



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**REGULADORES EPIGENÉTICOS: EXPRESIÓN
DIFERENCIAL EN PACIENTES CON CÁNCER DE
PRÓSTATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

LORENA ESPERANZA CASIMIRO ZAMORA



CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX 2025



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Titulación)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica. De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “Reguladores epigenéticos: Expresión diferencial en pacientes con cáncer de próstata” que presenté para obtener el título/grado de Química Farmacéutica Bióloga, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por mi Entidad Académica, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Lorena Esperanza Casimiro Zamora

316031639



PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL

(Titulación)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Lorena Esperanza Casimiro Zamora

316031639



JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: Jorge Manuel Vázquez Ramos
VOCAL: Alfonso Rafael Salgado Aguayo
SECRETARIO: Luis Ramos Tavera
1er. SUPLENTE: Marco Antonio Cerbón Cervantes
2° SUPLENTE: Carolina Rodríguez Saavedra

El presente trabajo se desarrolló en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Belisario Domínguez Secc 16, Tlalpan, 14080 Ciudad de México, CDMX.

ASESOR DEL TEMA:

Luis Ramos Tavera

SUSTENTANTE:

Lorena Esperanza Casimiro Zamora





Índice

Abreviaturas	9
Resumen	11
Antecedentes	12
1. Estructura y función prostática	12
2. Cáncer de próstata	16
3. Importancia de los andrógenos en el desarrollo prostático: Vías de señalización, rol del receptor de andrógenos, moléculas relacionadas	21
3.1 El rol de los andrógenos en el crecimiento glandular.....	25
3.2 Vía de señalización de receptor de andrógenos (RA).....	26
3.3 Actividad del RA dependiente de unión a DNA.....	28
3.4 Moléculas de interés que regulan la actividad del RA.....	30
4. El receptor de andrógenos y su papel en el CaP	33
4.1 El CaP y su relación con el suministro hormonal: Desde la dependencia hasta la resistencia.....	33
4.2 Mecanismos que provocan el cambio de la dependencia a la independencia de andrógenos.....	35
Planteamiento del problema.....	38



Justificación	39
Hipótesis	40
Objetivo General.....	41
Objetivos Particulares.....	41
Materiales y métodos	42
1. Pacientes.....	42
2. Análisis bioinformático	43
3. Extracción de RNA	44
4. Análisis de la integridad del RNA	46
5. Síntesis de cDNA	48
6. PCR tiempo real	49
7. Análisis estadístico de los resultados de RT-qPCR.....	52
Resultados	53
1. Interacciones predictivas entre NR3C4 y sus correguladores	53
2. Análisis de la integridad del RNA	57
3. Resultados del análisis de PCR tiempo real.....	58



4. Comparación de la expresión génica relativa de los genes estudiados	61
<i>Discusión</i>	<i>64</i>
<i>Conclusión</i>	<i>73</i>
<i>Perspectivas</i>	<i>75</i>
<i>Bibliografía.....</i>	<i>76</i>
<i>Apéndice A.....</i>	<i>84</i>
<i>Apéndice B.....</i>	<i>85</i>
<i>Apéndice C.....</i>	<i>86</i>



Abreviaturas

ANADEVA Análisis de varianza

CaP Cáncer de próstata

CPDA Cáncer de próstata dependiente de andrógenos

CPIA Cáncer de próstata independiente de andrógenos

CPRTH Cáncer de próstata refractario al tratamiento hormonal

CRPC Cáncer de próstata resistente a la castración

cDNA DNA complementario

DEGR Diferencia de la expresión génica relativa

DHT Dihidrotestosterona

DNT Dominio NH₂-terminal

DUD Dominio de unión al DNA

DUL Dominio de unión a ligando

EEM Error estándar de la media

ERA Elementos de respuesta al receptor de andrógenos

FSH Hormona folículoestimulante

GnRH Hormona liberadora de gonadotropina

INEGI Instituto Nacional de Estadística y Geografía



LH Hormona luteinizante

NIP Neoplasia intraepitelial

PSA Antígeno prostático específico

RT-qPCR PCR cuantitativo en tiempo real

T Testosterona

TN Tejido normal

TPA Terapia de privación de andrógenos

TT Tejido tumoral



Resumen

A nivel mundial, el cáncer de próstata (CaP) es el segundo tipo de cáncer más frecuente en hombres y la causa más común de muerte asociada a cáncer en la población masculina en México. A lo largo de su evolución patológica, la próstata atraviesa una transformación maligna que comienza con un estado de dependencia a las hormonas sexuales masculinas y que, por algunos mecanismos que pueden estar asociados al receptor de andrógenos, termina como un tumor independiente de cualquier modificación y/o terapia hormonal. Uno de estos mecanismos corresponde a la alteración de la actividad transcripcional del receptor de andrógenos mediada por moléculas correguladoras que forman parte de su maquinaria transcripcional. En este estudio, se analizó el comportamiento de la expresión génica de 19 moléculas coactivadoras del receptor de andrógenos, mediante análisis de PCR en tiempo real del cDNA tanto de tejido normal como de tejido tumoral de 10 pacientes con diagnóstico de CaP, con el objetivo de identificar alteraciones en la expresión en tejido tumoral. Los resultados determinaron que uno de los coactivadores, KDM4A, demostró un incremento en la expresión del transcrito en el tumor. Dichos resultados se correlacionan con la literatura que respalda la relación entre la desregulación de KDM4A y el progreso del CaP hacia un estado de independencia a los andrógenos.



Antecedentes

1. Estructura y función prostática

La próstata es una glándula sexual con un importante papel biológico en el sistema reproductor masculino (1). Con un peso aproximado de 20 g, en hombres de 20 años, esta glándula rodea la uretra (**Figura 1**), tiene una forma redonda, elíptica o triangular y está formada por regiones glandulares y otras no glandulares rodeadas por una cápsula fibrosa y elástica (1,2).

De acuerdo con Lowsley, la próstata puede dividirse en cinco lóbulos: uno anterior, uno posterior, uno medio y dos laterales (**Figura 1**) (2). El lóbulo anterior o istmo se encuentra anterior a la uretra, el lóbulo posterior se encuentra posterior a la uretra e inferior a los conductos eyaculatorios, el lóbulo medio está entre la uretra y los conductos eyaculatorios y los lóbulos laterales están a ambos lados de la uretra y forman la mayor parte del volumen prostático (3).

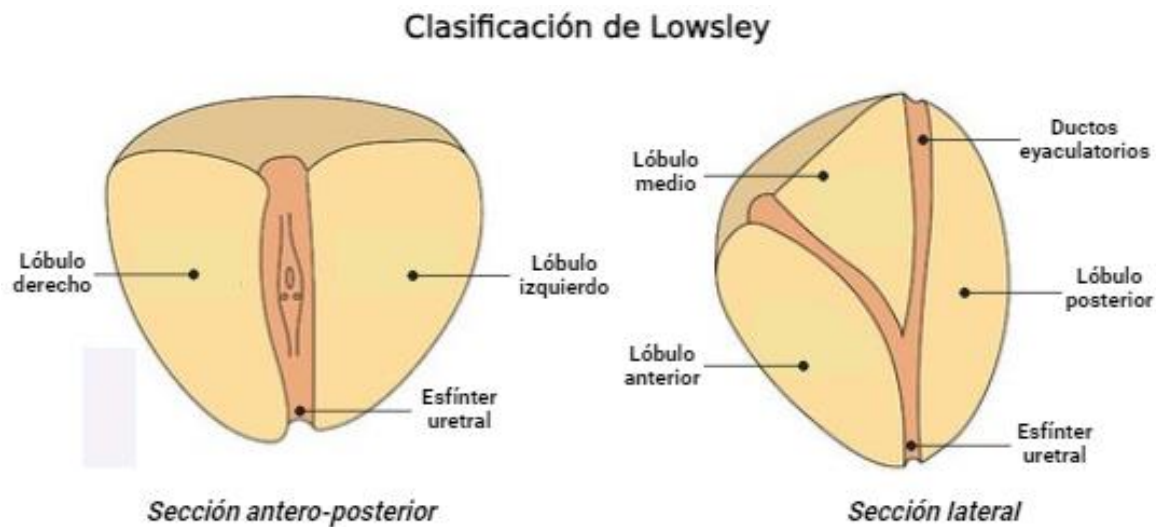


Figura 1. Imagen representativa de la próstata según la anatomía propuesta por Oswald Lowsley. Imagen modificada por LECZ en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, obtenida de internet, pero no se logró identificar su fuente original.

Desde la perspectiva de McNeal (1981) (**Figura 2**), la próstata se divide en cuatro zonas: la zona periférica, la cual representa los lóbulos laterales y el posterior, lo que constituye el 70% de la parte glandular. La zona central, la cual tiene forma de cuña y se encuentra rodeada por la zona periférica, por sí sola compone el 25% de la próstata glandular que rodea los conductos eyaculatorios. La zona transicional consiste en dos lóbulos independientes de tejido glandular y la zona periuretral consiste en pequeños conductos y acinas sin desarrollar que se encuentran dispersos a lo largo del segmento proximal del esfínter pre-prostático (3).

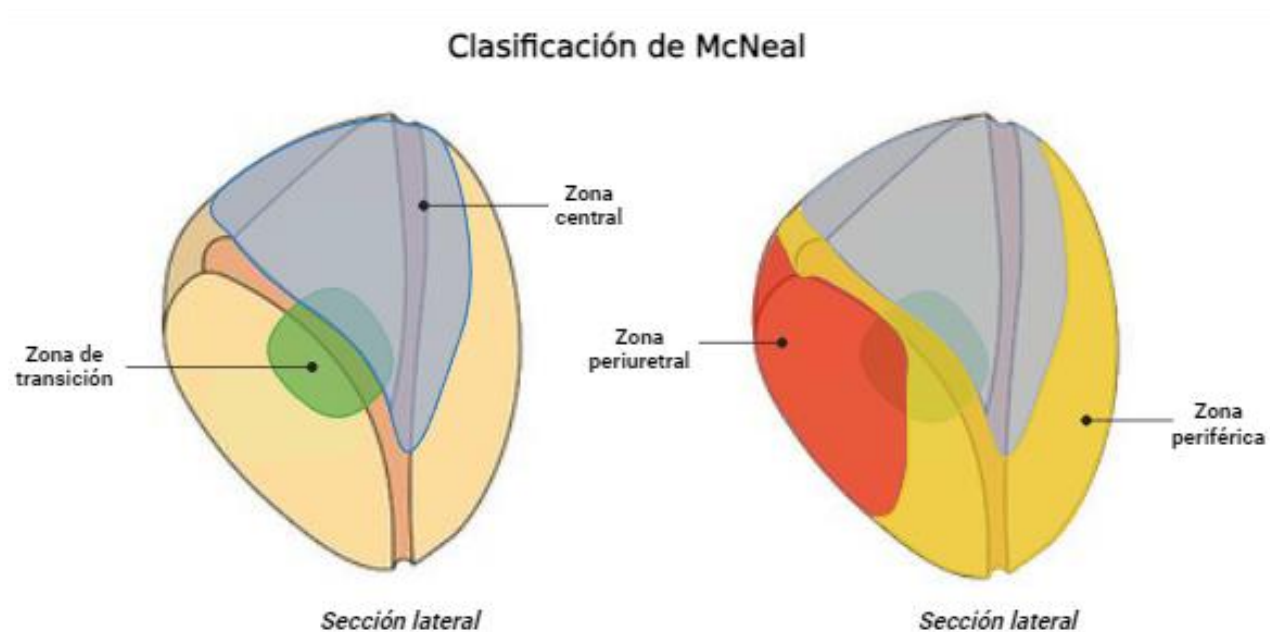


Figura 2. Imagen representativa de la próstata según la anatomía propuesta por John Edwin McNeal. Imagen modificada por LECZ en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, obtenida de internet, pero no se logró identificar su fuente original.

