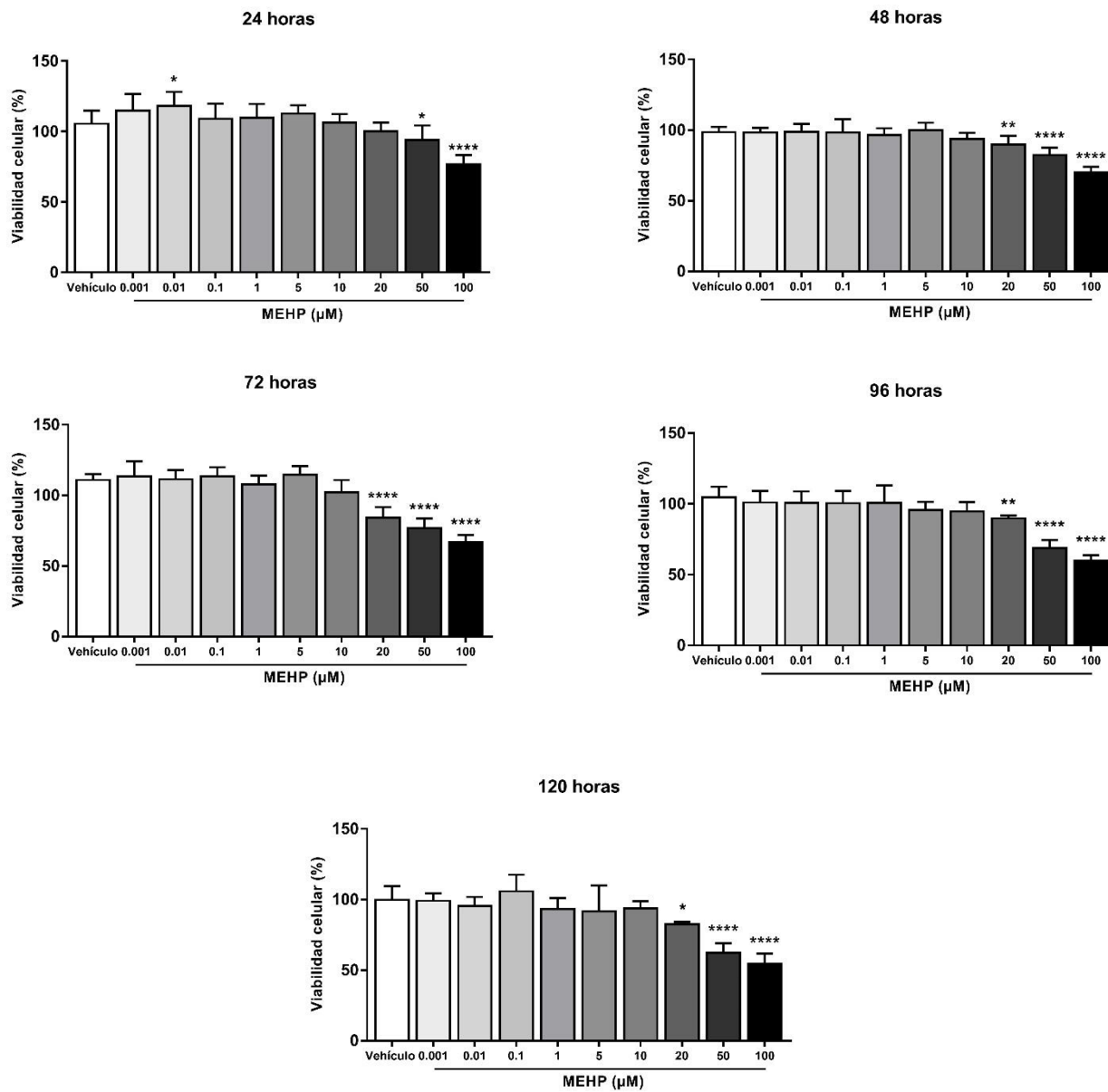


Figura 10. Viabilidad celular en células PC3 por exposición a MEHP. Efecto de la exposición a diferentes concentraciones de MEHP (0.001-100 µM) por 24-120 horas sobre la viabilidad celular por ensayo de MTT. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

9.3 Efecto de la exposición a MEHP por 24 horas sobre la expresión de SIRT1

Se evaluó el efecto de la exposición a MEHP por 24 horas sobre la expresión de SIRT1. La exposición a MEHP durante 24 horas no causó efectos significativos sobre la expresión de SIRT1 en células LNCaP a nivel de RNA mensajero (**Figura 11A**). En estas condiciones también se evaluó la expresión de SIRT1 a nivel de proteína, donde no se observaron cambios significativos (**Figura 11B**). En células PC3, la exposición a MEHP durante 24 horas igualmente no mostró efectos sobre la expresión de SIRT1 a nivel de RNA mensajero y de proteína (**Figura 12A-B**).

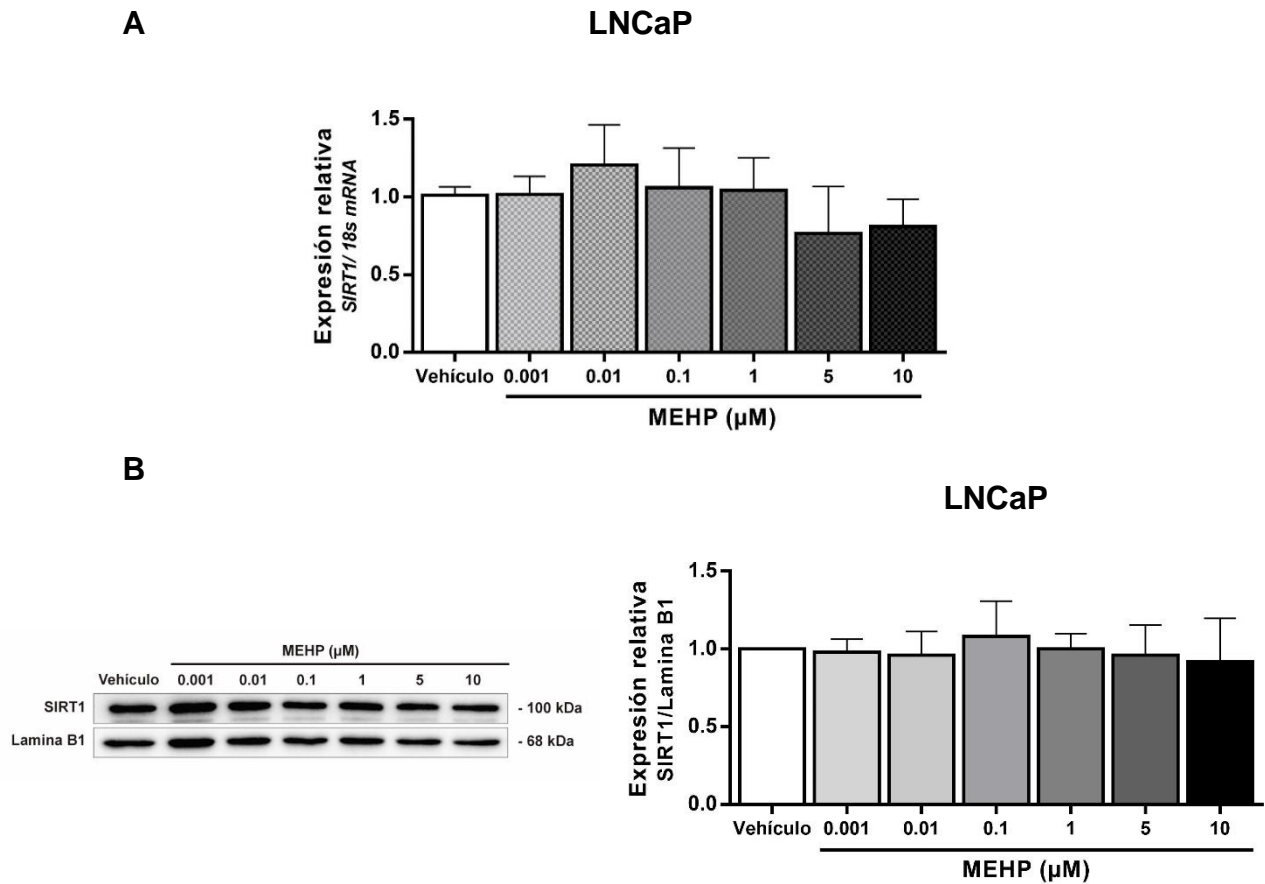
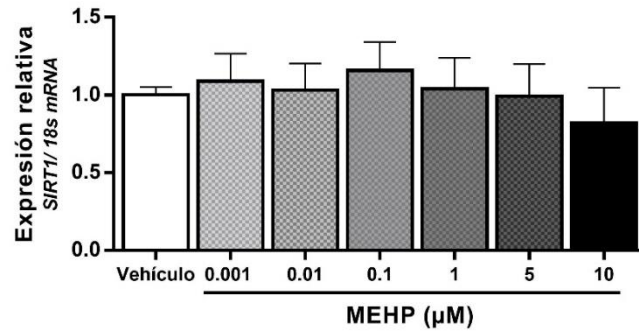


Figura 11. Efecto de la exposición a MEHP por 24 horas sobre la expresión de SIRT1 en células LNCaP. A) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 a nivel de mRNA. B) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión proteica de SIRT1. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

A

PC3



B

PC3

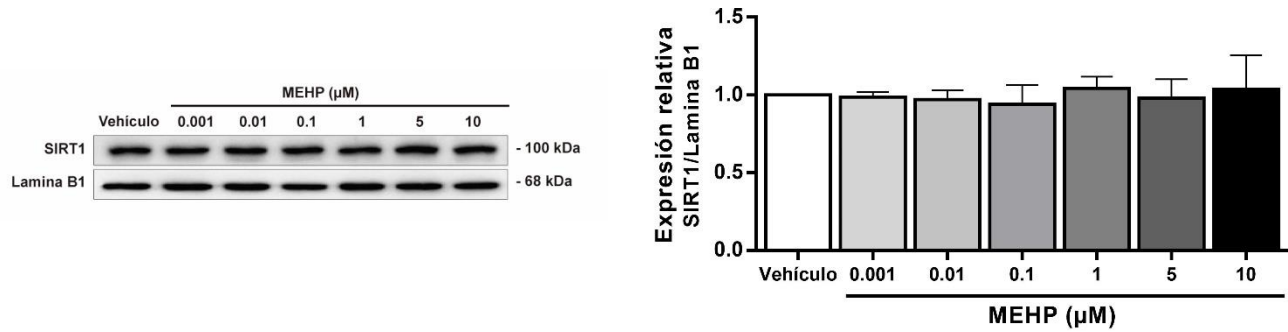


Figura 12. Efecto de la exposición a MEHP por 24 horas sobre la expresión de SIRT1 en células PC3. A) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 a nivel de mRNA. B) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión proteica de SIRT1. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

9.4 Efecto de la exposición a MEHP por sobre la expresión de SIRT1

Posteriormente a fin de conocer si la exposición prolongada a MEHP tiene efectos sobre la expresión de SIRT1, se expusieron células LNCaP y PC3 a 0.1 y 10 μ M de MEHP desde 24 hasta 120 horas. En células LNCaP a partir de las 72 horas independientemente de la concentración, MEHP promovió la expresión de SIRT1 a nivel del RNA mensajero, siendo el efecto más pronunciado a las 120 horas donde la expresión de SIRT1 fue mayor (**Figura 13A**). Después se evaluó la expresión de SIRT1 a nivel de proteína, donde no se observó un cambio significativo en la expresión a pesar de los niveles incrementados a nivel de RNA mensajero (**Figura 13B**).

En células PC3, MEHP también promovió la expresión de SIRT1 a nivel de RNA mensajero a partir de las 72 horas, sin embargo, este efecto solo se observó a 0.1 μ M de MEHP. La exposición a 10 μ M de MEHP solo logró inducir la expresión de SIRT1 hasta las 120 horas. (**Figura 14A**). Interesantemente, al igual que en las células LNCaP, a pesar del incremento en la expresión de SIRT1 a nivel de RNA mensajero por MEHP, este efecto no se observó a nivel de proteína en células PC3 (**Figura 14B**).

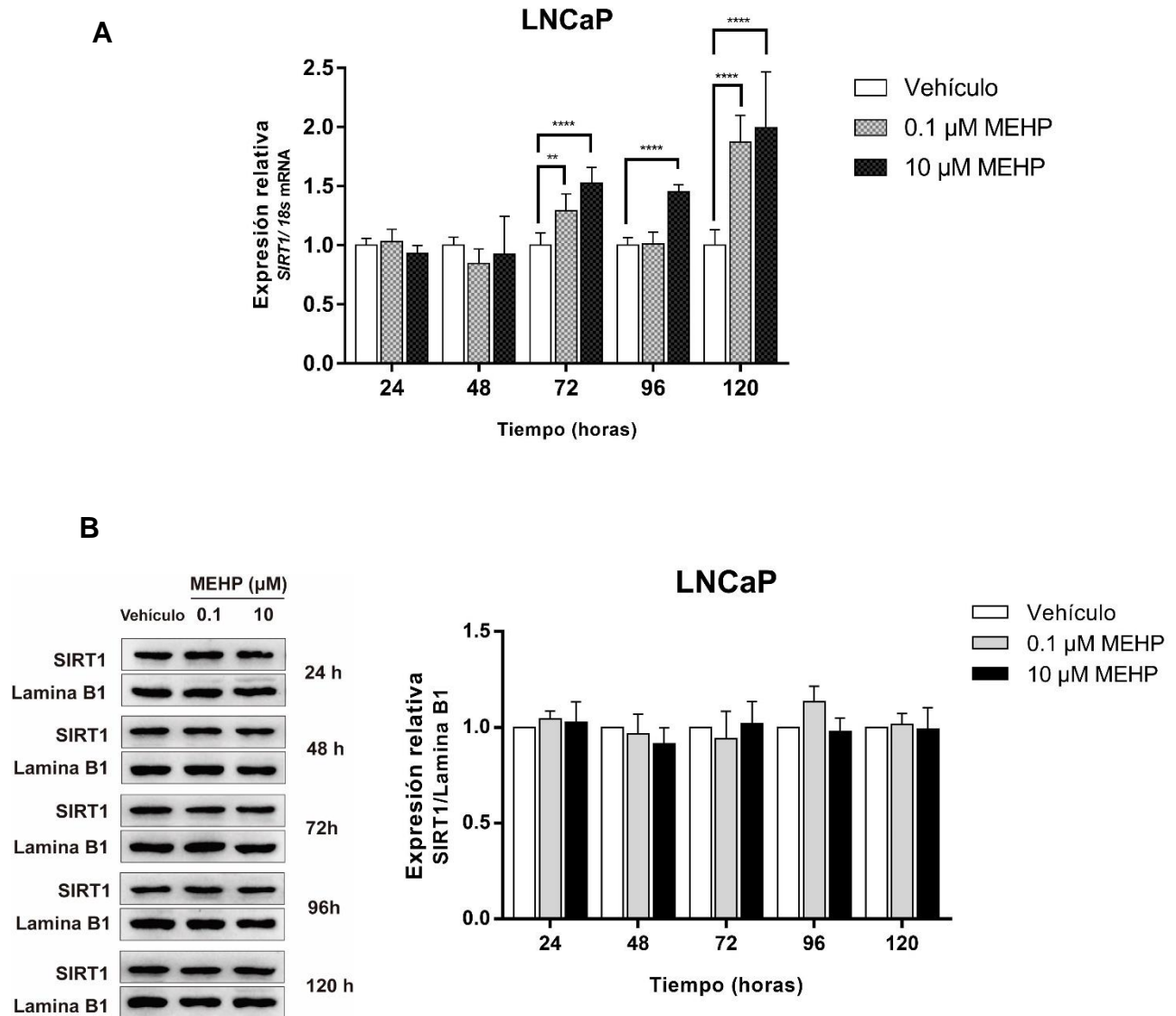


Figura 13. Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 en células LNCaP. A) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 en células LNCaP a nivel de mRNA. B) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión proteica de SIRT1 en células LNCaP. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

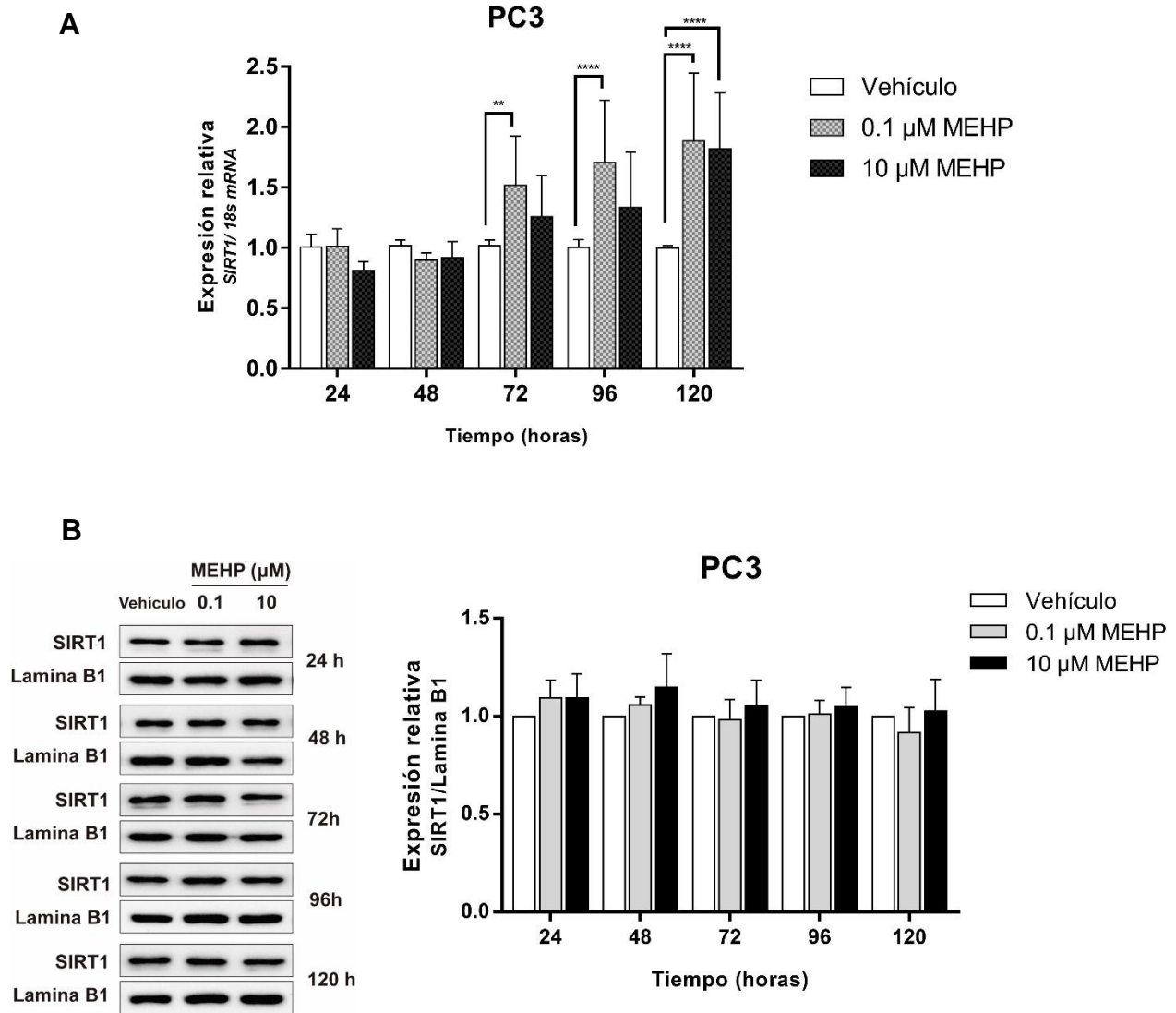


Figura 14. Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 en células PC3. A) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión de SIRT1 en células PC3 a nivel de mRNA. B) Efecto de la exposición a MEHP sobre la expresión proteica de SIRT1 en células PC3. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

9.5 Efecto de la exposición a MEHP sobre la proliferación celular

Después de no observar cambios en la expresión de la proteína SIRT1 por exposición a MEHP se procedió a la realización de ensayos de proliferación y migración celular a fin de conocer si MEHP pudiera ejercer un efecto independiente de la expresión de SIRT1. En células LNCaP la exposición a MEHP no causó efectos sobre la proliferación en comparación con el vehículo. Como era de esperarse en el control positivo con DHT, la proliferación celular aumentó significativamente desde las 24 horas, ya que las células LNCaP son líneas celulares sensibles a los andrógenos. De igual manera el control positivo con SFB al 10% indujo un incremento significativo de la proliferación celular a partir de las 72 horas (**Figura 15A**). Por otra parte, en las células PC3, la exposición a MEHP por 24 y 48 horas no provocó cambios en la proliferación celular, sin embargo, a partir de las 72 horas, MEHP a 1 y 10 μM causó disminución en la proliferación celular en comparación con el vehículo. El control positivo SFB al 10% a partir de las 72 horas indujo significativamente la proliferación celular (**Figura 15B**).

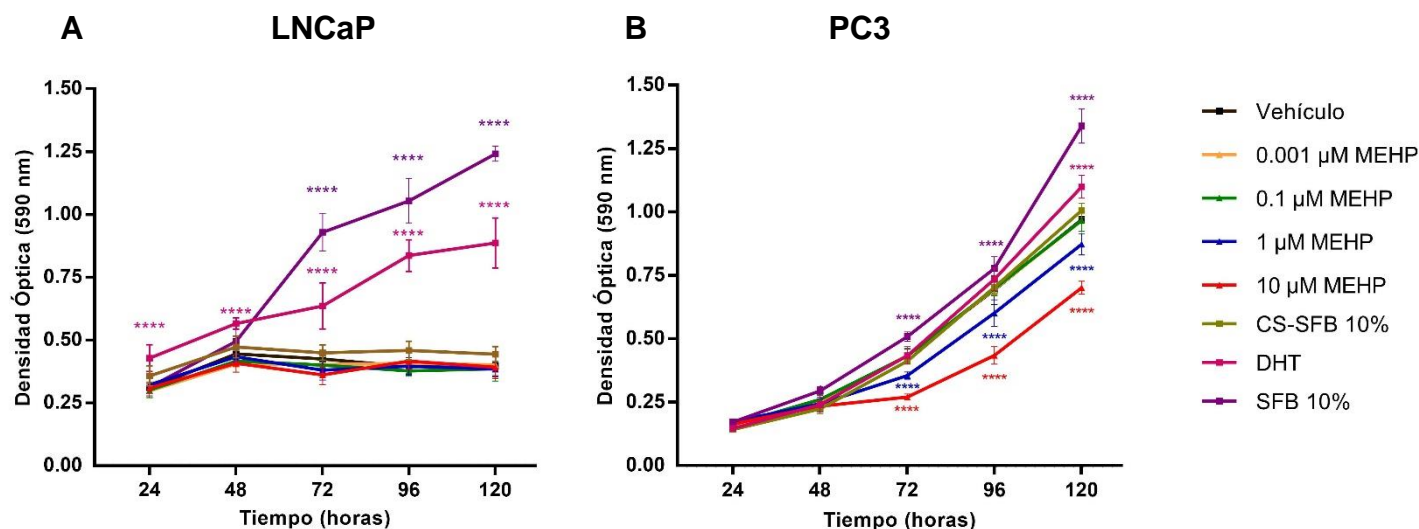


Figura 15. Efecto de la exposición a MEHP sobre la proliferación celular. A) Efecto de la exposición a MEHP sobre la proliferación en células LNCaP. B) Efecto de la exposición a MEHP sobre la proliferación en células PC3. El ensayo se realizó mediante la técnica de MTT. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%, como control positivo se utilizó SFB al 10% y DHT 1nM.

9.6 Efecto de la exposición a MEHP sobre la migración celular

Posteriormente se realizaron ensayos de cierre de herida con la finalidad de conocer si la exposición a MEHP tiene un efecto sobre la migración celular. Células LNCaP fueron expuestas a diferentes concentraciones de MEHP por 120 horas en las cuales se analizó el cierre de la herida en comparación con el vehículo. En la concentración de 10 μM de MEHP se observó una tendencia al aumento de la migración celular, sin embargo, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas (**Figura 16**).