La próstata humana está compuesta por tres tipos de células: En primer lugar, están las células luminales, las cuales expresan receptores de andrógenos (RA/NR3C4), secretan fluido prostático y una glicoproteína denominada antígeno prostático específico (o PSA, por sus siglas en inglés *prostate-specific antigen*); además, se diferencian por expresar antígenos como la citoqueratina 8 y el PSA. Este conjunto celular está rodeado por células basales, que producen proteínas necesarias para formar el fluido prostático, y células de la membrana acinar que separa los acinos epiteliales del estroma prostático. El conjunto basal tiene células neuroendocrinas intercaladas, cuya principal característica es la expresión de marcadores endocrinos (4,5). Tanto las células basales como las



neuroendocrinas son deficientes en la expresión de RA/NR3C4, por lo que no son dependientes de testosterona (T) ni de androstendiona (4).

Esta glándula secreta un líquido de baja densidad, compuesto por iones citrato, calcio y fosfato, una enzima de coagulación y una profibrinolisisina, que contribuye en gran medida al aumento de volumen del semen. Es probable que este líquido prostático, de carácter ligeramente alcalino, neutralice la acidez de las secreciones vaginales y del líquido del conducto deferente del pene, lo que permite la movilidad y fertilidad de los espermatozoides (6).



2. Cáncer de próstata

El cáncer de próstata (CaP) es una patología de gran importancia clínica en hombres y se ha estimado la prevalencia en más de 1 millón de casos por año a nivel mundial, 366,000 de ellos llevan a la muerte (7). A nivel global, es el segundo tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado y es la causa más común de muertes asociadas a cáncer en hombres; tan sólo en México, se detectan más de 25 000 casos al año (8,9). En esta patología, un porcentaje de los pacientes puede exhibir una progresión rápida y agresiva del cáncer, causando su metástasis y posterior muerte, mientras que otro porcentaje experimenta un tipo de progresión mucho más lenta (5). La transformación maligna de la próstata ocurre en una serie de diferentes etapas; al principio, comienza como una neoplasia prostática epitelial, sigue el CaP localizado, después se desarrolla un adenocarcinoma avanzado con invasión local y termina con cáncer prostático metastásico (10).

El CaP metastásico es la causa principal de muerte asociada a CaP. Los nódulos linfoides adyacentes a los tumores primarios suelen ser los primeros sitios de metástasis y posteriormente puede afectar al hígado, los pulmones y los huesos (10). Se ha propuesto que la transición epitelio-mesénquima, es un proceso a través del cual una célula epitelial polarizada sufre cambios bioquímicos que le permiten adquirir el fenotipo de una célula madre mesenquimal y por consecuencia, la capacidad de migrar a otros tejidos (11); esto representa un rol importante en la metástasis del CaP, ya que las células cancerosas se



diseminan en la circulación como células tumorales circulantes y establecen múltiples focos de metástasis (12).

Existen diferentes sistemas de gradación para evaluar el adenocarcinoma de próstata y uno de ellos es el sistema de Gleason, el cual fue introducido en la década de los 60 y aceptado en el año 2014 por la Organización Mundial de la Salud. Actualmente es el más usado en el diagnóstico clínico. En este sistema, se detallan y definen los patrones histológicos del desarrollo de este tipo de cáncer, así como su correlación con la información clínica. Este sistema es fundamental en la evaluación clínica de los pacientes (5,13).

La escala de Gleason (**Tabla 1**) evalúa la similitud existente entre el tejido prostático sospechoso y el tejido normal; en ella, se toman en cuenta dos de los patrones glandulares más comunes del tumor existente: El primario (el cual es el grado más común) y el secundario (que corresponde al grado menos común) y se les asigna un grado por separado, denominado del 1 al 5 (13). Como ambos patrones influyen en el pronóstico, la puntuación de Gleason se asigna con la suma de ambos grados; por ejemplo, en la fórmula: $3 + 4 = 7$, el patrón predominante es el 3, el patrón menos predominante es el 4 y su puntuación en total en el sistema de Gleason es de 7. Cuando un tumor presenta solo un patrón histológico, para mantener la uniformidad en la nomenclatura, se asigna el mismo grado a ambos patrones; así, en la fórmula: $1 + 1 = 2$, el tumor solo presenta un



patrón (5,13). Es importante destacar que, en este sistema, cuanto mayor es el valor del grado, más agresiva es la enfermedad (13).

Tabla 1. Sistema de puntuación de Gleason. Referido en función de la descripción de células cancerosas de la próstata y la probabilidad de que el cáncer avance y se disemine.

Patrón de crecimiento histológico	Puntuación Gleason	Grado
1 Lesión nodular formada por glándulas diferenciadas, compactas y discretas.	$1 + 1 = 2$ $3 + 3 = 6$	I
2 Glándulas neoplásicas de diferentes tamaños, con un ligero aumento de tamaño del estroma entre ellas.	$3 + 4 = 7$	II
3 Glándulas neoplásicas distintas, de tamaño variable, agrupadas o individuales, que se infiltran en el estroma y se acercan entre sí.	$4 + 3 = 7$	III
4 Glándulas completamente fusionadas que forman un patrón cribiforme e irregular.	$4 + 4 = 8$ $5 + 3 = 8$ $3 + 5 = 8$	IV
5 Necrosis de las glándulas y otras estructuras, aparición de crecimientos sólidos e infiltración de células individuales del tumor.	$4 + 5 = 9$ $5 + 4 = 9$ $5 + 5 = 10$	V

Nota. Fuente: Chen & Zhou; Testa et al., 2019.



El CaP involucra la transformación de células benignas del epitelio prostático a células de un fenotipo maligno o dañino (4). Se han identificado tres estadios en el desarrollo de los tumores prostáticos en humanos: la neoplasia intraepitelial (NIP), el adenocarcinoma dependiente de andrógenos y el adenocarcinoma independiente de andrógenos (o resistente a la castración) (5). La NIP es una etapa que precede al cáncer y en ella se observa una proliferación de células epiteliales del lumen con una citología atípica y una pérdida progresiva de células basales (5). Esta etapa es una condición multicéntrica y se define como el crecimiento neoplásico dentro del epitelio benigno que forma las acinas o los ductos prostáticos. Es clínicamente relevante cuando se presenta en forma de NIP de alto grado, la cual se define como una lesión histológica en la que se observan acinas y conductos prostáticos estructuralmente benignos pero recubiertos por células atípicas que, además, comparten cambios genéticos, morfológicos e histológicos con el CaP; pero que no presentan una invasión de la membrana basal (14). No eleva significativamente los niveles séricos del PSA total ni libre y no puede identificarse mediante el ultrasonido transrectal, es únicamente identificable mediante una biopsia de la lesión (15).

El adenocarcinoma dependiente de andrógenos es un estado de pérdida total de las células basales y la predominancia del fenotipo de las células luminales. Como en esta etapa, el tumor depende del suministro de andrógenos para desarrollarse, su crecimiento se puede ralentizar privándolo de los mismos (5). El adenocarcinoma independiente de andrógenos o resistente a orquiectomía es un estado en el que el crecimiento del adenocarcinoma ya no depende del suministro hormonal (5).



Inicialmente, el CaP puede diagnosticarse con ayuda de una examinación física del estado de la próstata seguida de la medición del nivel de PSA en el suero. El PSA es uno de los biomarcadores de cáncer más usados para el diagnóstico de CaP, sin embargo, tiene ciertas limitaciones porque no es específico y también se eleva en otras condiciones patológicas que no necesariamente son lesiones cancerosas; además, no puede usarse para hacer distinciones entre tipos de CaP. Por esta razón, los pacientes en estado de riesgo (por sus resultados de PSA o por el tamaño de su próstata), tienen que someterse a una biopsia de la lesión, a partir de la cual se realiza un ensayo histológico que permite visualizar no sólo si el CaP está presente o no, sino su grado según la escala de Gleason y en consecuencia su severidad (16,17).



3. Importancia de los andrógenos en el desarrollo prostático: Vías de señalización, rol del receptor de andrógenos, moléculas relacionadas

Los andrógenos T, dihidrotestosterona (DHT), androsterona y androstendiona son hormonas sexuales esteroideas responsables del desarrollo fenotípico masculino y la maduración sexual en la pubertad (18); así mismo, son un componente fundamental en el desarrollo de otros órganos y tejidos como los huesos, la piel, el cabello o el cerebro y en consecuencia tienen un efecto importante en el crecimiento y la conducta humana (19).

En varones adultos, la T es el andrógeno más abundante en circulación (19) y alcanza una concentración de 10 a 30 nmol/L en hombres de 30 años; por lo que se considera el principal andrógeno testicular. Tras su síntesis en los testículos, la T viaja a través de la circulación sanguínea en forma libre o unida a proteínas como la albúmina o la globulina transportadora de hormonas sexuales, hasta llegar a los tejidos T-dependientes. Uno de ellos es la próstata, aquí la T presenta una reducción en la posición 5 del anillo A, dando como resultado un metabolito 5 α -reducido de mayor potencia biológica, la DHT (18,20). La DHT está involucrada en procesos biológicos como el desarrollo normal del sistema reproductor masculino que incluyen el pene, el escroto, los testículos y las glándulas sexuales accesorias (18,20–22). Los efectos biológicos de ambas hormonas son mediados a través del receptor de andrógenos.



Otros andrógenos circulantes en el torrente sanguíneo son la androsterona, androstendiona y dehidroepiandrosterona; aunque son producidos por la corteza suprarrenal y mediante su metabolismo en tejidos periféricos, pueden ser transformados en T (18). Similar a múltiples hormonas de naturaleza esteroidea (como el caso de la T, la androsterona y androstendiona), son el resultado de una síntesis en la que el colesterol atraviesa una ruta metabólica cuyas enzimas son codificadas por genes que se expresan específicamente en los órganos productores de hormonas esteroideas, como los testículos (19). Particularmente, la T es una hormona que se sintetiza de forma mayoritaria en las células de Leydig de los testículos (23) y minoritaria en las glándulas suprarrenales (19).

Como se muestra en la **Figura 3**, en hombres, la secreción de la hormona liberadora de gonadotropina (*gonadotropin releasing hormone*, GnRH) por parte del hipotálamo, estimula la producción de la hormona foliculoestimulante (*follicle stimulating hormone*, FSH) y la hormona luteinizante (*luteinizing hormone*, LH) en la glándula hipofisaria. La LH viaja a través del torrente sanguíneo hasta las gónadas testiculares y en este tejido se une a los receptores de LH ubicados en las células de Leydig (24). En la pubertad, la variación de los niveles de T está regulada por el eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. Además, se autolimita con retroalimentación negativa; un nivel alto de T en la sangre le indica al hipotálamo que suprima la secreción de GnRH y hace que la hipófisis sea menos sensible al estímulo de GnRH (24).



Las células de Leydig, que ocupan el intersticio testicular (los espacios alojados entre los túbulos seminíferos) son una fuente fundamental de T en hombres, ya que producen el 95% de la T circulante y al no poder almacenar los andrógenos, realizan el proceso de biosíntesis de manera continua; de modo que, en un solo día, la liberación de la hormona oscila entre los 5 y los 7 mg (24). El colesterol puede incorporarse a la célula de Leydig a través de la endocitosis de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o de lo contrario, puede sintetizarse *de novo* en su interior, partiendo del acetil coenzima A. Posteriormente, se acumula en cuerpos lipídicos de forma inversamente proporcional a la tasa de síntesis androgénica (es decir, a mayor producción de andrógenos, menor contenido de cuerpos lipídicos y viceversa) (25). Con la ayuda de la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (StAR), el colesterol es interiorizado a la membrana mitocondrial de la célula de Leydig y se convierte en el sustrato primordial dentro del primer paso de la esteroidogénesis (19,24). En el interior de la mitocondria, presenta reacciones enzimáticas a través de las cuales su número total de átomos de carbono se reduce de 27 a 19. El paso inicial en la esteroidogénesis es llevado a cabo por la enzima P450scc (CYP11A1) para formar pregnenolona (24).