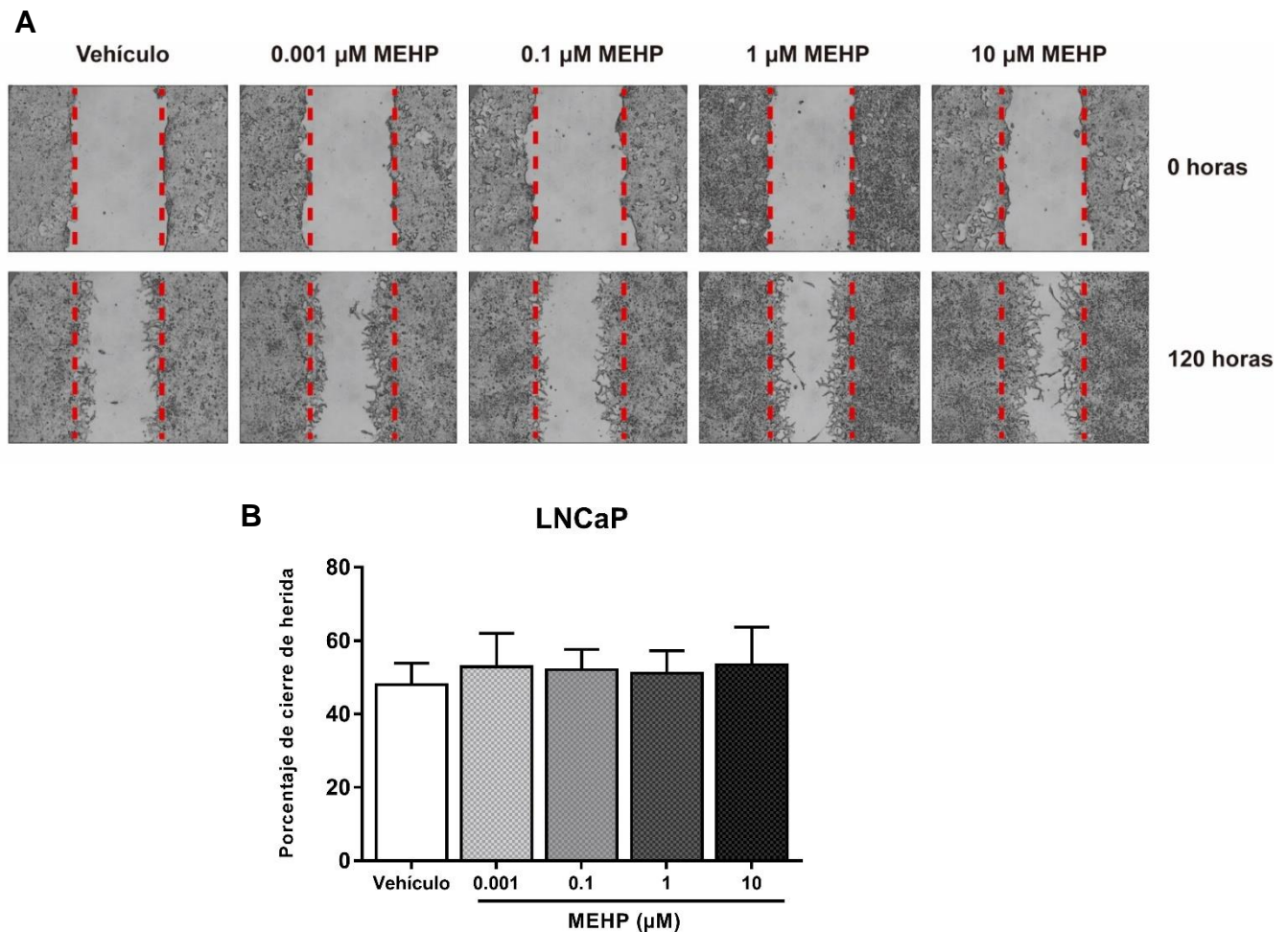


Figura 16. Efecto de la exposición a MEHP sobre la migración en células LNCaP. A) Imágenes representativas de ensayo de herida en células LNCaP expuestas a MEHP por 120 horas. B) Porcentaje de cierre de herida en células LNCaP expuestas a MEHP por 120 horas. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

Debido a la mayor capacidad de migración en células PC3 en comparación con células LNCaP, el ensayo de cierre de herida en células PC3 se realizó sólo durante 72 horas. La exposición a MEHP no mostró efectos significativos sobre la migración celular (**Figura 17**).

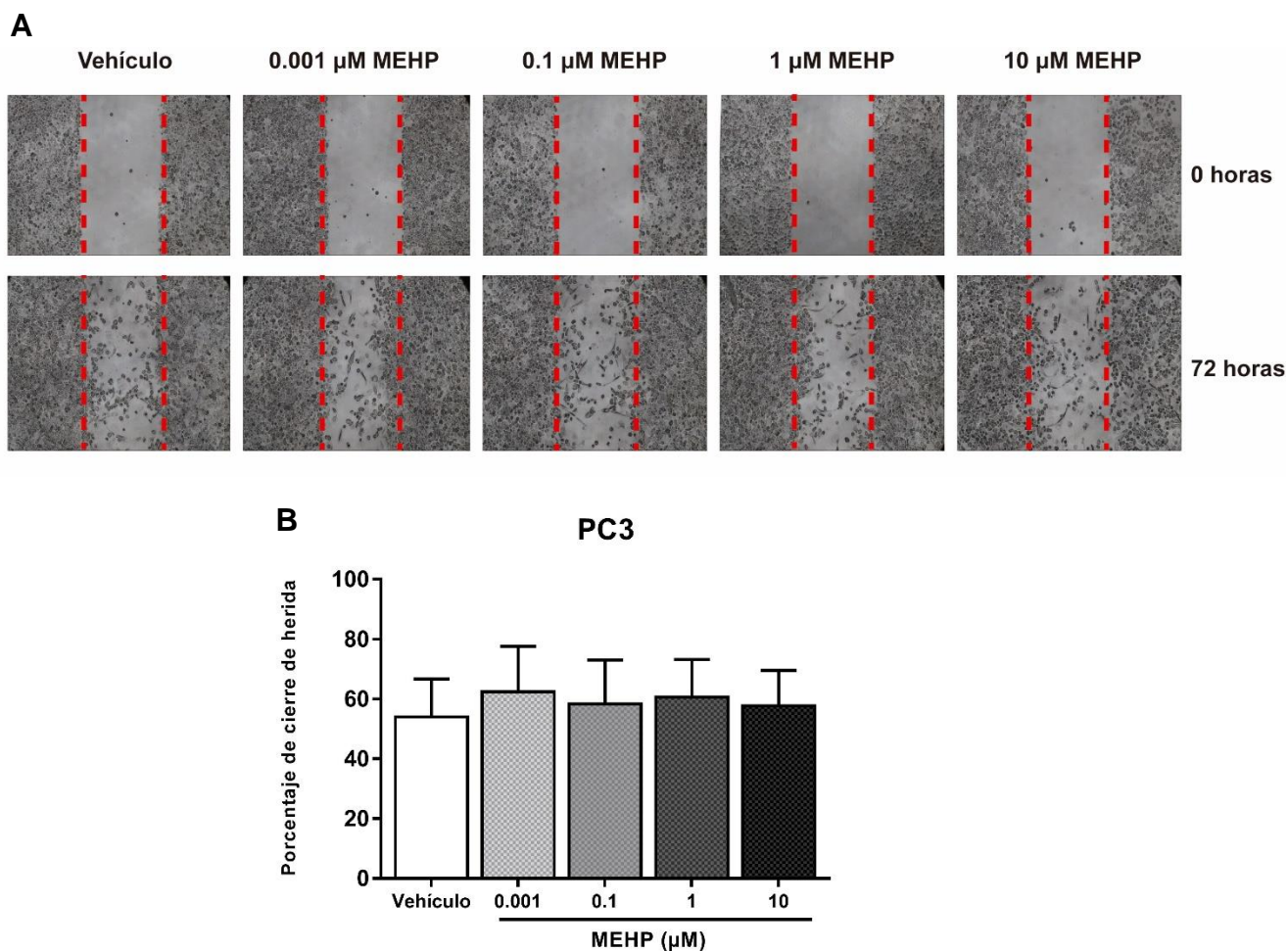


Figura 17. Efecto de la exposición a MEHP sobre la migración en células PC3. A) Imágenes representativas de ensayo de herida en células PC3 expuestas a MEHP por 72 horas. B) Porcentaje de cierre de herida en células PC3 expuestas a MEHP por 72 horas. La comparación se realizó respecto al vehículo que corresponde a DMSO al 0.1%.

10. Discusión

La exposición a diversos disruptores endocrinos incluidos los ftalatos se ha asociado con la progresión de diversos tipos de cáncer, incluido el de próstata (Buoso et al., 2020; Chuang et al., 2020). Recientemente se ha descrito que los ftalatos pueden inducir alteraciones en la expresión de los reguladores epigenéticos sirtuinas. Las sirtuinas conforman la familia de desacetilasas de histonas de clase III dependientes de NAD⁺. SIRT1 es la sirtuina más ampliamente estudiada en el contexto del cáncer. SIRT1 tiene una expresión diferencial en diversos tipos de cáncer, donde muestra propiedades oncogénicas y supresoras de tumores según el contexto celular (Carafa et al., 2019). En cáncer de próstata la expresión y actividad de SIRT1 es controversial, sin embargo, la evidencia apunta a la actividad promotora de tumores en este tipo de cáncer (S. B. Huang et al., 2021).

La regulación positiva de SIRT1 se ha demostrado en diversos tipos de cáncer, incluido el de próstata. En este estudio, utilizando bases de datos *in silico* se observó que SIRT1 se sobreexpresa en tejidos de cáncer de próstata, datos similares a lo reportado previamente en muestras de tejido humano (Huffman et al., 2007), en modelos animales de la enfermedad (Kuzmichev et al., 2005), así como en líneas celulares de cáncer de próstata (Jung-Hynes et al., 2009). La sobreexpresión de SIRT1 se ha asociado con la progresión tumoral, resistencia a la quimioterapia y al desarrollo de la diferenciación neuroendocrina (S. B. Huang et al., 2021; Kojima et al., 2008; Ruan et al., 2018). En este estudio se propuso analizar el efecto de MEHP sobre la expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata y analizar su relación con la progresión tumoral.

Inicialmente para evaluar el efecto de MEHP sobre la viabilidad celular, se utilizó un amplio rango de concentraciones (0.001-100 μ M). Para la elección de estas concentraciones se utilizó como referencia la definición de dosis bajas para los químicos disruptores endocrinos según el Programa Nacional de Toxicología de Estados Unidos, el cual define a dosis bajas a aquellas concentraciones reportadas en exposiciones humanas o dosis más bajas a las utilizadas típicamente en ensayos toxicológicos (Melnick et al., 2002). Además, como algunos químicos disruptores

endocrinos tienen un patrón de relación dosis-respuesta no monotónica (Lagarde et al., 2015), se decidió utilizar un amplio rango de concentraciones. Los resultados de los ensayos de viabilidad celular mostraron que concentraciones superiores a 20 μM de MEHP tienen un impacto negativo sobre la viabilidad, independientemente de la línea celular. Estos resultados están en línea con lo reportado por Yong et al., 2016. No obstante, en el estudio de Erkekoğlu et al., 2010 la exposición a 3 μM de MEHP a partir de las 24 horas ya representó un efecto negativo sobre la viabilidad celular. Estas diferencias podrían atribuirse a la metodología utilizada para evaluar la viabilidad celular.

La alteración en la expresión de las sirtuinas por exposición a disruptores endocrinos ya se ha descrito previamente, Park et al., 2019 reportaron que la exposición a MEHP por 24 horas disminuye la expresión de todas las sirtuinas de mamífero (SIRT1-7) en macrófagos. En el presente estudio se analizó por primera vez el efecto de MEHP sobre la expresión de SIRT1 en líneas celulares de cáncer de próstata. La exposición a MEHP por 24 horas no afectó la expresión de SIRT1. Sin embargo, en estudios previos igualmente la expresión de SIRT1 no se vio afectada por la exposición a ftalatos durante 24 horas. En el estudio de J. Zhang et al., 2015, las alteraciones en la expresión de SIRT1 se observaron a partir de las 48 horas de exposición a ftalatos. Por lo tanto, se planteó la hipótesis de que la expresión SIRT1 pudiera afectarse por exposición prolongada a MEHP y se decidió evaluar el efecto de MEHP hasta por 120 horas. La exposición a MEHP durante 72 horas mostró un aumento en la expresión génica de SIRT1 en células LNCaP y PC3. No obstante, la expresión proteica de SIRT1 no se vio alterada por MEHP.

Comúnmente la abundancia de mRNA y en particular las diferencias significativas en la expresión de mRNA se utilizan como sustitutos de las cantidades y actividad de las proteínas. Sin embargo, los niveles de mRNA y proteína no siempre se correlacionan (Tian et al., 2004). Estas diferencias podrían atribuirse a la regulación entre la transcripción y el producto proteico. La producción y el mantenimiento en los niveles de las proteínas se regula a través de diversos procesos vinculados que incluyen la transcripción, el procesamiento y la degradación de los mRNA hasta la

traducción, localización, modificación y destrucción programada de las propias proteínas (Vogel & Marcotte, 2012). Con base en los hallazgos en este estudio, MEHP favorece el incremento en la expresión de mRNA SIRT1, sin embargo, algún mecanismo posterior a la transcripción de este gen atenúa los efectos e impide el aumento en la expresión de la proteína.

La expresión de SIRT1 está regulada por varios factores de transcripción, miRNAs, modificaciones postranscripcionales y modificaciones postraduccionales que incluyen sumoilación y ubiquitinación (Karbasforooshan et al., 2018; Kong et al., 2015; Peng et al., 2015; L. Yu et al., 2020). Se ha descrito que el tratamiento con algunos compuestos como manganeso y antimonio promueven la degradación de la proteína SIRT1, a la vez que vías de señalización de MAPK se activan, por lo que la activación de estas vías se propuso como posible mecanismo de la degradación de SIRT1 (Zhao et al., 2018; Zhao, Liu, et al., 2019). Posteriormente se describió que la activación de la quinasa c-Jun N-terminal 1 (JNK1) también puede regular la expresión de la proteína SIRT1 al inducir fosforilación de la proteína y promover su degradación (Gao et al., 2011; Zhao, Wu, et al., 2019). Interesantemente, se ha reportado que los ftalatos como DEHP, precursor de MEHP promueve la activación de JNK a través de un aumento de ROS (Yuanyuan Huang et al., 2019). Además, está ampliamente descrito que MEHP induce el aumento de ROS (Erkekoğlu et al., 2011; Park et al., 2019). Por lo tanto, es posible que la exposición a MEHP favorezca el incremento de ROS, así como la activación de JNK, mientras que JNK puede fosforilar SIRT1 y promover su degradación. Posiblemente a través de este mecanismo se favorece la degradación de SIRT1 y por consiguiente no se observen cambios en los niveles de expresión de la proteína SIRT1. Si bien este es un mecanismo posible que explique este fenómeno, en el presente trabajo no fue evaluado. Se necesitan más estudios para examinar si este mecanismo de modificación postraducciona regula los niveles de la proteína SIRT1 en la exposición a MEHP.

Por otra parte, se ha informado que MEHP tiene un papel relevante en la progresión de diversos tipos de cáncer. Específicamente, se ha demostrado que MEHP induce

migración e invasión celular en cáncer de ovario (Leng et al., 2021), cáncer colorrectal (Luo et al., 2018), cáncer testicular (P.-L. Yao et al., 2012) y melanoma (Fan et al., 2020). El ensayo de cicatrización de herida es un método ampliamente aceptado y utilizado para observar la capacidad de las células tumorales para realizar migración celular (Grada et al., 2017). En el presente estudio, se evaluó el efecto de MEHP sobre la migración celular por ensayos de cicatrización de herida. Los resultados mostraron una tendencia al aumento en la migración celular en células LNCaP expuestas a 10 μ M de MEHP, sin embargo, el cambio no fue estadísticamente significativo. Por lo tanto, MEHP no induce migración celular en células de cáncer de próstata.

En algunos tipos de cáncer como el cáncer oral (M. Wang et al., 2019), cáncer de mama (Crobeddu et al., 2019) y cáncer cervical (W. Yang et al., 2018) MEHP induce proliferación celular, por lo tanto, en este estudio se decidió evaluar el efecto de MEHP sobre la proliferación celular. En células LNCaP la exposición a MEHP no mostró efectos sobre la proliferación celular. En cambio, en células PC3 la exposición a 1 y 10 μ M de MEHP mostró efecto negativo sobre la proliferación celular, efecto opuesto al esperado. Sin embargo, previamente ya se había reportado que la exposición a DEHP también podría favorecer la inhibición del ciclo celular con la consecuente disminución de la proliferación celular de células de cáncer de próstata (Hrubá et al., 2014). Además, en líneas celulares de feocromocitoma PC12 el MEHP indujo la detención del ciclo celular y disminución en la proliferación celular, atribuyéndose al incremento del estrés oxidativo (T. Chen et al., 2011). Estudios han demostrado que el estrés oxidativo conduce a alteraciones en la proliferación celular normal y la apoptosis (Chiu & Dawes, 2012). Específicamente, las ROS están involucradas en la progresión y proliferación del ciclo celular, además de la apoptosis. Por un lado, altas concentraciones de ROS pueden promover un ambiente antitumoral al desencadenar detención del ciclo celular, senescencia o muerte celular por estrés oxidativo, pero las ROS también puede actuar como reguladores positivos de la proliferación y supervivencia de las células cancerígenas en concentraciones menores (Perillo et al., 2020; Reczek & Chandel, 2017). Además de que ROS también puede inducir estrés genotóxico

(Srinivas et al., 2019). Como ya se había mencionado previamente MEHP es un potente inductor de ROS en células de cáncer de próstata (Erkekoğlu et al., 2011). Por lo tanto, a pesar de que en el presente estudio no se analizó en qué fase del ciclo celular se encuentran las células por exposición a MEHP, así como el efecto que este pudiera ejercer sobre el daño al DNA, es posible que MEHP promueva el aumento de estrés oxidativo, inhibición del ciclo celular, aumento del daño al DNA y favorezca la acumulación de mutaciones, evento crítico para la progresión del cáncer. Sin embargo, se necesitan más estudios para analizar dicho mecanismo. Este estudio demostró ser un enfoque valioso para estudiar los mecanismos moleculares de MEHP en las células de cáncer de próstata; sin embargo, aún se necesitan más investigaciones.

11. Conclusiones

La exposición a altas concentraciones de MEHP tiene efectos perjudiciales sobre la viabilidad de líneas celulares de cáncer de próstata.

El MEHP induce la expresión del transcrito de SIRT1, sin embargo, la expresión de la proteína SIRT1 no se vio afectada.

La exposición a MEHP muestra una tendencia positiva sobre la migración celular, sin embargo, este efecto no es estadísticamente significativo.

En células PC3, altas concentraciones de MEHP se asociaron con menor proliferación celular.

12. Perspectivas

Evaluar el efecto de la exposición a MEHP en líneas celulares de cáncer de próstata a través de herramientas moleculares masivas de nueva generación para la identificación de posibles genes y proteínas blanco. Evaluar la asociación entre los niveles de metabolitos de ftalatos en orina y parámetros clínicos de pacientes con cáncer de próstata.

13. Referencias

- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular genetics of prostate cancer. *Genes & Development*, 14(19), 2410–2434. <https://doi.org/10.1101/GAD.819500>
- Aditya, R., Kiran, A. R., Varma, D. S., Vemuri, R., & Gundamaraju, R. (2017). A Review on SIRTuins in Diabetes. *Current Pharmaceutical Design*, 23(16). <https://doi.org/10.2174/1381612823666170125153334>
- Ahmed, H. U., Bosaily, A. E.-S., Brown, L. C., Gabe, R., Kaplan, R., Parmar, M. K., Collaco-Moraes, Y., Ward, K., Hindley, R. G., Freeman, A., Kirkham, A. P., Oldroyd, R., Parker, C., & Emberton, M. (2017). Diagnostic accuracy of multi-parametric MRI and TRUS biopsy in prostate cancer (PROMIS): a paired validating confirmatory study. *The Lancet*, 389(10071), 815–822. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)32401-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32401-1)
- Akin, L., Kendirci, M., Narin, F., Kurtoglu, S., Hatipoglu, N., & Elmali, F. (2020). Endocrine Disruptors and Polycystic Ovary Syndrome: Phthalates. *Journal of Clinical Research in Pediatric Endocrinology*, 12(4), 393. <https://doi.org/10.4274/JCRPE.GALENOS.2020.2020.0037>
- Albro, P., & Lavenhar, S. (1989). Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metabolism Reviews*, 21(1), 13–34. <https://doi.org/10.3109/03602538909029953>
- Araki, A., & Jensen, T. K. (2020). *Endocrine-Distributing Chemicals and Reproductive Function*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-0520-1_5
- Audia, J. E., & Campbell, R. M. (2016). Histone Modifications and Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A019521>
- Awad, D., Pulliam, T. L., Lin, C., Wilkenfeld, S. R., & Frigo, D. E. (2018). Delineation of the androgen-regulated signaling pathways in prostate cancer facilitates the development of novel therapeutic approaches. *Current Opinion in Pharmacology*, 41, 1. <https://doi.org/10.1016/J.COPH.2018.03.002>
- Bauer, M. J., & Herrmann, R. (1997). Estimation of the environmental contamination by phthalic acid esters leaching from household wastes. *Science of The Total Environment*, 208(1–2), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(97\)00272-6](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(97)00272-6)
- Bechis, S. K., Carroll, P. R., & Cooperberg, M. R. (2011). Impact of Age at Diagnosis on Prostate Cancer Treatment and Survival. *Journal of Clinical Oncology*, 29(2), 235. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.30.2075>
- Benjamin, S., Masai, E., Kamimura, N., Takahashi, K., Anderson, R. C., & Faisal, P. A. (2017). Phthalates impact human health: Epidemiological evidences and plausible mechanism of action. *Journal of Hazardous Materials*, 340, 360–383. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2017.06.036>
- Brawer, M. K. (2005). Prostatic Intraepithelial Neoplasia: An Overview. *Reviews in Urology*, 7(Suppl 3), S11. [/pmc/articles/PMC1477603/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1477603/)

- Brock, M., Bodman, C. von, Palisaar, J., Becker, W., Martin-Seidel, P., & Noldus, J. (2015). Detecting Prostate Cancer: A Prospective Comparison of Systematic Prostate Biopsy With Targeted Biopsy Guided by Fused MRI and Transrectal Ultrasound. *Deutsches Ärzteblatt International*, 112(37), 605. <https://doi.org/10.3238/ARZTEBL.2015.0605>
- Buoso, E., Masi, M., Racchi, M., & Corsini, E. (2020). Endocrine-Disrupting Chemicals' (EDCs) Effects on Tumour Microenvironment and Cancer Progression: Emerging Contribution of RACK1. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(23), 1–27. <https://doi.org/10.3390/IJMS21239229>
- Byles, V., Zhu, L., Lovaas, J. D., Chmielewski, L. K., Wang, J., Faller, D. V., & Dai, Y. (2012). SIRT1 induces EMT by cooperating with EMT transcription factors and enhances prostate cancer cell migration and metastasis. *Oncogene*, 31(43), 4619. <https://doi.org/10.1038/ONC.2011.612>
- Byles, Vanessa, Chmielewski, L. K., Wang, J., Zhu, L., Forman, L. W., Faller, D. V., & Dai, Y. (2010). Aberrant Cytoplasm Localization and Protein Stability of SIRT1 is Regulated by PI3K/IGF-1R Signaling in Human Cancer Cells. *International Journal of Biological Sciences*, 6(6), 599. <https://doi.org/10.7150/IJBS.6.599>
- Carafa, V., Altucci, L., & Nebbioso, A. (2019). Dual Tumor Suppressor and Tumor Promoter Action of Sirtuins in Determining Malignant Phenotype. *Frontiers in Pharmacology*, 10(JAN). <https://doi.org/10.3389/FPHAR.2019.00038>
- Celma, A., Servián, P., Planas, J., Placer, J., Quilez, M. T., Arbós, M. A., De Torres, I., & Morote, J. (2014). Clinical Significance of Proliferative Inflammatory Atrophy in Prostate Biopsy. *Actas Urológicas Españolas*, 38(2), 122–126. <https://doi.org/10.1016/J.ACUIRO.2013.04.008>
- Chalkiadaki, A., & Guarente, L. (2015). The multifaceted functions of sirtuins in cancer. *Nature Reviews Cancer* 2015 15:10, 15(10), 608–624. <https://doi.org/10.1038/nrc3985>
- Chauvigné, F., Menuet, A., Lesné, L., Chagnon, M.-C., Chevrier, C., Regnier, J.-F., Angerer, J., & Jégou, B. (2009). Time- and Dose-Related Effects of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Its Main Metabolites on the Function of the Rat Fetal Testis in Vitro. *Environmental Health Perspectives*, 117(4), 515–521. <https://doi.org/10.1289/EHP.11870>
- Chen, F., & Zhao, X. (2013). Prostate Cancer: Current Treatment and Prevention Strategies. *Iranian Red Crescent Medical Journal*, 15(4), 279. <https://doi.org/10.5812/IRCMJ.6499>
- Chen, H.-P., Lee, Y.-K., Huang, S. Y., Shi, P.-C., Hsu, P.-C., & Chang, C.-F. (2018). Phthalate exposure promotes chemotherapeutic drug resistance in colon cancer cells. *Oncotarget*, 9(17), 13167. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23481>
- Chen, J., Cao, L., Li, Z., & Li, Y. (2019). SIRT1 promotes GLUT1 expression and bladder cancer progression via regulation of glucose uptake. *Human Cell*, 32(2), 193–201. <https://doi.org/10.1007/S13577-019-00237-5/FIGURES/4>
- Chen, N., & Zhou, Q. (2016). The evolving Gleason grading system. *Chinese Journal of Cancer Research*, 28(1), 58. <https://doi.org/10.3978/J.ISSN.1000-9604.2016.02.04>
- Chen, T., Yang, W., Li, Y., Chen, X., & Xu, S. (2011). Mono-(2-ethylhexyl) phthalate impairs