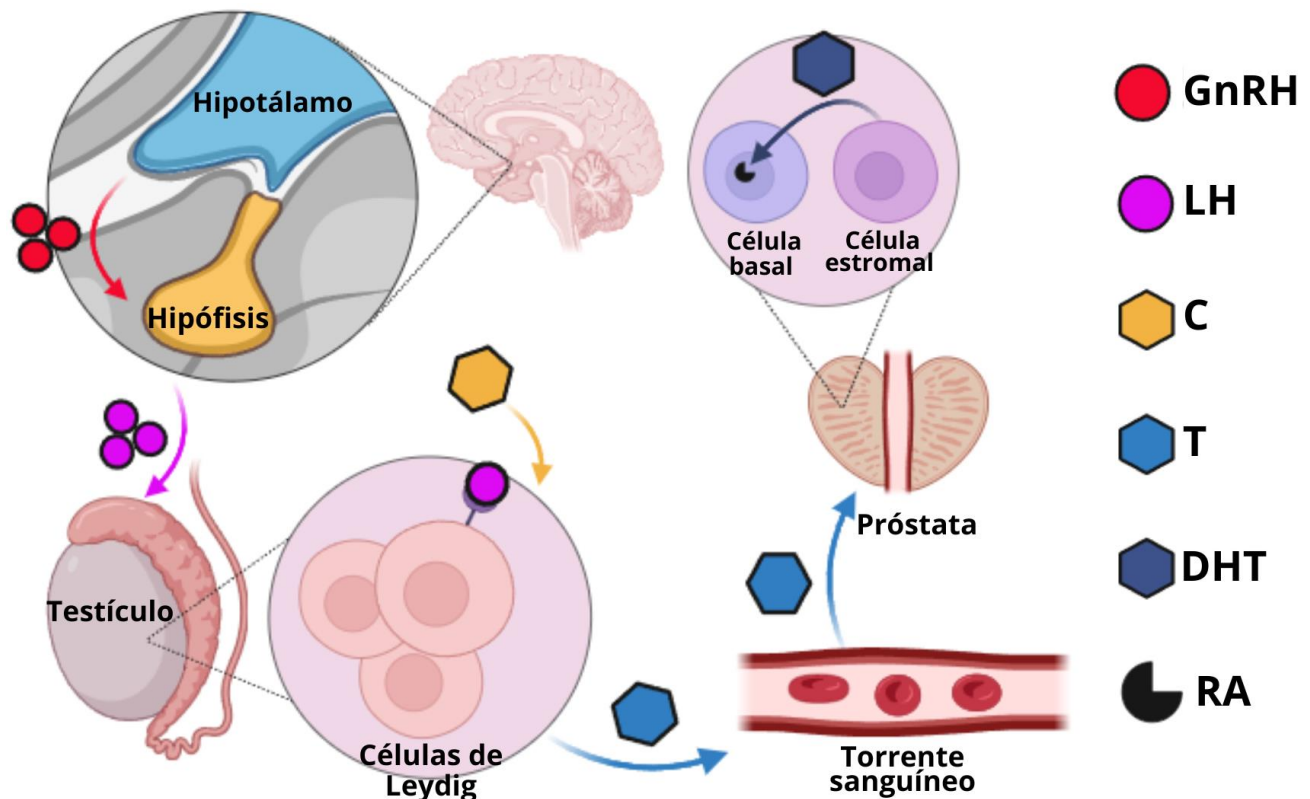


Figura 3. *Eje hipotálamo-hipófisis-gónada en hombres.* La secreción de hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) por parte del hipotálamo, estimula la secreción de hormona luteinizante (LH) de parte de la hipófisis. Posteriormente, las células de Leydig reciben el suministro de LH y de colesterol que requieren para sintetizar testosterona (T), la cual es distribuida en tejidos periféricos, como la próstata, para inducir la formación de dihidrotestosterona (DHT), la cual representa el ligando principal del receptor de andrógenos (RA). Imagen elaborada por LECZ en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, no publicada.



3.1 El rol de los andrógenos en el crecimiento glandular

Está ampliamente demostrado que el desarrollo y funcionamiento de la próstata dependen de las hormonas testiculares (26). Durante las primeras seis semanas del desarrollo embrionario, los tejidos que forman el sistema reproductor de mujeres y hombres son idénticos; alrededor de la séptima semana, el gen *SRY* induce el desarrollo de los testículos fetales, los cuales se forman principalmente a partir de células de Sertoli. Eventualmente y partiendo de los testículos fetales, se desarrollan los túbulos seminíferos; entonces, las células de Leydig y otros tipos de células endoteliales migran hacia las gónadas y comienzan a producir T, lo cual promueve el desarrollo y la virilización del tracto urogenital. En la periferia, ocurre una transformación de T a DHT, la cual induce la formación de la próstata y de los genitales masculinos (27).

Al momento del nacimiento, la próstata tiene un peso aproximado de 1 g, antes de alcanzar la pubertad llega a pesar 4 g y en la adultez, alrededor de los 20 años, alcanza los 20 g; es decir, atraviesa un periodo de crecimiento exponencial que depende de la circulación de T libre (25). En el interior de la próstata, tanto la T como la DHT se unen al RA, sin embargo, debido a que la DHT es el andrógeno intracelular con mayor potencia en su bioactividad, está presente en una concentración cinco veces mayor a la T (25,28).

El metabolismo de DHT en el interior de las células prostáticas es una medida de autorregular su concentración dentro de la próstata para que no se vea afectada por las posibles variaciones de T en la circulación (29), ya que el crecimiento del epitelio prostático



depende, precisamente, del equilibrio interior de DHT (30) y es fundamental que la glándula mantenga un tamaño estable y normal, una vez que el individuo alcanza la adultez.

3.2 Vía de señalización de receptor de andrógenos (RA)

El RA es un factor de transcripción dependiente del ligando que pertenece a la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas (31) y como es un factor nuclear, tiene la habilidad de regular la transcripción de ciertos genes que se involucran en el desarrollo y mantenimiento de algunas características sexuales masculinas (32). Está constituido estructuralmente por cuatro dominios funcionales: un dominio NH₂-terminal (DNT), encargado de la activación transcripcional (21,33); un dominio de unión al DNA (DUD) formado por dos “dedos” de zinc que reconocen ciertas secuencias de DNA (31); un dominio de unión al ligando (DUL) que se encarga de la dimerización del FT y activación de la transcripción (21) y una región bisagra que une a los dominios DUD y DUL (**Figura 4**) (34). Además, tiene dos secuencias que ejercen su función como activadoras de la transcripción, la primera (AF-1) está en el DNT y es útil cuando se requiere activar al máximo la actividad del RA, y la segunda (AF-2), está en el DUL y es necesaria para la formación de un sitio de unión para correguladores (31).

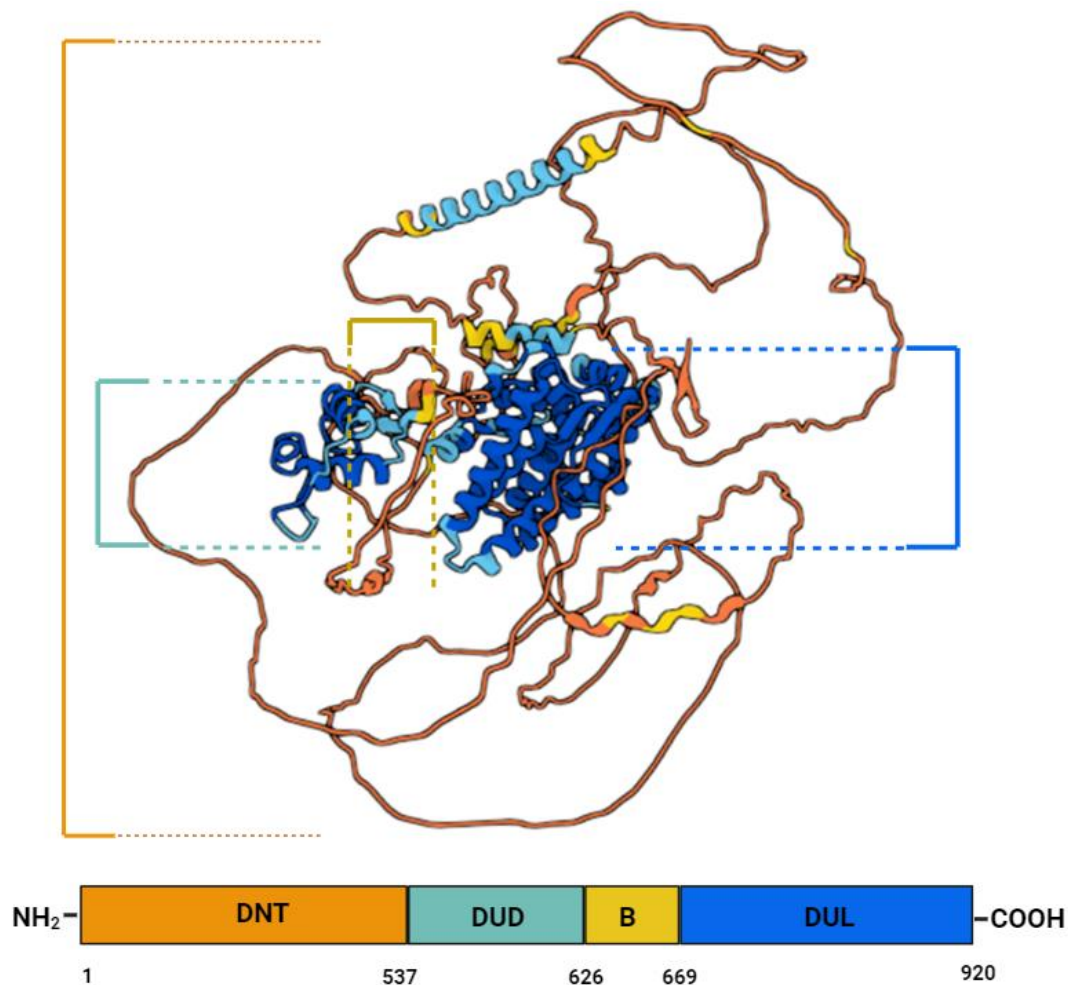


Figura 4. Estructura tridimensional del receptor de andrógenos. Imagen representativa del RA donde DNT representa el dominio N terminal, DUD muestra el dominio de unión al DNA, DUL indica el dominio de unión a ligando y B es la región bisagra que conecta los dos dominios funcionales. Imagen adaptada de “Prostate cancer racial, socioeconomic, geographic disparities: targeting the genomic landscape and splicing events in search for diagnostic, prognostic and therapeutic targets”, por M. Rahaba et al., 2021, PubMed, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33948343/> y elaborada por LECZ en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, no publicada.



El RA inactivo y en forma monomérica se aloja en el citoplasma perinuclear y se mantiene unido a un complejo de proteínas de choque térmico como HSP90, HSP70 y HSP40, que evitan su degradación; cuando un ligando se une a la región DUL, el RA se separa de HSP90, HSP70 y HSP40, dejando que se una a HSP27 y con la capacidad de traslado al núcleo (36). La actividad del receptor es dependiente de ligando y su vía de acción principal o “clásica” depende de su contacto con el DNA.

3.3 Actividad del RA dependiente de unión a DNA

Este mecanismo puede darse a través de dos vías; en la más sencilla, los dedos de zinc de la región DUD se unen directamente a una región promotora o potenciadora de un gen, permitiendo la activación de la región DNT y en consecuencia la regulación de la expresión genética y la posterior síntesis de proteínas implicadas en estimular el desarrollo y mantener el tamaño y la función secretora de la próstata (31).

En el segundo caso, andrógenos como la T y la DHT se unen a la región DUL y provocan un cambio conformacional en el receptor. El complejo viaja desde el citoplasma hasta el núcleo, se dimeriza y se une a elementos de respuesta al receptor de andrógenos (ERA) localizados en regiones promotoras o potenciadoras de genes andrógeno-dependientes (33). Una vez unido al DNA, el dímero de RA forma un complejo con proteínas coactivadoras y correguladoras en las regiones AF-1 y AF-2. La conclusión de este



proceso es, finalmente, la misma que en la unión directa a DNA (**Figura 5**): la inducción o la regulación de la actividad transcripcional (35).

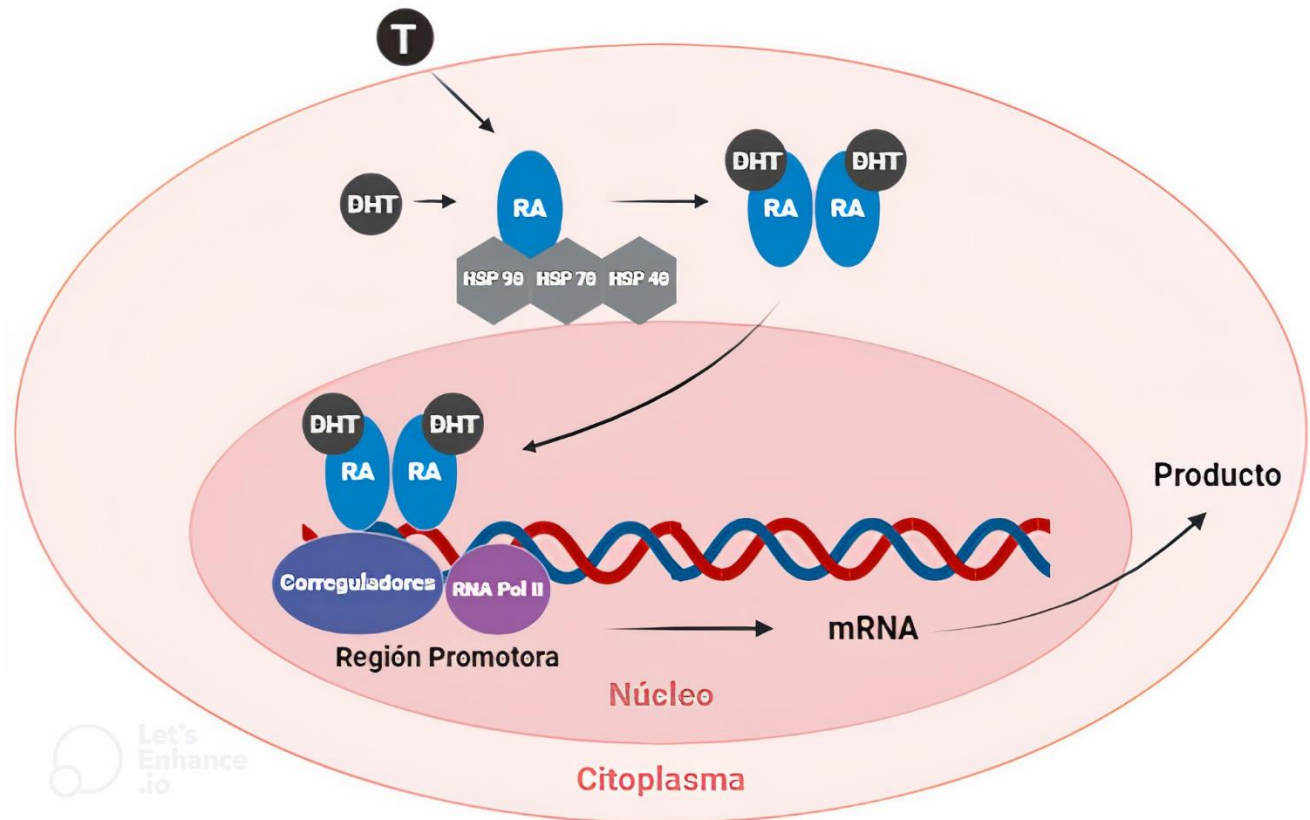


Figura 5. *Actividad del receptor de andrógenos-dependiente de la unión al DNA.* Representación gráfica de la vía de señalización del RA desde su contacto con el ligando, DHT, hasta su interacción con el DNA y el complejo transcripcional; el cual incluye moléculas correguladoras. Imagen elaborada por LECZ en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, no publicada.



3.4 Moléculas de interés que regulan la actividad del RA

El gen denominado *NR3C4* codifica para el RA, se ubica en la posición 12 del brazo largo del cromosoma X (Xq12) y consta de 90 kbp (*kilobase pairs*) que codifican para las regiones funcionales del receptor: El dominio de unión a ligando, el dominio de unión a DNA y el dominio N terminal (36). Como el RA es un factor de transcripción cuya función principal es regular la expresión de ciertos genes, es importante recapitular que no trabaja solo; como se mencionó con anterioridad, necesita la ayuda de moléculas correguladoras con las que forma complejos transcripcionales a través de los cuales cumple sus funciones de regulación. A través de interacciones del RA con las histonas y otros componentes de la cromatina, algunas de estas moléculas inducen o reprimen la expresión génica; por ejemplo, las metilasas transfieren grupos metilo a la posición C5 de las citosinas para formar 5-metil citosina (5mC) y pueden reclutar proteínas involucradas en la represión génica o inhiben la unión de factores de transcripción al DNA, mientras que las desmetilasas revierten el proceso al retirar el grupo metilo de la 5mC (37); las acetilasas añaden grupos acetilo a ciertos residuos de lisina en las histonas, lo que se asocia con una transcripción más activa de la eucromatina, mientras que las desacetilasas retiran dichos grupos y se relacionan con una represión de la cromatina y la disminución de la expresión génica (38). Otras moléculas, por otro lado, no se involucran precisamente con la regulación génica, sino que tienen roles importantes en los procesos de proliferación celular. Algunos de estos genes que codifican para productos relacionados con la regulación de la actividad transcripcional de RA, se describen en las **Tablas 2 y 3**.

**Tabla 2.** *Genes implicados en la regulación epigenética del RA.*

Gen	Producto	Función	Tejidos en donde tiene mayor expresión	Fuente
<i>DNMT1</i>	DNA metiltransferasa 1 (DNMT1)	Metilación de citosinas, mantiene los patrones de metilación.	Placenta y testículos.	(39)
<i>KDM4B</i>	Enzima desmetilasa de lisina 4B (KDM4B)	Desmetilación de las histonas H3-K36 y H3-K9.	Próstata y tiroides.	(40)
<i>HDAC2</i>	Desacetilasa de histona 2 (HDAC2)	Desacetilación de residuos de lisina en histonas H2A, H2B, H3 y H4.	Testículos y endometrio.	(41)
<i>KDM4A</i>	Desmetilasa de lisina 4A (KDM4A)	Conversión de residuos trimetilados de histonas a residuos dimetilados. Represor de la transcripción.	Duodeno, glándula tiroidea y próstata.	(42)
<i>KDM4C</i>	Desmetilasa de lisina 4C (KDM4C)	Conversión de residuos trimetilados de histonas a residuos dimetilados.	Nódulos linfáticos y médula ósea.	(43)
<i>KDM4D</i>	Desmetilasa de lisina 4D (KDM4D)	Desmetilación de la histona H3-K9.	Testículos y cerebro.	(44)
<i>KDM3A</i>	Desmetilasa de lisina 3A (KDM3A)	Desmetilación de la histona H3-K9, promoción de la unión del RA al DNA.	Testículos y médula ósea.	(45)
<i>KDM2B</i>	Desmetilasa de lisina 2B (KDM2B)	Ubiquitinación dependiente de fosforilación.	Nódulos linfáticos y apéndice.	(46)
<i>KDM1A</i>	Desmetilasa de lisina 1A (KDM1A)	Formación de complejos que desacetilan histonas, silenciamiento de genes por desmetilación de histonas.	Testículos y endometrio.	(47)
<i>KDM4E</i>	Desmetilasa de lisina 4E (KDM4E)	Desmetilación de residuos de lisina en histonas H3.	-	(48)

**Tabla 3.** *Genes implicados en la regulación metabólica del RA.*

Gen	Producto	Función	Tejidos en donde tiene mayor expresión	Fuente
NR5A1	Factor esteroideogénico 1 (SF1)	Proteína activadora de la transcripción involucrada en la diferenciación sexual.	Glándula suprarrenal	(49)
SRD5A2	5α-reductasa tipo 2	Cataliza la conversión de T a DHT.	Próstata.	(50)
KLK3	Antígeno específico prostático (PSA)	Proteasa del plasma seminal, interviene en la licuefacción del coágulo seminal.	Sólo en la próstata.	(51)
CREB3	Proteína 3 de unión a elementos de respuesta a cAMP	Se une al elemento de respuesta al cAMP y regula la proliferación celular.	Próstata y testículos.	(52)
CREB3L4	Proteína 3 de unión a elementos de respuesta a cAMP tipo 4	Activador transcripcional	Próstata y estómago.	(53)
CREBZF	Factor de transcripción CREB/ATF bZIP	Involucrado en la regulación negativa de la expresión genética.	Endometrio y bazo.	(54)
CREBRF	Factor regulador de CREB3	Permite la actividad del activador de la transcripción de unión al DNA.	Glándula tiroidea y médula ósea.	(55)
ATF1	Factor activador de transcripción 1	Relacionado con procesos de la fisiología celular, regula genes relacionados con el crecimiento y la proliferación celular.	Glándula tiroidea y glándula suprarrenal.	(56)
CD2BP2	Proteína 2 de unión a la cola citoplasmática CD2	En el citoplasma, se une a la cola citoplasmática del antígeno CD2, regula la activación de linfocitos T mediada por CD2.	Cerebro y nódulos linfáticos.	(57)



4. El receptor de andrógenos y su papel en el CaP

En el tejido prostático normal, la mayor densidad de RA se ubica en las células lumbinales, del estroma y del endotelio (58), se encarga de suministrar proteínas de secreción como el antígeno específico prostático (PSA) y mantiene el tamaño normal de la próstata (59). En el tejido prostático con CaP, sin embargo, el RA se ocupa de la síntesis de PSA, la regulación del metabolismo de lípidos y promueve el crecimiento descontrolado de la glándula (60). Estructuralmente, la región DNT del RA tiene un número de repetidos de glutamina (CAG) que suele ser de 19 a 25, cuya variación provoca cambios en los aminoácidos que lo componen (59). Un número pequeño de repetidos de glutamina se asocia con una alta actividad transcripcional del receptor y por lo tanto con un riesgo más elevado de padecer CaP (61,62). Por otro lado, existe evidencia que sugiere que el factor con una mayor contribución para la progresión del CaP es la pérdida de la especificidad del RA por sus ligandos: T y DHT. En ambos aspectos, la conclusión es similar: la actividad transcripcional de RA se “sale de control”, e inclusive sin el estímulo androgénico que necesita, entra en un estado transcripcionalmente muy activo el cual, finalmente, causa una ruptura en la regulación del eje androgénico (hipotálamo-hipófisis-testicular) y en el ciclo celular normal (59,63).

4.1 El CaP y su relación con el suministro hormonal: Desde la dependencia hasta la resistencia.

Cerca del 80% al 90% de los diagnósticos iniciales de CaP corresponden a CaP dependiente de andrógenos (CPDA) (63); esto significa que, durante su crecimiento



temprano, el tumor depende tanto de la señalización del RA como de sus ligandos T y DHT para proliferar y sobrevivir (64). En estos casos, la terapia de privación de andrógenos (TPA) es una alternativa eficiente para causar su regresión, ya que bloquea la señalización del RA y causa un desbalance entre la relación proliferación-muerte celular (65).

Con el tiempo, las células cancerosas sufren cambios que les hacen activar la señalización del RA inclusive con el bloqueo androgénico. Estos cambios se dan a través de mecanismos que pueden afectar directamente al RA, como la amplificación de *NR3C4* o mutaciones que causen su activación independiente de ligando, o pueden provocar alteraciones indirectas en su actividad, ya sea afectando las vías de esteroidogénesis o modificando la interacción entre el RA y sus correguladores (66,67). Este tipo de evolución, a través de la cual, el tumor encuentra la forma de proliferar a pesar de la TPA, es lo que propone un siguiente escalón en la gravedad de la patología: el CaP independiente de andrógenos (CPIA). Este término, indica que el cáncer continuará progresando inclusive cuando se recurra a la castración quirúrgica o química (68).