- neurodevelopment: Inhibition of proliferation and promotion of differentiation in PC12 cells. *Toxicology Letters*, 201(1), 34–41. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2010.12.002>
- Chen, Y.-H., Wu, Y.-J., Chen, W.-C., Lee, T.-S., Tsou, T.-C., Chang, H.-C., Lo, S.-W., & Chen, S.-L. (2020). MEHP interferes with mitochondrial functions and homeostasis in skeletal muscle cells. *Bioscience Reports*, 40(4). <https://doi.org/10.1042/BSR20194404>
- Chiang, H., Kuo, Y.-T., Shen, C.-C., Lin, Y.-H., Wang, S.-L., & Tsou, T.-C. (2014). Mono(2-ethylhexyl)phthalate accumulation disturbs energy metabolism of fat cells. *Archives of Toxicology* 2014 90:3, 90(3), 589–601. <https://doi.org/10.1007/S00204-014-1446-9>
- Chiu, J., & Dawes, I. W. (2012). Redox control of cell proliferation. *Trends in Cell Biology*, 22(11), 592–601. <https://doi.org/10.1016/J.TCB.2012.08.002>
- Chrun, E. S., Modolo, F., & Daniel, F. I. (2017). Histone modifications: A review about the presence of this epigenetic phenomenon in carcinogenesis. *Pathology - Research and Practice*, 213(11), 1329–1339. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2017.06.013>
- Chuang, S. C., Chen, H. C., Sun, C. W., Chen, Y. A., Wang, Y. H., Chiang, C. J., Chen, C. C., Wang, S. L., Chen, C. J., & Hsiung, C. A. (2020). Phthalate exposure and prostate cancer in a population-based nested case-control study. *Environmental Research*, 181, 108902. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2019.108902>
- Crobeddu, B., Ferraris, E., Kolasa, E., & Plante, I. (2019). Di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) increases proliferation of epithelial breast cancer cells through progesterone receptor dysregulation. *Environmental Research*, 173, 165–173. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2019.03.037>
- Cui, Y., Li, J., Zheng, F., Ouyang, Y., Chen, X., Zhang, L., Chen, Y., Wang, L., Mu, S., & Zhang, H. (2016). Effect of SIRT1 Gene on Epithelial-Mesenchymal Transition of Human Prostate Cancer PC-3 Cells. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22(1), 380. <https://doi.org/10.12659/MSM.895312>
- Dai, C., Heemers, H., & Sharifi, N. (2017). Androgen Signaling in Prostate Cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030452>
- Dai, Y., Ngo, D., Forman, L. W., Qin, D. C., Jacob, J., & Faller, D. V. (2007). Sirtuin 1 is required for antagonist-induced transcriptional repression of androgen-responsive genes by the androgen receptor. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 21(8), 1807–1821. <https://doi.org/10.1210/ME.2006-0467>
- Descotes, J.-L. (2019). Diagnosis of prostate cancer. *Asian Journal of Urology*, 6(2), 129. <https://doi.org/10.1016/J.AJUR.2018.11.007>
- Di Sante, G., Pestell, T. G., Casimiro, M. C., Bisetto, S., Powell, M. J., Lisanti, M. P., Cordon-Cardo, C., Castillo-Martin, M., Bonal, D. M., Debattisti, V., Chen, K., Wang, L., He, X., McBurney, M. W., & Pestell, R. G. (2015). Loss of Sirt1 Promotes Prostatic Intraepithelial Neoplasia, Reduces Mitophagy, and Delays Park2 Translocation to Mitochondria. *The American Journal of Pathology*, 185(1), 266. <https://doi.org/10.1016/J.AJPATH.2014.09.014>

- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.-P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293. <https://doi.org/10.1210/ER.2009-0002>
- Duan, K., Ge, Y. C., Zhang, X. P., Wu, S. Y., Feng, J. S., Chen, S. L., Zhang, L., Yuan, Z. H., & Fu, C. H. (2015). miR-34a inhibits cell proliferation in prostate cancer by downregulation of SIRT1 expression. *Oncology Letters*, 10(5), 3223. <https://doi.org/10.3892/OL.2015.3645>
- Duty, S. M., Ackerman, R. M., Calafat, A. M., & Hauser, R. (2005). Personal Care Product Use Predicts Urinary Concentrations of Some Phthalate Monoesters. *Environmental Health Perspectives*, 113(11), 1530. <https://doi.org/10.1289/EHP.8083>
- Encarnação, T., Pais, A. A., Campos, M. G., & Burrows, H. D. (2019). Endocrine disrupting chemicals: Impact on human health, wildlife and the environment: <https://doi.org/10.1177/0036850419826802>, 102(1), 3–42. <https://doi.org/10.1177/0036850419826802>
- Epstein, J. I., Zelefsky, M. J., Sjoberg, D. D., Nelson, J. B., Egevad, L., Magi-Galluzzi, C., Vickers, A. J., Parwani, A. V., Reuter, V. E., Fine, S. W., Eastham, J. A., Wiklund, P., Han, M., Reddy, C. A., Ciezki, J. P., Nyberg, T., & Klein, E. A. (2016). A Contemporary Prostate Cancer Grading System: A Validated Alternative to the Gleason Score. *European Urology*, 69(3), 428. <https://doi.org/10.1016/J.EURURO.2015.06.046>
- Erkekoğlu, P., Rachidi, W., De Rosa, V., Giray, B., Favier, A., & Hincal, F. (2010). Protective effect of selenium supplementation on the genotoxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate treatment in LNCaP cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 49(4), 559–566. <https://doi.org/10.1016/J.FREERADBIOMED.2010.04.038>
- Erkekoğlu, P., Rachidi, W., Yüzügüllü, O. G., Giray, B., Öztürk, M., Favier, A., & Hincal, F. (2011). Induction of ROS, p53, p21 in DEHP- and MEHP-exposed LNCaP cells-protection by selenium compounds. *Food and Chemical Toxicology*, 49(7), 1565–1571. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2011.04.001>
- Estebanez, J., Teyrouz, A., Gutierrez, M. A., Linazasoro, I., Belloso, J., Cano, C., & Peralta, J. M. (2014). Natural history of prostate cancer. *Arch Esp Urol*, 67(5), 383–387. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24914836/>
- Esteller, M. (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genetics* 2007 8:4, 8(4), 286–298. <https://doi.org/10.1038/nrg2005>
- Evans, A. J. (2018). Treatment effects in prostate cancer. *Modern Pathology* 2018 31:1, 31(1), 110–121. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2017.158>
- Fabiani, R., Minelli, L., Bertarelli, G., & Bacci, S. (2016). A Western Dietary Pattern Increases Prostate Cancer Risk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Nutrients*, 8(10). <https://doi.org/10.3390/NU8100626>
- Fan, P., Li, Z., Zuo, C., & Fang, M. (2020). Promotion effects of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) on migration and invasion of human melanoma cells via activation of TGF- β signals. *Cell Biochemistry and Function*, 38(1), 38–46. <https://doi.org/10.1002/CBF.3447>

- Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Parkin, D. M., Piñeros, M., Znaor, A., & Bray, F. (2021). Cancer statistics for the year 2020: An overview. *International Journal of Cancer*, *149*(4), 778–789. <https://doi.org/10.1002/IJC.33588>
- Frye, C., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M., Fusani, L., Kah, O., Kajta, M., Page, Y. Le, Patisaul, H. B., Venerosi, A., Wojtowicz, A. K., & Panzica, G. C. (2012). ENDOCRINE DISRUPTERS: A REVIEW OF SOME SOURCES, EFFECTS, AND MECHANISMS OF ACTIONS ON BEHAVIOR AND NEUROENDOCRINE SYSTEMS. *Journal of Neuroendocrinology*, *24*(1), 144. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2826.2011.02229.X>
- Frye, R. A. (2000). Phylogenetic Classification of Prokaryotic and Eukaryotic Sir2-like Proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *273*(2), 793–798. <https://doi.org/10.1006/BBRC.2000.3000>
- Fu, M., Liu, M., Sauve, A. A., Jiao, X., Zhang, X., Wu, X., Powell, M. J., Yang, T., Gu, W., Avantiaggiati, M. L., Pattabiraman, N., Pestell, T. G., Wang, F., Quong, A. A., Wang, C., & Pestell, R. G. (2006). Hormonal Control of Androgen Receptor Function through SIRT1. *Molecular and Cellular Biology*, *26*(21), 8122. <https://doi.org/10.1128/MCB.00289-06>
- Fujita, Y., Kojima, K., Hamada, N., Ohhashi, R., Akao, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., & Ito, M. (2008). Effects of miR-34a on cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *377*(1), 114–119. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.09.086>
- Furesi, G., Rauner, M., & Hofbauer, L. C. (2021). Emerging Players in Prostate Cancer–Bone Niche Communication. *Trends in Cancer*, *7*(2), 112–121. <https://doi.org/10.1016/J.TRECAN.2020.09.006>
- Gandaglia, G., Abdollah, F., Schiffmann, J., Trudeau, V., Shariat, S. F., Kim, S. P., Perrotte, P., Montorsi, F., Briganti, A., Trinh, Q.-D., Karakiewicz, P. I., & Sun, M. (2014). Distribution of metastatic sites in patients with prostate cancer: A population-based analysis. *The Prostate*, *74*(2), 210–216. <https://doi.org/10.1002/PROS.22742>
- Gao, Z., Zhang, J., Kheterpal, I., Kennedy, N., Davis, R. J., & Ye, J. (2011). Sirtuin 1 (SIRT1) Protein Degradation in Response to Persistent c-Jun N-terminal Kinase 1 (JNK1) Activation Contributes to Hepatic Steatosis in Obesity. *The Journal of Biological Chemistry*, *286*(25), 22227. <https://doi.org/10.1074/JBC.M111.228874>
- Garisto, J. D., & Klotz, L. (2017). *Active Surveillance for Prostate Cancer: How to Do It Right - PubMed*. *31*(5), 333–345.
- German, N. J., & Haigis, M. C. (2015). Sirtuins and the metabolic hurdles in cancer. *Current Biology : CB*, *25*(13), R569. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.05.012>
- Gleason, D. F., Mellinger, G. T., & Ardvig, L. J. (1974). Prediction of prognosis for prostatic adenocarcinoma by combined histological grading and clinical staging. *Journal of Urology*, *111*(1), 58–64. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)59889-4](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)59889-4)
- González-Castro, M. I., Olea-Serrano, M. F., Rivas-Velasco, A. M., Medina-Rivero, E., Ordoñez-Acevedo, L. G., & De León-Rodríguez, A. (2011). Phthalates and bisphenols migration in Mexican food cans and

- plastic food containers. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 86(6), 627–631.
<https://doi.org/10.1007/S00128-011-0266-3>
- Grada, A., Otero-Vinas, M., Prieto-Castrillo, F., Obagi, Z., & Falanga, V. (2017). Research Techniques Made Simple: Analysis of Collective Cell Migration Using the Wound Healing Assay. *Journal of Investigative Dermatology*, 137(2), e11–e16. <https://doi.org/10.1016/J.JID.2016.11.020>
- Guo, S., Zhang, B., Qi, W., Cao, X., Xu, Y., Zhang, X., Li, X., Zhou, L., & Ye, L. (2021). Role of estrogen receptor alpha in MEHP-induced proliferation and invasion of SH-SY5Y cells. *Toxicology*, 453, 152734. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2021.152734>
- Gutiérrez-García, A. K., Choudhury, M., & Leon-Rodriguez, A. De. (2019). Diisononyl Phthalate Differentially Affects Sirtuin Expression in the HepG2 Cell Line. *Chemical Research in Toxicology*, 32(9), 1863–1870. <https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00206>
- Haigis, M. C., & Sinclair, D. A. (2010). Mammalian Sirtuins: Biological Insights and Disease Relevance. *Annual Review of Pathology*, 5, 253. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.PATHOL.4.110807.092250>
- Hamilton, W., & Sharp, D. (2004). Symptomatic diagnosis of prostate cancer in primary care: a structured review. *The British Journal of General Practice*, 54(505), 617. <https://doi.org/10.1136/bmj.bm1324>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. In *Cell* (Vol. 144, Issue 5, pp. 646–674). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, C., Cheng, X., Xia, H., & Ma, X. (2012). The endocrine disruptor mono-(2-ethylhexyl)phthalate promotes adipocyte differentiation and induces obesity in mice. *Bioscience Reports*, 32(6), 619. <https://doi.org/10.1042/BSR20120042>
- Harper, C. E., Patel, B. B., Wang, J., Arabshahi, A., Eltoum, I. A., & Lamartiniere, C. A. (2007). Resveratrol suppresses prostate cancer progression in transgenic mice. *Carcinogenesis*, 28(9), 1946–1953. <https://doi.org/10.1093/CARCIN/BGM144>
- Hauser, R., Meeker, J. D., Park, S., Silva, M. J., & Calafat, A. M. (2004). Temporal Variability of Urinary Phthalate Metabolite Levels in Men of Reproductive Age. *Environmental Health Perspectives*, 112(17), 1734. <https://doi.org/10.1289/EHP.7212>
- Hiller-Sturmhöfel, S., & Bartke, A. (1998). The Endocrine System: An Overview. *Alcohol Health and Research World*, 22(3), 153. <https://doi.org/10.1007/s12088-000-0000-0>
- Hippisley-Cox, J., & Coupland, C. (2021). Predicting the risk of prostate cancer in asymptomatic men: a cohort study to develop and validate a novel algorithm. *The British Journal of General Practice*, 71(706), e364. <https://doi.org/10.3399/BJGP20X714137>
- Hlišníková, H., Petrovičová, I., Kolena, B., Šidlovská, M., & Sirotkin, A. (2020). Effects and Mechanisms of Phthalates' Action on Reproductive Processes and Reproductive Health: A Literature Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 17(18), 1–37. <https://doi.org/10.3390/IJERPH17186811>