Junto con el CPIA, el CaP Resistente a la Castración (CRPC) y el CaP Refractario al Tratamiento Hormonal (CPRTH), constituyen una de las últimas fases de la enfermedad, pues son tipos de cánceres que ya no responden a ningún tipo de tratamiento hormonal (68). Los pacientes que han llegado a este punto tienen opciones limitadas de tratamiento, siendo la quimioterapia la principal línea de defensa (69), desafortunadamente, aunado a



la incidencia de ciertas metástasis que acompañan a estos tipos de cáncer, en este punto, el tiempo promedio de supervivencia oscila entre los 18 y los 20 meses (70).

4.2 Mecanismos que provocan el cambio de la dependencia a la independencia de andrógenos

La TPA es una buena alternativa para la remisión del CaP inicial, sin embargo, en la mayoría de los casos, la progresión del tumor lleva a un CPRC, el cual puede proliferar inclusive sin estimulación androgénica (59). En este aspecto, existen diferentes mecanismos a través de los cuales las células alcanzan este fenotipo, algunos de los más relevantes son los que se discuten a continuación:

1) Mutagénesis en el gen *NR3C4*:

A medida que el CaP evoluciona, aumenta el número de mutaciones en el gen que codifica para el RA, especialmente en las regiones que codifican los dominios DUL y DNT. Las alteraciones son mutaciones puntuales que sustituyen a un solo aminoácido, pero son suficientes para activar indiscriminadamente al RA, provocando la pérdida de su especificidad por ligandos androgénicos; por ello, algunos estudios han sugerido que, cuando se desarrolla una mutación que permite la activación del RA por múltiples ligandos, se selecciona para heredarse a las siguientes generaciones celulares y, si demuestra una ventaja evolutiva, se vuelve predominante en el tumor (61,65,73). Entre un 15% y un 30% de casos de CPRC se han registrado ciertas mutaciones puntuales en *NR3C4* (59).



2) Amplificación de NR3C4:

Aunque la TPA es eficiente al reducir la producción endógena de andrógenos (fuera del tumor), no los elimina, por lo que aún existe cierto nivel de andrógenos disponibles, aunque en muy baja concentración; como consecuencia, en este mecanismo de amplificación, hay una sobreexpresión del RA, tanto a nivel de mRNA como a nivel de proteína, que compensa la deficiencia de T y DHT. La amplificación podría explicar por qué, durante la TPA, las células del CaP conservan la capacidad de responder a los andrógenos, aprovecharlos y proliferar (59,63,71). Entre un 25% y un 30% de casos de CPIA, se han registrado amplificaciones de NR3C4 (72).

3) Sobreexpresión de los correguladores de RA:

Como se mencionó anteriormente, el RA, además de ser un receptor, es un factor de transcripción y su trabajo es inducir o inhibir la transcripción de genes relevantes en el desarrollo sexual; por esta razón, necesita la ayuda de moléculas correguladoras, ya sean coactivadores o correpresores. Estos correguladores interactúan con el receptor y estimulan su actividad transcripcional al formar complejos que permiten la apertura de la cromatina en los sitios específicos del DNA a los que el RA se une (59,71). Se han documentado cerca de 170 correguladores del RA, cualquier cambio en la expresión de alguno de ellos puede provocar un desbalance en la expresión de los genes que RA se encarga de regular, lo cual, finalmente conlleva a la disrupción de su cadena de señalización (18,71).



4) Alteración en las vías de síntesis androgénica:

La función de la TPA es reducir la actividad de los andrógenos específicamente endógenos o andrógenos que vienen del exterior del tumor; y eso se obtiene al bloquear las vías de síntesis androgénicas o inhibiendo la afinidad de los andrógenos hacia el RA. Dentro de esta categoría, se han estudiado alternativas muy intrigantes; por ejemplo, se cree que puede haber alteraciones en la señalización de las vías esteroideogénicas debido a que las células cancerosas pueden activar ciertas enzimas y vías para obtener sus propios andrógenos exógenos, pero también hay evidencia que sugiere la posibilidad de que al interior del tumor ocurra una síntesis androgénica *de novo* o a partir de precursores suprarrenales (71,73–75).



Planteamiento del problema

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y la Secretaría de Salud de México, el CaP es el segundo cáncer más común en hombres, después del cáncer de pulmón y representa una frecuencia significativa en los diagnósticos de cáncer en México. Los esfuerzos en el Sistema de Salud para aumentar la conciencia sobre la importancia de los exámenes de detección, como el antígeno prostático específico (PSA) y el tacto rectal, han contribuido a un diagnóstico más temprano, oportuno y a un mejor pronóstico de vida para los pacientes con CaP en México. Sin embargo, es importante destacar que los niveles elevados del PSA no siempre apuntan al desarrollo de CaP. En muchos hombres con niveles elevados de PSA se ha observado la ausencia de CaP mientras que, hombres con niveles normales de PSA pueden llegar a desarrollarlo. Por consiguiente, los niveles de PSA aunado a otros factores, como el tacto rectal y la historia clínica, pueden coadyuvar en el diagnóstico del CaP y en la toma de decisiones sobre la necesidad de realizar biopsias u otras pruebas. En este sentido, el estudio molecular de la epigenética del CaP es fundamental para comprender mejor los mecanismos biológicos subyacentes a la neoplasia, esto con la finalidad de identificar nuevas estrategias terapéuticas y biomarcadores de diagnóstico y marcadores pronósticos. Los avances en este campo de las biociencias del CaP pueden significativamente conducir a tratamientos más eficaces y personalizados para el cáncer de próstata.



Justificación

En este proyecto de investigación nosotros proponemos estudiar y evaluar la expresión a nivel transcripcional de los genes dependientes del factor transcripcional denominado NR3C4/RA en pacientes con CaP; esto con la finalidad de establecer nuevos biomarcadores moleculares y otorgar decisiones informadas sobre la salud prostática.



Hipótesis

Los pacientes con cáncer de próstata pueden presentar variaciones de expresión en genes asociados a la regulación mediada por el receptor de andrógenos.



Objetivo General

Identificar y caracterizar la contribución de variaciones de expresión epigenética en pacientes con CaP e identificar su etiología molecular.

Objetivos Particulares

Identificar factores epigenéticos asociados al RA en pacientes con CaP.

Determinar los perfiles de expresión génica de genes andrógeno-dependientes en pacientes con CaP.

Proponer nuevos genes como marcadores diagnósticos o pronósticos en pacientes con CaP.



Materiales y métodos

1. Pacientes

Este estudio incluyó 10 pacientes masculinos con diagnóstico confirmado de CaP, con un diagnóstico histopatológico de 7 en escala de Gleason. La edad de los pacientes varió entre 62 a 72 años, con una edad promedio de 66 años. Las muestras de tejido prostático se obtuvieron mediante biopsia quirúrgica al momento de la prostatectomía radical y todos los pacientes proporcionaron su consentimiento informado para participar en el estudio, el cual fue aprobado por el comité de ética y prevención de conflicto de intereses del Instituto Nacional de Cancerología. La Carta de Consentimiento Informado proporcionada a todos los pacientes se encuentra en el **Apéndice A**. En este estudio genómico-molecular, ningún tipo de prueba se aplicó directamente en los pacientes; es un estudio comparativo entre casos y controles. Por otro lado, este estudio se considera de tipo traslacional, ya que se realizaron estudios en el área clínica para la valoración y manejo de los pacientes, así como en el área básica para el análisis molecular de CaP. El Comité de Investigación y el Comité de Ética en Investigación del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán aprobaron el protocolo de investigación con número de registro BRE-3595-21-24-1 (Reguladores epigenéticos: identificación de variantes patogénicas en pacientes con cáncer de próstata). La Investigación se apega en forma estricta a los principios vertidos en la Declaratoria de Helsinki.



2. Análisis bioinformático

Para analizar las interacciones entre los genes estudiados, se utilizó la herramienta GeneMania (<https://genemania.org/>). Se ingresaron los genes de interés descritos en la introducción, tanto los reguladores epigenéticos registrados en la **Tabla 2**, como los metabólicos registrados en la **Tabla 3**; y se generó un diagrama de interacciones basado en datos de interacciones físicas, co-localización, co-expresión y otros factores relevantes. Los resultados del análisis bioinformático están asignados en la sección de resultados y corresponden a la **Figura 6**.



3. Extracción de RNA

El aislamiento de RNA de los pacientes se realizó a partir de 20 muestras de tejido prostático. A cada uno de los 10 pacientes, le correspondían 2 muestras, una de tejido normal (TN) y otra de tejido tumoral (TT).

Los tejidos se colocaron en tubos corex limpios y secos, y se les añadieron de 1 a 3 mL de TRIzol™ (*Thermo Fisher Scientific*), dependiendo del tamaño del tejido. Se homogeneizaron los tejidos con un *Polytron PT 10-35*. Posteriormente, a cada tubo se agregaron 0.2 mL de cloroformo (*Sigma Aldrich*, grado biología molecular $\geq 99\%$) por 1 mL de TRIzol. Todos los tubos se agitaron vigorosamente y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 min. Las muestras se centrifugaron por 15 min a 12,000 xg y se procedió a decantar la fase acuosa y a transferirla a otro tubo corex, limpio y seco. A la fase acuosa se le agregaron 0.5 mL de isopropanol (*Shelton Scientific, Inc.* 99%) por 1 mL de TRIzol y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 10 min. Una vez terminado el tiempo de incubación, la fase acuosa se centrifugó durante 10 min a 12,000 xg para favorecer la formación de un precipitado. Habiendo formado e identificado el precipitado en los tubos, se decantó el sobrenadante y el interior del tubo se lavó con 1 mL de etanol al 75%. Nuevamente, se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12,000 xg y se decantó por segunda vez la fase sobrenadante. Finalmente, el RNA extraído se hidrató con 50 a 200 μ L de agua destilada y tratada con dietil pirocarbonato (DEPC), dependiendo de la densidad del precipitado obtenido. El RNA en solución se recolectó en microtubos



de 0.5 mL estériles, y se cuantificó espectrofotométricamente a 260 nm (*Spectrophotometer Beckman Du[®] 650*).



4. Análisis de la integridad del RNA

Para poner en evidencia la integridad del RNA antes de proceder con la síntesis del cDNA, primero se prepararon 100 mL de un gel para electroforesis de la siguiente manera: En un matraz Erlenmeyer de 300 mL se pesaron 1.5 g de LE Agarosa (*Nara Biotec*) y al mismo, se añadieron 72 mL de agua tratada con DEPC; la mezcla se calentó hasta solubilizar y homogeneizar la agarosa. Se dejó enfriar a 50 °C y se añadieron 10 mL de 3-(N-morfolino)-ácido sulfónico de propano (*MOPS*) 10X y 18 mL de formaldehído. El gel en forma líquida se transfirió a una cámara de electroforesis y se dejó solidificar. Una vez listo el gel, a la cámara se añadieron 600 mL de MOPS 1X como buffer para la electroforesis. Para desnaturalizar el RNA extraído y poder visualizarlo en el gel se prepararon, en microtubos de 0.5 mL, 20 soluciones de desnaturalización con los siguientes reactivos en orden:



Tabla 4. *Reactivos empleados para preparar la solución de desnaturalización del RNA extraído de cada una de las 20 muestras*

Paciente	1 al 10
MOPS 10X (μL)	2
Formaldehído (μL)	4
Formamida (μL)	10
Bromuro de etidio (μL)	1
RNA (μL)	CBP 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de RNA

Las soluciones preparadas se incubaron a 70 °C durante 10 min y después se incubaron en hielo durante otros 10 min. Finalmente, a cada microtubo se le añadieron 2 μL de solución de carga (glicerol al 50% v/v, azul de bromofenol 0.25% p/v y EDTA 10 mM pH8 en H₂O bidestilada); las muestras se cargaron en el gel de agarosa y se dejó correr la electroforesis durante 2 h a 50 V.