- Hopf, N. B., Berthet, A., Vernez, D., Langard, E., Spring, P., & Gaudin, R. (2014). Skin permeation and metabolism of di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *Toxicology Letters*, *224*(1), 47–53. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2013.10.004>
- Howitz, K. T., Bitterman, K. J., Cohen, H. Y., Lamming, D. W., Lavu, S., Wood, J. G., Zipkin, R. E., Chung, P., Kisielewski, A., Zhang, L. L., Scherer, B., & Sinclair, D. A. (2003). Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* *2003* *425*:6954, *425*(6954), 191–196. <https://doi.org/10.1038/nature01960>
- Hrubá, E., Pernicová, Z., Pálková, L., Souček, K., Vondráček, J., & Machala, M. (2014). Phthalates deregulate cell proliferation, but not neuroendocrine transdifferentiation, in human LNCaP prostate cancer cell model. *Folia Biol (Praha)*, *60*(1), 56–61. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25369342/>
- Huang, L.-P., Lee, C.-C., Hsu, P.-C., & Shih, T.-S. (2011). The association between semen quality in workers and the concentration of di(2-ethylhexyl) phthalate in polyvinyl chloride pellet plant air. *Fertility and Sterility*, *96*(1), 90–94. <https://doi.org/10.1016/J.FERTNSTERT.2011.04.093>
- Huang, S. B., Thapa, D., Munoz, A. R., Hussain, S. S., Yang, X., Bedolla, R. G., Osmulski, P., Gaczynska, M. E., Lai, Z., Chiu, Y. C., Wang, L. J., Chen, Y., Rivas, P., Shudde, C., Reddick, R. L., Miyamoto, H., Ghosh, R., & Kumar, A. P. (2021). Androgen deprivation-induced elevated nuclear SIRT1 promotes prostate tumor cell survival by reactivation of AR signaling. *Cancer Letters*, *505*, 24–36. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2021.02.008>
- Huang, Yiqiao, Jiang, X., Liang, X., & Jiang, G. (2018). Molecular and cellular mechanisms of castration resistant prostate cancer. *Oncology Letters*, *15*(5), 6063. <https://doi.org/10.3892/OL.2018.8123>
- Huang, Yuanyuan, Wu, C., Ye, Y., Zeng, J., Zhu, J., Li, Y., Wang, W., Zhang, W., Chen, Y., Xie, H., Zhang, H., & Liu, J. (2019). The Increase of ROS Caused by the Interference of DEHP with JNK/p38/p53 Pathway as the Reason for Hepatotoxicity. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, *16*(3). <https://doi.org/10.3390/IJERPH16030356>
- Huffman, D. M. (2012). Inhibition of cortactin and SIRT1 expression attenuates migration and invasion of prostate cancer DU145 cells. *International Journal of Urology*, *19*(1), 79–80. <https://doi.org/10.1111/J.1442-2042.2011.02915.X>
- Huffman, D. M., Grizzle, W. E., Bamman, M. M., Kim, J., Eltoum, I. A., Elgavish, A., & Nagy, T. R. (2007). SIRT1 Is Significantly Elevated in Mouse and Human Prostate Cancer. *Cancer Research*, *67*(14), 6612–6618. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0085>
- Hui, W. J., Jiao, C., Yong, W., Bin, X., Rong, W., Yan, Z., Xia, W. Q., Qi, S., Heng, Y. S., Hui, Z. Y., Yue, S. Z., Hui, W. J., Jiao, C., Yong, W., Bin, X., Rong, W., Yan, Z., Xia, W. Q., Qi, S., ... Yue, S. Z. (2017). Effect of Mono-2-ethylhexyl Phthalate on DNA Methylation in Human Prostate Cancer LNCaP Cells. *Biomedical and Environmental Sciences*, *2017*, Vol. 30, Issue 9, Pages: 641-648, *30*(9), 641–648. <https://doi.org/10.3967/BES2017.085>
- Humphrey, P. A. (2004). Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate. *Modern Pathology* *2004* *17*:3, *17*(3), 292–306. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800054>

- Huncharek, M., Haddock, K. S., Reid, R., & Kupelnick, B. (2010). Smoking as a Risk Factor for Prostate Cancer: A Meta-Analysis of 24 Prospective Cohort Studies. *American Journal of Public Health, 100*(4), 693. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2008.150508>
- Hur, J., & Giovannucci, E. (2020). Racial differences in prostate cancer: does timing of puberty play a role? *British Journal of Cancer 2020 123:3, 123*(3), 349–354. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0897-4>
- Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. <https://ensanut.insp.mx/encuestas/ensanut2012/informes.php>
- International Agency for Research on Cancer. (2021). *Cancer Today*. <https://gco.iarc.fr/today/home>
- International Programme on Chemical Safety. (2002). *Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/67357>
- Ito, Y., Kamijima, M., Hasegawa, C., Tagawa, M., Kawai, T., Miyake, M., Hayashi, Y., Naito, H., & Nakajima, T. (2014). Species and inter-individual differences in metabolic capacity of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) between human and mouse livers. *Environmental Health and Preventive Medicine, 19*(2), 117. <https://doi.org/10.1007/S12199-013-0362-6>
- Jaakkola, J. J. K., & Knight, T. L. (2008). The Role of Exposure to Phthalates from Polyvinyl Chloride Products in the Development of Asthma and Allergies: A Systematic Review and Meta-analysis. *Environmental Health Perspectives, 116*(7), 845. <https://doi.org/10.1289/EHP.10846>
- Jung-Hynes, B., Nihal, M., Zhong, W., & Ahmad, N. (2009). Role of Sirtuin Histone Deacetylase SIRT1 in Prostate Cancer: A TARGET FOR PROSTATE CANCER MANAGEMENT VIA ITS INHIBITION? *The Journal of Biological Chemistry, 284*(6), 3823. <https://doi.org/10.1074/JBC.M807869200>
- Jung-Hynes, B., Schmit, T. L., Reagan-Shaw, S. R., Siddiqui, I. A., Mukhtar, H., & Ahmad, N. (2011). Melatonin, a novel Sirt1 inhibitor, imparts anti-proliferative effects against prostate cancer in vitro in culture and in vivo in TRAMP model. *Journal of Pineal Research, 50*(2), 140. <https://doi.org/10.1111/J.1600-079X.2010.00823.X>
- Kalo, D., Vitorino Carvalho, A., Archilla, C., Duranthon, V., Moroldo, M., Levin, Y., Kupervaser, M., Smith, Y., & Roth, Z. (2019). Mono(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) induces transcriptomic alterations in oocytes and their derived blastocysts. *Toxicology, 421*, 59–73. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2019.04.016>
- Kanwal, R., Gupta, K., & Gupta, S. (2015). Cancer Epigenetics: An Introduction. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.), 1238*, 3–25. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1804-1_1
- Karantanos, T., Corn, P. G., & Thompson, T. C. (2013). Prostate cancer progression after androgen deprivation therapy: mechanisms of castrate resistance and novel therapeutic approaches. *Oncogene 2013 32:49, 32*(49), 5501–5511. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.206>
- Karbasforooshan, H., Roohbakhsh, A., & Karimi, G. (2018). SIRT1 and microRNAs: The role in breast, lung and prostate cancers. *Experimental Cell Research, 367*(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/J.YEXCR.2018.03.023>

- Kim, D.-H., Park, C. G., Kim, S. H., & Kim, Y. J. (2019). The Effects of Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) on Human Estrogen Receptor (hER) and Androgen Receptor (hAR) by YES/YAS In Vitro Assay. *Molecules*, 24(8). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES24081558>
- Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics* 2013 58:7, 58(7), 439–445. <https://doi.org/10.1038/jhg.2013.66>
- Kirby, M., Hirst, C., & Crawford, E. D. (2011). Characterising the castration-resistant prostate cancer population: a systematic review. *International Journal of Clinical Practice*, 65(11), 1180–1192. <https://doi.org/10.1111/J.1742-1241.2011.02799.X>
- Knudsen, B. S., & Vasioukhin, V. (2010). Mechanisms of Prostate Cancer Initiation and Progression. *Advances in Cancer Research*, 109(C), 1–50. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-380890-5.00001-6>
- Kojima, K., Fujita, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., & Ito, M. (2010). MiR-34a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory prostate cancer PC3 cells through direct and indirect mechanisms. *The Prostate*, 70(14), 1501–1512. <https://doi.org/10.1002/PROS.21185>
- Kojima, K., Ohhashi, R., Fujita, Y., Hamada, N., Akao, Y., Nozawa, Y., Deguchi, T., & Ito, M. (2008). A role for SIRT1 in cell growth and chemoresistance in prostate cancer PC3 and DU145 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(3), 423–428. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2008.06.045>
- Kong, L., Wu, H., Zhou, W., Luo, M., Tan, Y., Miao, L., & Cai, L. (2015). Sirtuin 1: A Target for Kidney Diseases. *Molecular Medicine*, 21(1), 87. <https://doi.org/10.2119/MOLMED.2014.00211>
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, 128(4), 693–705. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2007.02.005>
- Kumar, P., Sharad, S., Petrovics, G., Mohamed, A., Dobi, A., Sreenath, T. L., Srivastava, S., & Biswas, R. (2016). Loss of miR-449a in ERG-associated prostate cancer promotes the invasive phenotype by inducing SIRT1. *Oncotarget*, 7(16), 22791. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.8061>
- Kupis, W., Palyga, J., Tomal, E., & Niewiadomska, E. (2016). The role of sirtuins in cellular homeostasis. *Journal of Physiology and Biochemistry*, 72(3), 371. <https://doi.org/10.1007/S13105-016-0492-6>
- Kuzmichev, A., Margueron, R., Vaquero, A., Preissner, T. S., Scher, M., Kirmizis, A., Ouyang, X., Brockdorff, N., Abate-Shen, C., Farnham, P., & Reinberg, D. (2005). Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(6), 1859. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0409875102>
- La Merrill, M. A., Vandenberg, L. N., Smith, M. T., Goodson, W., Browne, P., Patisaul, H. B., Guyton, K. Z., Kortenkamp, A., Coglianò, V. J., Woodruff, T. J., Rieswijk, L., Sone, H., Korach, K. S., Gore, A. C., Zeise, L., & Zoeller, R. T. (2019). Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology* 2019 16:1, 16(1), 45–57. <https://doi.org/10.1038/s41574-019-0273-8>
- Lagarde, F., Beausoleil, C., Belcher, S. M., Belzunces, L. P., Emond, C., Guerbet, M., & Rousselle, C. (2015).

- Non-monotonic dose-response relationships and endocrine disruptors: a qualitative method of assessment. *Environmental Health*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/1476-069X-14-13>
- Lambert, A. W., Pattabiraman, D. R., & Weinberg, R. A. (2017). Emerging Biological Principles of Metastasis. *Cell*, 168(4), 670–691. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.11.037>
- Lambrot, R., Muczynski, V., Lécureuil, C., Angenard, G., Coffigny, H., Pairault, C., Moison, D., Frydman, R., Habert, R., & Rouiller-Fabre, V. (2009). Phthalates impair germ cell development in the human Fetal testis in vitro without change in testosterone production. *Environmental Health Perspectives*, 117(1), 32–37. <https://doi.org/10.1289/EHP.11146>
- Leng, J., Li, H., Niu, Y., Chen, K., Yuan, X., Chen, H., Fu, Z., Zhang, L., Wang, F., Chen, C., Héroux, P., Yang, J., Zhu, X., Lu, W., Xia, D., & Wu, Y. (2021). Low-dose mono(2-ethylhexyl) phthalate promotes ovarian cancer development through PPAR α -dependent PI3K/Akt/NF- κ B pathway. *Science of The Total Environment*, 790, 147990. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2021.147990>
- Li, G., Rivas, P., Bedolla, R., Thapa, D., Reddick, R. L., Ghosh, R., & Kumar, A. P. (2013). Dietary Resveratrol prevents development of high-grade prostatic intraepithelial neoplastic lesions: Involvement of SIRT1/S6K axis. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0349>
- Li, N., Liu, T., Guo, K., Zhu, J., Yu, G., Wang, S., & Ye, L. (2018). Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on proliferation of and steroid hormone synthesis in rat ovarian granulosa cells in vitro. *Journal of Cellular Physiology*, 233(4), 3629–3637. <https://doi.org/10.1002/JCP.26224>
- Li, Y. ling, Lv, J., Du, Z. ping, Feng, S., Sheng, J., Jin, Z. xiu, Liu, K. yong, Gao, H., Li, X. de, Cao, H. juan, Yang, L. sheng, Xu, D. xiang, Tao, F. biao, & Wang, Q. nan. (2020). The levels of phthalate exposure and associations with obesity in an elderly population in China. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110749. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.110749>
- Lind, P. M., Zethelius, B., & Lind, L. (2012). Circulating Levels of Phthalate Metabolites Are Associated With Prevalent Diabetes in the Elderly. *Diabetes Care*, 35(7), 1519. <https://doi.org/10.2337/DC11-2396>
- Litwin, M. S., & Tan, H.-J. (2017). The Diagnosis and Treatment of Prostate Cancer: A Review. *JAMA*, 317(24), 2532–2542. <https://doi.org/10.1001/JAMA.2017.7248>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/METH.2001.1262>
- Lo, P.-K., & Sukumar, S. (2008). Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics*, 9(12), 1879. <https://doi.org/10.2217/14622416.9.12.1879>
- Long, Q., Xu, J., Osunkoya, A. O., Sannigrahi, S., Johnson, B. A., Zhou, W., Gillespie, T., Park, J. Y., Nam, R. K., Sugar, L., Stanimirovic, A., Seth, A. K., Petros, J. A., & Moreno, C. S. (2014). Global transcriptome analysis of formalin-fixed prostate cancer specimens identifies biomarkers of disease recurrence. *Cancer Research*, 74(12), 3228. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2699>