5. Síntesis de cDNA

Una vez que se extrajo el RNA y se constató su integridad, se procedió a realizar la síntesis del DNA complementario (cDNA) empleando el estuche *Maxima First Strand cDNA Synthesis kit for RT-qPCR* (Thermo Fisher Scientific, grado biología molecular, Lituania). En microtubos estériles de 0.2 mL, se añadieron los siguientes reactivos en orden:

Tabla 5. *Reactivos empleados para llevar a cabo la síntesis de cDNA a partir del RNA extraído de los 10 pacientes*

Paciente	1 al 10
5X Reaction Mix (μL)	4
Maxima Enzyme Mix (μL)	2
RNA 2μg/μL (μL)	2
H₂O (μL)	CBP 20

Posteriormente, el contenido de cada tubo se agitó vigorosamente y se centrifugó. Finalmente, todos los tubos se colocaron en un termociclador (*Veriti 96 Well Thermal Cycler*) y se incubaron por 10 min a 25 °C y por 30 min a 50 °C. La reacción se terminó al alcanzar una temperatura de 85 °C y conservarla por 5 min. El cDNA sintetizado se almacenó a –20 °C.



6. PCR tiempo real

Para concluir con el desarrollo experimental, se realizó un procedimiento de PCR cuantitativo en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés *real time quantitative PCR*) con la finalidad de amplificar y cuantificar genes particulares relacionados con la regulación de la actividad transcripcional del RA. Se clasificaron las reacciones en dos grupos, 10 reacciones del TN de los 10 pacientes (**Tabla 6**) y 10 reacciones del TT de los mismos pacientes (**Tabla 7**). A oscuras y en orden, se mezclaron los reactivos pertenecientes al estuche *LightCycler® TaqMan® Reaction Kit* (Roche, grado biología molecular, Suiza) que se describen en las **Tablas 6 y 7**.

Tabla 6. Reactivos empleados para preparar las reacciones de q-PCR del cDNA de TN, considerando al gen de Actina como el gen constitutivo.

Paciente	Control negativo	1 al 10
H ₂ O (μL)	15.4	10.4
LightCycler® TaqMan® Reaction Mix (μL)	4	4
Forward primer 20 μM (μL)	0.2	0.2
Reverse primer 20 μM (μL)	0.2	0.2
Sonda (μL)	0.2	0.2
cDNA (μL)	5	5



Tabla 7. Reactivos empleados para preparar las reacciones de q-PCR del cDNA de TT, considerando como gen problema a cada uno de los 20 genes seleccionados en el análisis bioinformático

Paciente	Control negativo	1 al 10
H₂O (μL)	15.4	10.4
LightCycler® TaqMan® Reaction Mix (μL)	4	4
Forward primer 20 μM (μL)	0.2	0.2
Reverse primer 20 μM (μL)	0.2	0.2
Sonda (μL)	0.2	0.2
cDNA (μL)	5	5

Posteriormente, el volumen total de todas las muestras se transfirió por separado a capilares limpios y se centrifugó de 2 a 3 segundos para favorecer que el contenido se acoplara al fondo del capilar. Finalmente, los capilares se colocaron en el termociclador y se incubaron bajo las siguientes condiciones:

Tabla 8. Condiciones de incubación del RT-qPCR de las muestras

Etapas	Temperatura	Tiempo	Número de ciclos:
Desnaturalización	95 °C	10 min	1
qPCR	95 °C	10 seg	45
	60 °C	30 seg	
	72 °C	01 seg	
Enfriamiento	40 °C	10 seg	1



Debido a que, haciendo uso de la herramienta GeneMania, se seleccionaron para su análisis 20 genes de interés, incluyendo el mismo receptor de andrógenos, el proceso de RT-qPCR se repitió 21 veces con los mismos reactivos, cambiando únicamente los *primers* y la sonda empleados por reacción. En la **Tabla 12**, del **Apéndice B**, se registraron las secuencias nucleotídicas correspondientes a cada gen y su proveedor de origen.



7. Análisis estadístico de los resultados de RT-qPCR

Considerando a la β -Actina como el gen *housekeeping*, los valores de Ct (por sus siglas en inglés, *crossing threshold*) de expresión génica obtenidos mediante RT-qPCR fueron analizados y comparados utilizando el método de cuantificación relativa por métodos Ct. En este análisis, se calculó el valor de expresión génica relativa del gen problema, tanto en el tejido normal (No Cáncer) como en el tejido tumoral (Cáncer), haciendo uso de las **Ecuaciones 1 y 2** respectivamente.

$$\Delta Ct_{\text{Cáncer}} = Ct_{\text{Gen } x} - Ct_{\text{Houskeeping}} \quad (1)$$

$$\Delta Ct_{\text{No cáncer}} = Ct_{\text{Gen } x} - Ct_{\text{Houskeeping}} \quad (2)$$

Para identificar diferencias estadísticamente significativas entre los valores de expresión génica relativa (ΔCt) entre los dos tipos de tejido, para todos los genes analizados, se llevó a cabo una prueba t de Student (considerando un valor de $p < 0.05$), en el software *Graphpad Prism* (versión 8.0). Además, los valores de ΔCt se representaron de manera visual en una gráfica de dispersión elaborada en el software *Orange Data Mining* (versión 3.38.1).



Resultados

1. Interacciones predictivas entre NR3C4 y sus correguladores

Con la finalidad de identificar el tipo de interacciones existentes entre NR3C4, correguladores, reguladores epigenéticos y reguladores metabólicos, se realizó un tamizaje virtual con la ayuda de la herramienta GeneMania (**Figura 6**).

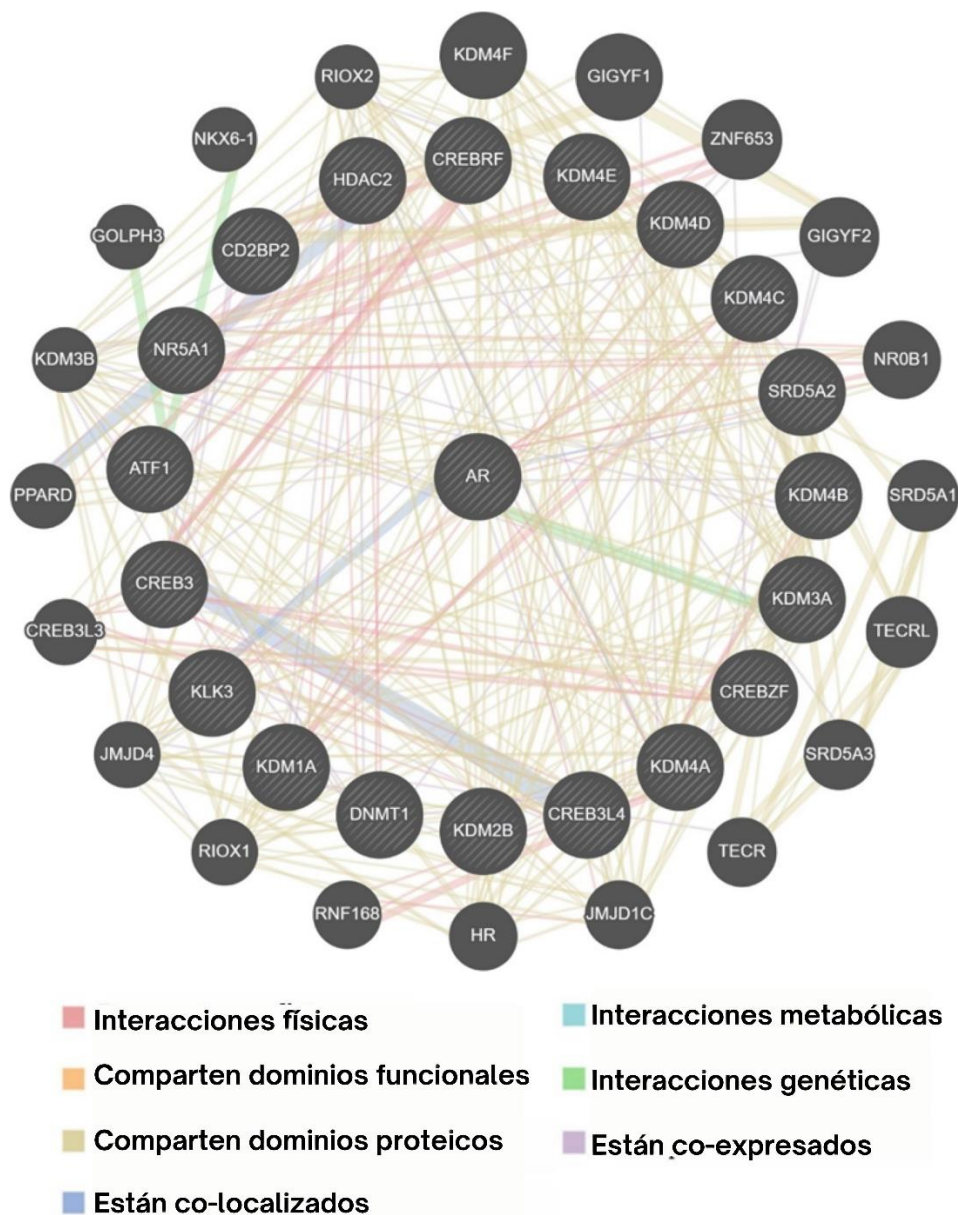


Figura 6. Diagrama esquemático que muestra las moléculas de interés en la regulación de la actividad del NR3C4. En función del color, el diagrama esquematiza las interacciones predictivas entre 39 correguladores diferentes y el RA. Imagen elaborada por LECZ en el laboratorio de Bioquímica Hormonal, departamento de Biología de la Reproducción, INCMNSZ, no publicada.



El esquema de la **Figura 6** demuestra que los genes pueden estar unidos por diferentes tipos de interacciones según los parámetros que cumplen. Estos parámetros están descritos a detalle en la **Tabla 9**.

Tabla 9. Descripción de los parámetros utilizados por GeneMania para encontrar y predecir interacciones entre el conjunto de genes estudiados

Interacción	Definición
Co-expresión	La unión entre dos genes cuando sus niveles de expresión son similares a pesar del cambio de condiciones en un estudio de expresión génica.
Interacción física	La unión entre dos genes que podrían interactuar en un estudio de interacciones proteína-proteína.
Interacción genética	La unión entre dos genes cuando se demuestra que la alteración o modificación en uno de ellos puede afectar al otro y viceversa.
Comparten dominios proteicos	La unión entre dos genes que comparten uno o más dominios proteicos.
Co-localización	La unión entre dos genes que están expresados en el mismo tejido o si sus productos pueden identificarse en las mismas células.
Interacciones metabólicas	La unión entre dos genes que participan en las mismas reacciones en una vía metabólica.
Comparten relaciones funcionales	La unión entre dos genes que tiene una relación funcional entre ellos, a menudo, interacciones proteicas.

Nota. Información consultada en la sección de Help and Documentation del programa GeneMania: <https://pages.genemania.org/help/>



De los 39 productos identificados, se seleccionaron para su estudio sólo 19 de ellos, los cuales corresponden a la sección más interna del esquema. En las **Tablas 2 y 3**, se describen brevemente sus productos, funciones y ubicación.

2. Análisis de la integridad del RNA

Con la finalidad de constatar la efectividad de la metodología de extracción de RNA de las muestras de TT y TN, se recurrió a una electroforesis de los productos en gel de agarosa (al 1.5%), usando bromuro de etidio como colorante para su visualización posterior (**Figura 7**).

Los resultados de la **Figura 7** demuestran la presencia de RNA (entre RNA mensajero, RNA ribosomal, y otros), extraído del tejido tumoral.

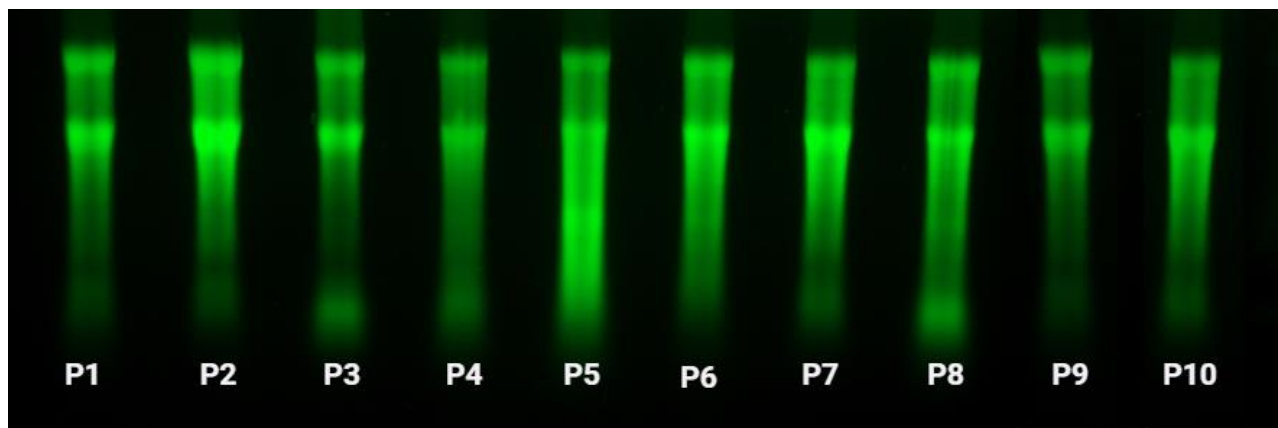


Figura 7. Imagen en pseudocolor representativa de la integridad del RNA extraído. En el gel de agarosa al 1.5%, se observan los productos de la extracción de RNA de los pacientes (P) 1 al 10. Todas las bandas corresponden a productos de tejido tumoral.



3. Resultados del análisis de PCR tiempo real

Cada análisis de RT-qPCR arrojó un gráfico ilustrativo del aumento de la fluorescencia de la reacción, es decir, el aumento de la expresión génica, en función del número de ciclos transcurridos (**Figura 8**).

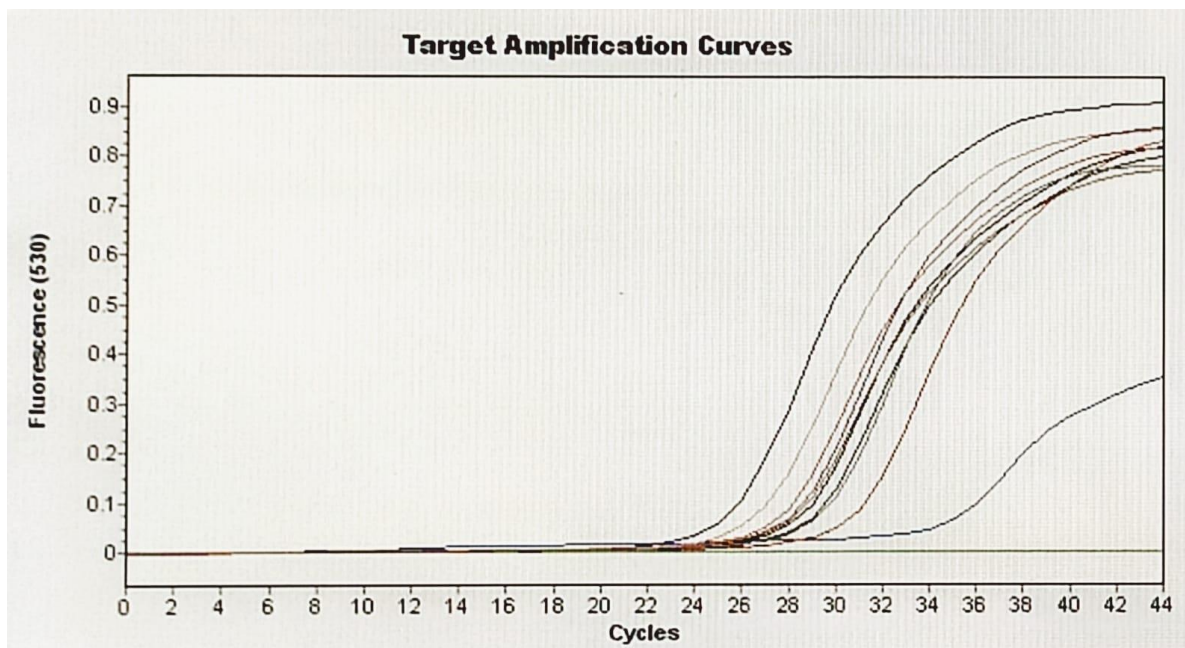


Figura 8. *Ejemplo de las curvas de amplificación obtenidas tras análisis RT-qPCR, tomando como ejemplo el análisis de NR3C4. El gráfico que se observa corresponde al resultado del protocolo número 25, el cual hace referencia a la amplificación de NR3C4 en tejido normal. En el área que abarca valores de fluorescencia entre 0.1 y 0.9, se observan 10 curvas de amplificación, las cuales corresponden a las muestras de cada paciente (del 1 al 10); mientras que la curva que no presenta ningún aumento de fluorescencia (es decir, que permanece en 0) es la que corresponde al blanco.*



Además, el detector del equipo también arrojó el conjunto de valores de Ct calculados por cada curva de amplificación. Como ejemplo de ello, se pueden observar los valores de Ct de NR3C4, tanto del análisis de tejido sano como de tejido tumoral, en la **Tabla 10**.

Tabla 10. Ejemplo del conjunto de valores de Ct calculados en cada curva de amplificación de NR3C4, a partir de las dos muestras de tejido (TN y TT) de cada paciente (del 1 al 10), tomando como referencia al gen ACTB.

Paciente	Referencia TN: ACTB	Referencia TT: ACTB	Objetivo 1: NR3C4 (TN)	Objetivo 2: NR3C4 (TT)
1	20.66	20.22	27.10	26.92
2	21.93	23.53	30.56	30.30
3	21.03	20.59	28.11	30.60
4	20.35	20.65	27.43	27.14
5	19.97	18.22	28.71	26.46
6	19.73	19.27	25.28	26.58
7	20.33	17.31	29.15	25.49
8	16.64	16.02	26.52	25.83
9	18.39	17.80	27.98	26.48
10	19.17	17.62	27.98	26.56

Todos los valores de Ct obtenidos se analizaron y compararon utilizando el método de cuantificación relativa por el método de DDCT.



Para corroborar la presencia de productos de amplificación, se recurrió a la visualización de las muestras en un gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio tras su análisis de RT-qPCR. La **Figura 9** es una imagen representativa de uno de estos resultados, y demuestra que, efectivamente, el objetivo del análisis, el cDNA seleccionado, se amplificó de manera adecuada.

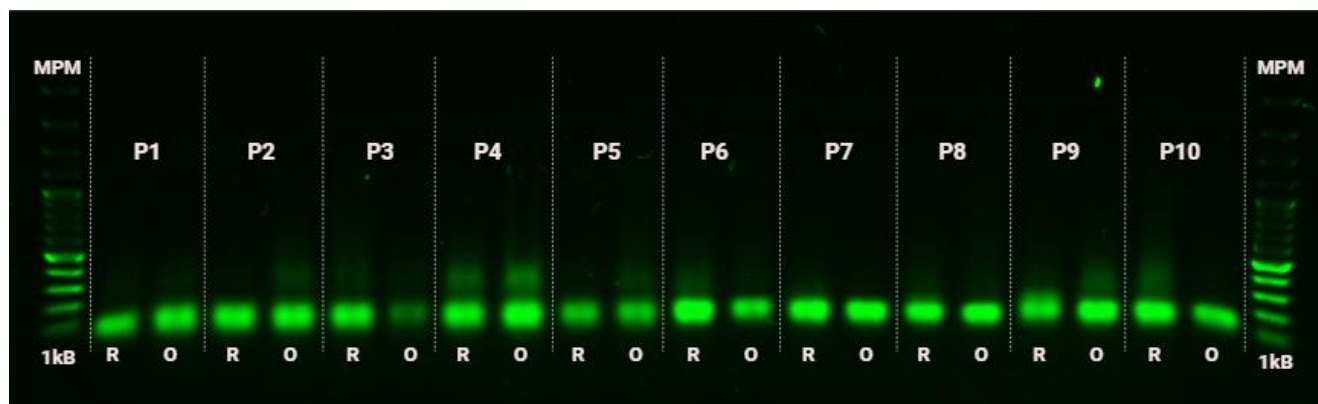


Figura 9. *Imagen en pseudocolor representativa que muestra la visualización de la amplificación del NR3C4 tras el análisis de RT-qPCR.* En el gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, se observan, en orden y de izquierda a derecha, los resultados de los pacientes (P) 1 al 10. Las bandas concernientes al objetivo (O), corresponden al gen objetivo de la amplificación: NR3C4, mientras que las de referencia (R) corresponden al gen housekeeper: ACTB. A los extremos del gel, se colocaron marcadores de peso molecular (MPM) de 1 kB. Los resultados corresponden a tejido tumoral.

4. Comparación de la expresión génica relativa de los genes estudiados

Las **Figuras 10 y 11** representan los resultados globales de la comparación de la expresión génica relativa entre el TT y el TN, de los 19 coreguladores y el RA.

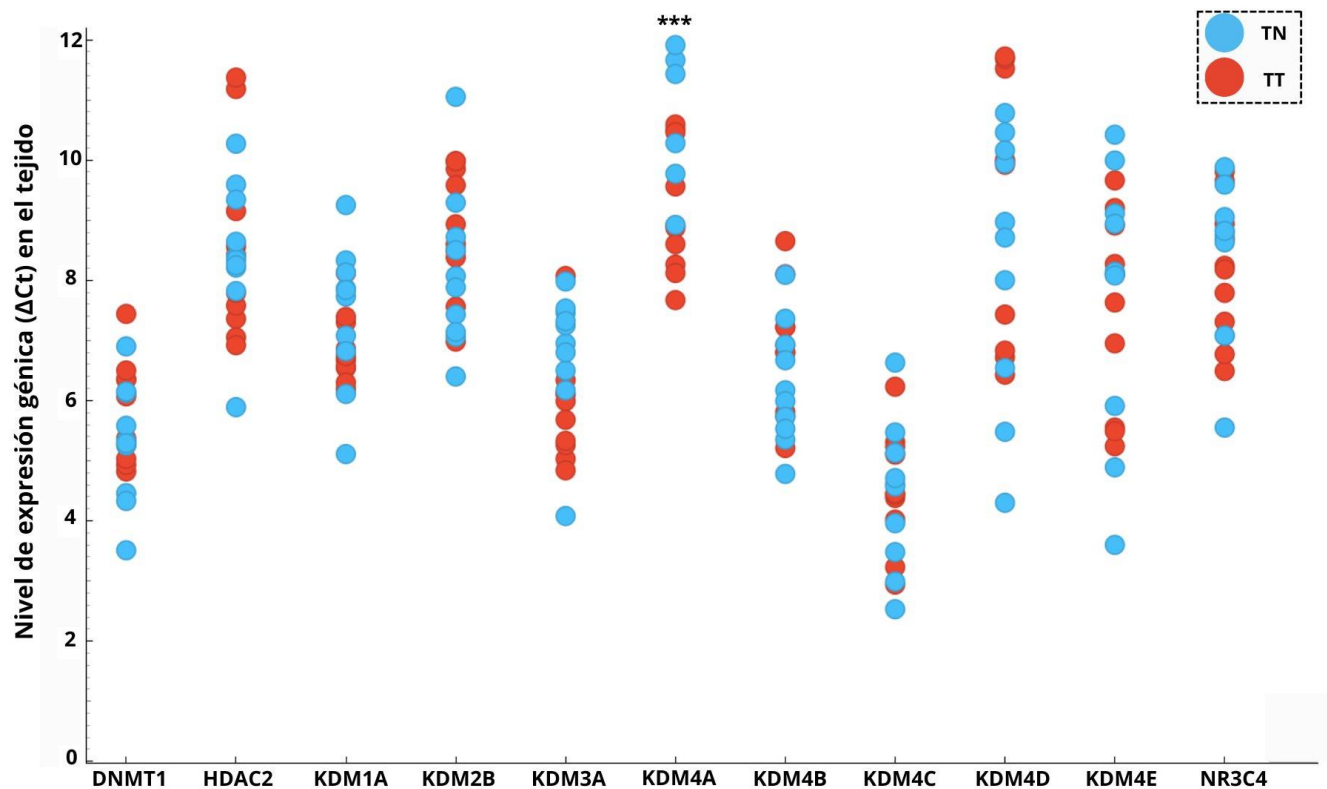


Figura 10. Comparación de la expresión génica relativa entre TN (tejido normal) y TT (tejido tumoral) para los genes implicados en la regulación epigenética de NR3C4, y para NR3C4. *** $p < 0.001$. La prueba t de Student para comparar ambos tejidos se realizó en Graphpad Prism (versión 8.0) y la gráfica de dispersión fue generada en Orange Data Mining (versión 3.38.1).