- Lorber, M., Angerer, J., & Koch, H. M. (2009). A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to Di-2-ethylhexyl phthalate. *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 2010 20:1, 20(1), 38–53. <https://doi.org/10.1038/jes.2008.74>
- Lovaas, J. D., Zhu, L., Chiao, C. Y., Byles, V., Faller, D. V., & Dai, Y. (2013). SIRT1 Enhances Matrix Metalloproteinase-2 Expression and Tumor Cell Invasion in Prostate Cancer Cells. *The Prostate*, 73(5), 522–530. <https://doi.org/10.1002/PROS.22592>
- Luger, K., Dechassa, M. L., & Tremethick, D. J. (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(7), 436. <https://doi.org/10.1038/NRM3382>
- Luo, C.-W., Hsiao, I.-L., Wang, J.-Y., Wu, C.-C., Hung, W.-C., Lin, Y.-H., Chen, T.-Y., Hsu, Y.-C., Cheng, T.-L., & Pan, M.-R. (2018). Cell Motility Facilitated by Mono(2-ethylhexyl) Phthalate via Activation of the AKT– β -Catenin–IL-8 Axis in Colorectal Cancer. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(37), 9635–9644. <https://doi.org/10.1021/ACS.JAFC.8B03558>
- Madhav, A., Andres, A., Duong, F., Mishra, R., Haldar, S., Liu, Z., Angara, B., Gottlieb, R., Zumsteg, Z. S., & Bhowmick, N. A. (2018). Antagonizing CD105 enhances radiation sensitivity in prostate cancer. *Oncogene* 2018 37:32, 37(32), 4385–4397. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0278-0>
- Mandair, D., Rossi, R. E., Pericleous, M., Whyand, T., & Caplin, M. E. (2014). Prostate cancer and the influence of dietary factors and supplements: a systematic review. *Nutrition & Metabolism* 2014 11:1, 11(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/1743-7075-11-30>
- Martínez-Ibarra, A., Martínez-Razo, L. D., Vázquez-Martínez, E. R., Martínez-Cruz, N., Flores-Ramírez, R., García-Gómez, E., López-López, M., Ortega-González, C., Camacho-Arroyo, I., & Cerbón, M. (2019). Unhealthy Levels of Phthalates and Bisphenol A in Mexican Pregnant Women with Gestational Diabetes and Its Association to Altered Expression of miRNAs Involved with Metabolic Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(13), 3343. <https://doi.org/10.3390/IJMS20133343>
- Martínez-Razo, L., Martínez-Ibarra, A., Vázquez-Martínez, E., & Cerbón, M. (2021). The impact of Di-(2-ethylhexyl) Phthalate and Mono(2-ethylhexyl) Phthalate in placental development, function, and pathophysiology. *Environment International*, 146. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106228>
- Melnick, R., Lucier, G., Wolfe, M., Hall, R., Stancel, G., Prins, G., Gallo, M., Reuhl, K., Ho, S. M., Brown, T., Moore, J., Leakey, J., Haseman, J., & Kohn, M. (2002). Summary of the National Toxicology Program's report of the endocrine disruptors low-dose peer review. *Environmental Health Perspectives*, 110(4), 427. <https://doi.org/10.1289/EHP.02110427>
- Merriell, S. W. D., Funston, G., & Hamilton, W. (2018). Prostate Cancer in Primary Care. *Advances in Therapy*, 35(9), 1285. <https://doi.org/10.1007/S12325-018-0766-1>
- Moghadam, M. J. F., Taheri, S., & Peiravian, F. (2018). A Systematic Review of Clinical Practice Guidelines for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research : IJPR*, 17(Suppl), 17. [/pmc/articles/PMC5958321/](https://doi.org/10.1007/s12325-018-0766-1)

- Monneret, C. (2017). What is an endocrine disruptor? *Comptes Rendus Biologies*, 340(9–10), 403–405.
<https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2017.07.004>
- Nakane, K., Fujita, Y., Terazawa, R., Atsumi, Y., Kato, T., Nozawa, Y., Deguchi, T., & Ito, M. (2012). Inhibition of cortactin and SIRT1 expression attenuates migration and invasion of prostate cancer DU145 cells. *International Journal of Urology*, 19(1), 71–79. <https://doi.org/10.1111/J.1442-2042.2011.02888.X>
- National Center for Biotechnology Information. (2021). *Ftalato de bis (2-ethylhexilo) | C24H38O4 - PubChem*.
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8343>
- Nevedomskaya, E., Baumgart, S. J., & Haendler, B. (2018). Recent Advances in Prostate Cancer Treatment and Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(5).
<https://doi.org/10.3390/IJMS19051359>
- Nordeen, S. K., Su, L.-J., Osborne, G. A., Hayman, P. M., Orlicky, D. J., Wessells, V. M., Bokhoven, A. van, & Flaig, T. W. (2021). Titration of Androgen Signaling: How Basic Studies Have Informed Clinical Trials Using High-Dose Testosterone Therapy in Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Life*, 11(9).
<https://doi.org/10.3390/LIFE11090884>
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K. O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G. C., Look, K. J. W. Van, & Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1526), 2047. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2008.0242>
- Oliver, R., May, E., & Williams, J. (2005). The occurrence and removal of phthalates in a trickle filter STW. *Water Research*, 39(18), 4436–4444. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2005.08.011>
- Organización Mundial de la Salud. (2021, September 21). *Cáncer*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
- Packer, J. R., & Maitland, N. J. (2016). The molecular and cellular origin of human prostate cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1238–1260.
<https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.02.016>
- Park, M. H., Gutiérrez-García, A. K., & Choudhury, M. (2019). Mono-(2-ethylhexyl) Phthalate Aggravates Inflammatory Response via Sirtuin Regulation and Inflammasome Activation in RAW 264.7 Cells. *Chemical Research in Toxicology*, 32(5), 935–942.
<https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.9B00101>
- Peng, L., Yuan, Z., Li, Y., Ling, H., Izumi, V., Fang, B., Fukasawa, K., Koomen, J., Chen, J., & Seto, E. (2015). Ubiquitinated Sirtuin 1 (SIRT1) Function Is Modulated during DNA Damage-induced Cell Death and Survival. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(14), 8904. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.612796>
- Perdana, N., Mochtar, C., Umbas, R., & Hamid, A. (2016). *The Risk Factors of Prostate Cancer and Its Prevention: A Literature Review - PubMed*. 228–238.
- Perillo, B., Di Donato, M., Pezone, A., Di Zazzo, E., Giovannelli, P., Galasso, G., Castoria, G., & Migliaccio, A. (2020). ROS in cancer therapy: the bright side of the moon. *Experimental & Molecular Medicine* 2020

52:2, 52(2), 192–203. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0384-2>

- Perng, W., Watkins, D. J., Preciado, A. D. J. C., Mercado-García, A., Meeker, J. D., Téllez-Rojo, M. M., & Peterson, K. E. (2017). Exposure to phthalates is associated with lipid profile in peripubertal Mexican youth. *Environmental Research*, *154*, 311–317. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2017.01.033>
- Powell, M. J., Casimiro, M. C., Cordon-Cardo, C., He, X., Yeow, W. S., Wang, C., McCue, P. A., McBurney, M. W., & Pestell, R. G. (2011). Disruption of a Sirt1 Dependent Autophagy Checkpoint in the Prostate Results in Prostatic Intraepithelial Neoplasia Lesion Formation. *Cancer Research*, *71*(3), 964. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3172>
- Quinn, D. I., Sandler, H. M., Horvath, L. G., Goldkorn, A., & Eastham, J. A. (2017). The evolution of chemotherapy for the treatment of prostate cancer. *Annals of Oncology*, *28*(11), 2658–2669. <https://doi.org/10.1093/ANNONC/MDX348>
- Radke, E. G., Braun, J. M., Meeker, J. D., & Cooper, G. S. (2018). Phthalate exposure and male reproductive outcomes: A systematic review of the human epidemiological evidence. *Environment International*, *121*, 764–793. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2018.07.029>
- Radke, E. G., Galizia, A., Thayer, K. A., & Cooper, G. S. (2019). Phthalate exposure and metabolic effects: a systematic review of the human epidemiological evidence. *Environment International*, *132*, 104768. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2019.04.040>
- Ramalinga, M., Roy, A., Srivastava, A., Bhattarai, A., Harish, V., Suy, S., Collins, S., & Kumar, D. (2015). MicroRNA-212 negatively regulates starvation induced autophagy in prostate cancer cells by inhibiting SIRT1 and is a modulator of angiogenesis and cellular senescence. *Oncotarget*, *6*(33), 34446. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.5920>
- Rawla, P. (2019). Epidemiology of Prostate Cancer. *World Journal of Oncology*, *10*(2), 63. <https://doi.org/10.14740/WJON1191>
- Rebbeck, T. R. (2018). Prostate Cancer Disparities by Race and Ethnicity: From Nucleotide to Neighborhood. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, *8*(9). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A030387>
- Rebbeck, T. R., & Haas, G. (2014). Temporal Trends and Racial Disparities in Global Prostate Cancer Prevalence. *The Canadian Journal of Urology*, *21*(5), 7496. [/pmc/articles/PMC4955669/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24955669/)
- Rebello, R. J., Oing, C., Knudsen, K. E., Loeb, S., Johnson, D. C., Reiter, R. E., Gillissen, S., Van der Kwast, T., & Bristow, R. G. (2021). Prostate cancer. *Nature Reviews Disease Primers* *2021 7:1*, *7*(1), 1–27. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00243-0>
- Reczek, C. R., & Chandel, N. S. (2017). The Two Faces of Reactive Oxygen Species in Cancer. [Http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Cancerbio-041916-065808](http://Dx.Doi.Org/10.1146/Annurev-Cancerbio-041916-065808), *1*, 79–98. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-CANCERBIO-041916-065808>
- Rosenberg, M. T., Froehner, M., Albala, D., & Miner, M. M. (2010). Biology and natural history of prostate cancer and the role of chemoprevention. *International Journal of Clinical Practice*, *64*(13), 1746–1753. <https://doi.org/10.1111/J.1742-1241.2010.02541.X>

- Rothbart, S. B., & Strahl, B. D. (2014). Interpreting the language of histone and DNA modifications. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1839(8), 627. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGRM.2014.03.001>
- Rowdhwal, S. S. S., & Chen, J. (2018). Toxic Effects of Di-2-ethylhexyl Phthalate: An Overview. *BioMed Research International*, 2018. <https://doi.org/10.1155/2018/1750368>
- Ruan, L., Wang, L., Wang, X., He, M., & Yao, X. (2018). SIRT1 contributes to neuroendocrine differentiation of prostate cancer. *Oncotarget*, 9(2), 2002. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.23111>
- Rusyn, I., Peters, J. M., & Cunningham, M. L. (2006). Effects of DEHP in the Liver: Modes of Action and Species-Specific Differences. *Critical Reviews in Toxicology*, 36(5), 459. <https://doi.org/10.1080/10408440600779065>
- Sampson, J., & Korte, D. de. (2011). DEHP-plasticised PVC: relevance to blood services*. *Transfusion Medicine*, 21(2), 73–83. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3148.2010.01056.X>
- Schneider, L., Su, L. J., Arab, L., Bensen, J. T., Farnan, L., Fontham, E. T. H., Song, L., Hussey, J., Merchant, A. T., Mohler, J. L., & Steck, S. E. (2019). Dietary patterns based on the Mediterranean diet and DASH diet are inversely associated with high aggressive prostate cancer in PCaP. *Annals of Epidemiology*, 29, 16-22.e1. <https://doi.org/10.1016/J.ANNEPIDEM.2018.08.012>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of Histone Acetylation: The Histone Deacetylase Enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A018713>
- Shan, A., Leng, L., Li, J., Luo, X. mei, Fan, Y. jiao, Yang, Q., Xie, Q. hui, Chen, Y. sheng, Ni, C. sheng, Guo, L. ming, Tang, H., Chen, X., & Tang, N. jun. (2020). TCDD-induced antagonism of MEHP-mediated migration and invasion partly involves aryl hydrocarbon receptor in MCF7 breast cancer cells. *Journal of Hazardous Materials*, 398, 122869. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.122869>
- Shariat, S. F., & Roehrborn, C. G. (2008). Using Biopsy to Detect Prostate Cancer. *Reviews in Urology*, 10(4), 262. [/pmc/articles/PMC2615104/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1911104/)
- Sharma, R., Schuhmacher, M., & Kumar, V. (2018). Development of a human physiologically based pharmacokinetic (PBPK) model for phthalate (DEHP) and its metabolites: A bottom up modeling approach. *Toxicology Letters*, 296, 152–162. <https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2018.06.1217>
- Shu, Y., Ren, L., Xie, B., Liang, Z., & Chen, J. (2017). MiR-204 enhances mitochondrial apoptosis in doxorubicin-treated prostate cancer cells by targeting SIRT1/p53 pathway. *Oncotarget*, 8(57), 97313. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21960>
- Song, X., Zhuo, Q., Tang, S., Xie, T., Chen, Z., Zang, Z., Zhang, Y., Niu, X., Yin, H., Zeng, F., & He, C. (2020). Concentrations of phthalates metabolites in blood and semen and the potential effects on semen concentration and motility among residents of the Pearl River Delta region in China. *Emerging Contaminants*, 6, 39–43. <https://doi.org/10.1016/J.EMCON.2019.12.002>
- Srinivas, U. S., Tan, B. W. Q., Vellayappan, B. A., & Jeyasekharan, A. D. (2019). ROS and the DNA damage response in cancer. *Redox Biology*, 25, 101084. <https://doi.org/10.1016/J.REDOX.2018.101084>

- Tabayoyong, W., & Abouassaly, R. (2015). Prostate Cancer Screening and the Associated Controversy. *Surgical Clinics of North America*, 95(5), 1023–1039. <https://doi.org/10.1016/J.SUC.2015.05.001>
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2019). Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines*, 6(3), 82. <https://doi.org/10.3390/MEDICINES6030082>
- Testai, E., Hartemann, P., Rastogi, S. C., Bernauer, U., Piersma, A., De Jong, W., Gulliksson, H., Sharpe, R., Schubert, D., & Rodríguez-Farre, E. (2016). The safety of medical devices containing DEHP plasticized PVC or other plasticizers on neonates and other groups possibly at risk (2015 update). *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 76, 209–210. <https://doi.org/10.1016/J.YRTPH.2016.01.013>
- Tian, Q., Stepaniants, S. B., Mao, M., Weng, L., Feetham, M. C., Doyle, M. J., Yi, E. C., Dai, H., Thorsson, V., Eng, J., Goodlett, D., Berger, J. P., Gunter, B., Linseley, P. S., Stoughton, R. B., Aebersold, R., Collins, S. J., Hanlon, W. A., & Hood, L. E. (2004). Integrated Genomic and Proteomic Analyses of Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(10), 960–969. <https://doi.org/10.1074/MCP.M400055-MCP200>
- Tosoian, J. J., Trock, B. J., Landis, P., Feng, Z., Epstein, J. I., Partin, A. W., Walsh, P. C., & Carter, H. B. (2011). Active Surveillance Program for Prostate Cancer: An Update of the Johns Hopkins Experience. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8112>, 29(16), 2185–2190. <https://doi.org/10.1200/JCO.2010.32.8112>
- Vaidyanathan, V., Karunasinghe, N., Jabed, A., Pallati, R., Kao, C. H.-J., Wang, A., Marlow, G., & Ferguson, L. R. (2016). Prostate Cancer: Is It a Battle Lost to Age? *Geriatrics* 2016, Vol. 1, Page 27, 1(4), 27. <https://doi.org/10.3390/GERIATRICS1040027>
- van der Steen, T., Tindall, D. J., & Huang, H. (2013). Posttranslational Modification of the Androgen Receptor in Prostate Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(7), 14833. <https://doi.org/10.3390/IJMS140714833>
- Vidal, A. C., Howard, L. E., Sun, S. X., Cooperberg, M. R., Kane, C. J., Aronson, W. J., Terris, M. K., Amling, C. L., & Freedland, S. J. (2016). Obesity and prostate cancer-specific mortality after radical prostatectomy: results from the Shared Equal Access Regional Cancer Hospital (SEARCH) database. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* 2017 20:1, 20(1), 72–78. <https://doi.org/10.1038/pcan.2016.47>
- Vogel, C., & Marcotte, E. M. (2012). Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nature Reviews. Genetics*, 13(4), 227. <https://doi.org/10.1038/NRG3185>
- Voulgari, A., & Pintzas, A. (2009). Epithelial–mesenchymal transition in cancer metastasis: Mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1796(2), 75–90. <https://doi.org/10.1016/J.BBCAN.2009.03.002>
- Wang, G., Zhao, D., Spring, D. J., & DePinho, R. A. (2018). Genetics and biology of prostate cancer. *Genes & Development*, 32(17–18), 1105–1140. <https://doi.org/10.1101/GAD.315739.118>
- Wang, M., Qiu, Y., Zhang, R., Gao, L., Wang, X., Bi, L., & Wang, Y. (2019). MEHP promotes the proliferation

- of oral cancer cells via down regulation of miR-27b-5p and miR-372-5p. *Toxicology in Vitro*, *58*, 35–41. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2019.03.014>
- Wang, R. H., Sengupta, K., Li, C., Kim, H. S., Cao, L., Xiao, C., Kim, S., Xu, X., Zheng, Y., Chilton, B., Jia, R., Zheng, Z. M., Appella, E., Wang, X. W., Ried, T., & Deng, C. X. (2008). Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell*, *14*(4), 312. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2008.09.001>
- Wang, X., Yang, B., & Ma, B. (2016). The UCA1/miR-204/Sirt1 axis modulates docetaxel sensitivity of prostate cancer cells. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *78*(5), 1025–1031. <https://doi.org/10.1007/S00280-016-3158-8/FIGURES/4>
- Wang, Y. X., Liu, C., Chen, Y. J., Chen, H. G., Yang, P., Wang, P., Huang, L. L., Ai, S. H., Duan, P., Pan, A., Zeng, Q., & Lu, W. Q. (2018). Predictors and correlations of phthalate metabolite concentrations in urine and seminal plasma among reproductive-aged men. *Environmental Research*, *161*, 336–344. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2017.11.027>
- Wang, Y., Zhu, H., & Kannan, K. (2019). A Review of Biomonitoring of Phthalate Exposures. *Toxics*, *7*(2). <https://doi.org/10.3390/TOXICS7020021>
- Watamura, S. E. (2008). Endocrine System. *Encyclopedia of Infant and Early Childhood Development*, 1–3, 450–459. <https://doi.org/10.1016/B978-012370877-9.00057-8>
- Wen, D., Peng, Y., Lin, F., Singh, R. K., & Mahato, R. I. (2017). Micellar delivery of miR-34a modulator rubone and paclitaxel in resistant prostate cancer. *Cancer Research*, *77*(12), 3244. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2355>
- Wu, D., Li, Y., Zhu, K. S., Wang, H., & Zhu, W. G. (2018). Advances in Cellular Characterization of the Sirtuin Isoform, SIRT7. *Frontiers in Endocrinology*, *9*. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00652>
- Yaghjian, L., Ghita, G. L., Dumont-Driscoll, M., Yost, R. A., & Chang, S.-H. (2016). Maternal exposure to di-2-ethylhexylphthalate and adverse delivery outcomes: a systematic review. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, *65*, 76. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2016.07.002>
- Yamakuchi, M. (2012). MicroRNA Regulation of SIRT1. *Frontiers in Physiology*, *3*. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2012.00068>
- Yang, H., Bi, Y. J., Xue, L. X., Wang, J., Lu, Y., Zhang, Z. G., Chen, X., Chu, Y., Yang, R., Wang, R., & Liu, G. W. (2015). Multifaceted Modulation of SIRT1 in Cancer and Inflammation. *Critical Reviews & Trade; in Oncogenesis*, *20*(1–2), 49–64. <https://doi.org/10.1615/CRITREVNCOG.2014012374>
- Yang, W., Tan, W., Zheng, J., Zhang, B., Li, H., & Li, X. (2018). MEHP promotes the proliferation of cervical cancer via GPER mediated activation of Akt. *European Journal of Pharmacology*, *824*, 11–16. <https://doi.org/10.1016/J.EJPHAR.2018.01.040>
- Yang, X., Yang, Y., Gan, R., Zhao, L., Li, W., Zhou, H., Wang, X., Lu, J., & Meng, Q. H. (2014). Down-Regulation of mir-221 and mir-222 Restrain Prostate Cancer Cell Proliferation and Migration That Is Partly Mediated by Activation of SIRT1. *PLoS ONE*, *9*(6).

<https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0098833>

- Yang, Y., Hou, H., Haller, E. M., Nicosia, S. V., & Bai, W. (2005). Suppression of FOXO1 activity by FHL2 through SIRT1-mediated deacetylation. *The EMBO Journal*, 24(5), 1021.
<https://doi.org/10.1038/SJ.EMBOJ.7600570>
- Yao, C., Liu, J., Wu, X., Tai, Z., Gao, Y., Zhu, Q., Li, J., Zhang, L., Hu, C., Gu, F., Gao, J., & Gao, S. (2016). Reducible self-assembling cationic polypeptide-based micelles mediate co-delivery of doxorubicin and microRNA-34a for androgen-independent prostate cancer therapy. *Journal of Controlled Release*, 232, 203–214. <https://doi.org/10.1016/J.JCONREL.2016.04.034>
- Yao, P.-L., Lin, Y.-C., & Richburg, J. H. (2012). Mono-(2-Ethylhexyl) Phthalate (MEHP) Promotes Invasion and Migration of Human Testicular Embryonal Carcinoma Cells. *Biology of Reproduction*, 86(5), 160–161.
<https://doi.org/10.1095/BIOLREPROD.111.097295>
- Yong, W., Jiao, C., Jianhui, W., Yan, Z., Qi, P., Xiu, W., Zuyue, S., & Yunhui, Z. (2016). Mono-2-ethylhexyl phthalate advancing the progression of prostate cancer through activating the hedgehog pathway in LNCaP cells. *Toxicology in Vitro*, 32, 86–91. <https://doi.org/10.1016/J.TIV.2015.12.012>
- Yu, L., Dong, L., Li, H., Liu, Z., Luo, Z., Duan, G., Dai, X., & Lin, Z. (2020). Ubiquitination-mediated degradation of SIRT1 by SMURF2 suppresses CRC cell proliferation and tumorigenesis. *Oncogene* 2020 39:22, 39(22), 4450–4464. <https://doi.org/10.1038/s41388-020-1298-0>
- Yu, Y. D., Byun, S.-S., Lee, S. E., & Hong, S. K. (2018). Impact of Body Mass Index on Oncological Outcomes of Prostate Cancer Patients after Radical Prostatectomy. *Scientific Reports* 2018 8:1, 8(1), 1–9.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-30473-y>
- Zhang, J., Ali, H. I., Bedi, Y. S., & Choudhury, M. (2015). The plasticizer BBP selectively inhibits epigenetic regulator sirtuins. *Toxicology*, 338, 130–141. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2015.10.004>
- Zhang, J., & Choudhury, M. (2017). The plasticizer BBP selectively inhibits epigenetic regulator sirtuin during differentiation of C3H10T1/2 stem cell line. *Toxicology in Vitro*, 39, 75–83.
<https://doi.org/10.1016/J.TIV.2016.11.016>
- Zhang, X., Chen, S., Cheng, M., Cao, F., & Cheng, Y. (2015). The expression and correlation of SIRT1 and Phospho-SIRT1 in colorectal cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8(1), 809. /pmc/articles/PMC4358516/
- Zhao, X., Jin, Y., Yang, L., Hou, Z., Liu, Y., Sun, T., Pei, J., Li, J., Yao, C., Wang, X., & Chen, G. (2018). Promotion of SIRT1 protein degradation and lower SIRT1 gene expression via reactive oxygen species is involved in Sb-induced apoptosis in BEAS-2b cells. *Toxicology Letters*, 296, 73–81.
<https://doi.org/10.1016/J.TOXLET.2018.07.047>
- Zhao, X., Liu, Y., Zhu, G., Liang, Y., Liu, B., Wu, Y., Han, M., Sun, W., Han, Y., Chen, G., & Jiang, J. (2019). SIRT1 downregulation mediated Manganese-induced neuronal apoptosis through activation of FOXO3a-Bim/PUMA axis. *Science of The Total Environment*, 646, 1047–1055.
<https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2018.07.363>

- Zhao, X., Wu, Y., Li, J., Li, D., Jin, Y., Zhu, P., Liu, Y., Zhuang, Y., Yu, S., Cao, W., Wei, H., Wang, X., Han, Y., & Chen, G. (2019). JNK activation-mediated nuclear SIRT1 protein suppression contributes to silica nanoparticle-induced pulmonary damage via p53 acetylation and cytoplasmic localisation. *Toxicology*, 423, 42–53. <https://doi.org/10.1016/J.TOX.2019.05.003>
- Zhou, C., Zaman, N., Li, Y., Martinez-Arguelles, D., Papadopoulos, V., Zirkin, B., & Traore, K. (2019). Redox regulation of hormone sensitive lipase: Potential role in the mechanism of MEHP-induced stimulation of basal steroid synthesis in MA-10 Leydig cells. *Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 85, 19–25. <https://doi.org/10.1016/J.REPROTOX.2018.12.010>
- Zhou, Z. W., Li, X. X., He, Z. X., Pan, S. T., Yang, Y., Zhang, X., Chow, K., Yang, T., Qiu, J. X., Zhou, Q., Tan, J., Wang, D., & Zhou, S. F. (2015). Induction of apoptosis and autophagy via sirtuin1- and PI3K/Akt/mTOR-mediated pathways by plumbagin in human prostate cancer cells. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, 1511. <https://doi.org/10.2147/DDDT.S75976>