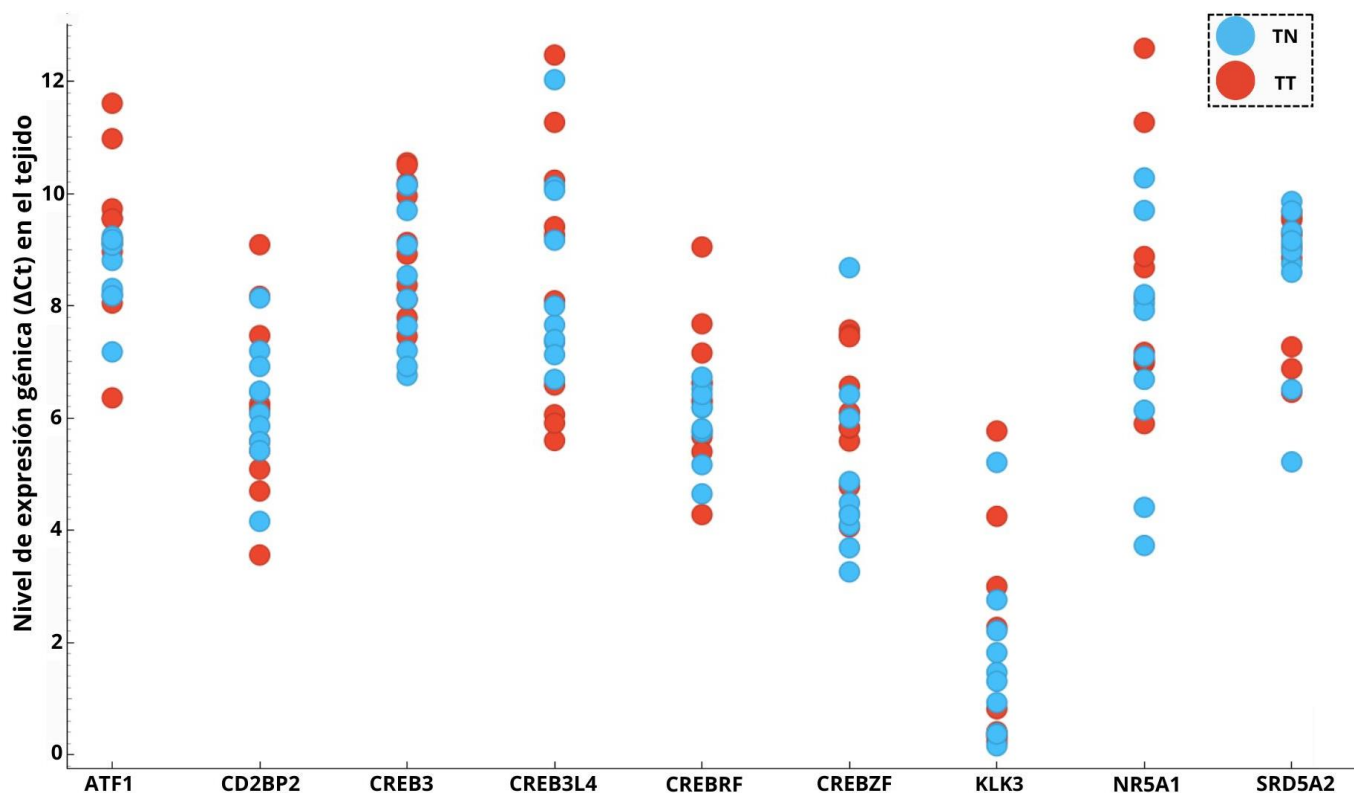


Figura 11. Comparación de la expresión génica relativa entre TT y TN para los genes implicados en la regulación metabólica de NR3C4. *** $p < 0.001$. La prueba t de Student para comparar ambos tejidos se realizó en Graphpad Prism (versión 8.0) y la gráfica de dispersión fue generada en Orange Data Mining (versión 3.38.1).

A simple vista, entre los grupos de datos mostrados por cada gen, incluyendo a NR3C4, en las **Figuras 10 y 11**, parecen existir diferencias significativas resultantes de la comparación de ambos tejidos, sin embargo, el análisis estadístico mediante una prueba t de Student reveló que sólo *KDM4A* demostró una diferencia estadísticamente significativa al comparar TT con TN, con un valor de $p < 0.001$.



Por otro lado, aunque no se obtuvieron diferencias significativas dependiendo del tejido en los demás genes, sí se puede observar una subexpresión génica considerable en el caso de KLK3 (antígeno específico prostático) en la **Figura 11**.



Discusión

Hallazgos previos han reportado que, en la mayoría de los pacientes con CaP, el RA tiene un rol crítico en el crecimiento y la diferenciación del tumor (76) y, por lo tanto, la progresión del CaP depende de su actividad transcripcional (77). En consecuencia, durante la última década se han desarrollado innumerables estudios que buscan comprender los mecanismos que se asocian a la modulación de la actividad de RA y que, a su vez, demuestren tener cierto grado de importancia oncológica. Uno de estos mecanismos es la alteración de la expresión génica de los corre reguladores que forman parte de la maquinaria transcripcional del RA, o que comparten vías metabólicas con él, principalmente porque se asocia a una mayor agresividad en el carácter del cáncer y, por ende, a un pronóstico desfavorable (78).

Para entender mejor la importancia de estos corre reguladores, es necesario comprender que son moléculas reclutadas por el RA que pueden unirse a ciertas regiones de NR3C4/RA y favorecer (coactivadores) o inhibir (correpresores) su activación transcripcional, sin la necesidad de interactuar directamente con el DNA. Como son de familias y de naturalezas distintas, sus mecanismos también lo son; por ejemplo, algunas inducen la apertura o el cierre de la cromatina, algunas reclutan factores de transcripción que son necesarios para que la RNA polimerasa II comience el proceso de transcripción, algunas facilitan la unión del RA al DNA, algunas interactúan con él a través de diferentes vías metabólicas (78), etcétera.



En este proyecto, el enfoque principal se dirigió a identificar una relación oncológica relevante entre reguladores epigenéticos que ejercen su actividad a través de la desmetilación o a desacetilación de la cromatina, así como reguladores metabólicos que están involucrados en procesos de diferenciación sexual, proliferación celular, activación de vías metabólicas dentro de las células prostáticas, etcétera; con la intención de demostrar que al menos uno de ellos puede asociarse a la incidencia del CaP en los sujetos de estudio.

La **Figura 10** esquematiza la comparación de la expresión génica relativa entre TT y TN para los genes correspondientes a la **Tabla 2**, incluyendo a NR3C4. En el caso de NR3C4, no se observó ninguna diferencia significativa entre TT y TN, lo cual difiere de los hallazgos de autores como Tan et al. (2014) (79) y Jamroze et al. (2022) (80), quienes han reportado que, debido a mecanismos como la amplificación genómica, NR3C4 suele encontrarse sobreexpresado en el CaP (80). Tal resultado sugiere que, al menos en la cohorte de estudio, la expresión génica de NR3C4 no sigue precisamente el patrón descrito en la literatura, lo cual podría deberse al avanzado estado del cáncer en los sujetos de estudio.

Por otro lado, la misma figura demuestra que sólo KDM4A evidenció una sobreexpresión relevante en el TT en comparación con el TN. Específicamente, el análisis estadístico reveló que *KDM4A* presentó una diferencia significativa en la expresión génica relativa con



$p < 0.001$ cuando se compararon ambas muestras de tejido. KDM4A forma parte de la subfamilia de desmetilasas de lisina tipo 4 (KDM4) y no es el único integrante de dicho grupo que se incluyó en este estudio, además de él, se analizaron los miembros: KDM4B, KDM4C, KDM4D y KDM4E (81).

La metilación de histonas (H) ocurre comúnmente en numerosas posiciones de residuos de lisina (K) de las histonas 3 (H3), 4 (H4) y en el isotipo 4 de la histona 1 (H1.4). A grandes rasgos, los miembros de la subfamilia KDM4 retiran grupos metilo, ya sean mono- (me1), di (me2) o tri- (me3), de sitios específicos de algunas histonas para regular epigenéticamente la estructura de la cromatina y la expresión génica (82). Todas las KDM4s comparten dos dominios proteicos altamente conservados, el dominio Jumonji N (JmjN) y el dominio Jumonji C (JmjC) (83), los cuales forman un dominio catalítico de desmetilasa que les ayuda a cumplir con su función. Trabajan con los mismos sustratos, sin embargo, ya que están formadas por otros dominios proteicos, cumplen con actividades distintas, pues tienen afinidad por diferentes posiciones. Por ejemplo, KDM4A, B y C se enfocan en desmetilar H3K9me3 o H3K36me3, mientras que KDM4D prefiere H3K9me2 (79). A pesar de la similitud entre los miembros de la subfamilia KDM4, en la **Figura 10**, no es observable ninguna expresión génica significativa entre KDM4B, C, D o E, y sólo KDM4A presentó una alteración relevante.



Además de la subfamilia 4 de las desmetilasas de lisina específicas, también se estudió el comportamiento de las subfamilias 1, 2 y 3, específicamente para los miembros KDM1A, KDM2B y KDM3A, los cuales favorecen la actividad transcripcional al desmetilar respectivamente las siguientes posiciones: H3K9me (84), H3K79me (85), H3K9me1/H3K9me2 (86). Otras dos moléculas involucradas en el estudio fueron la metiltransferasa DNMT1 y la desacetilasa HDAC, ambas, según lo especifica la **Tabla 2**, también fungen como reguladores epigenéticos de RA. Sin embargo, y a pesar de la versatilidad de su naturaleza y de su afinidad, ninguna de estas moléculas demostró tener un aumento significativo en el TT de los pacientes.

Por lo tanto, el único regulador epigenético, y el único miembro de la familia KDM, que demuestra tener un impacto significativo es, sin lugar a duda, KDM4A. En la **Tabla 2**, se describe que ésta es abundante en el duodeno, la glándula tiroidea y la próstata, y que su actividad de desmetilasa la asocia a una activación de la expresión génica debido a la relajación del empaquetamiento del DNA; además, la **Figura 6** corrobora la existencia de una interacción física entre esta enzima y el RA, al tiempo que pone en evidencia la ausencia de interacciones directas por parte de los demás reguladores epigenéticos.

En condiciones normales, KDM4A cumple con numerosos roles fisiológicos, pero en general, se involucra en procesos que regulan la homeostasis de los tejidos como la diferenciación de adipocitos, osteocitos y células madre neurales, o como la proliferación



celular en la regeneración del músculo esquelético (87–89). Sin embargo, la literatura también evidencia que KDM4A puede involucrarse en algunas enfermedades al alterar la expresión de ciertos genes, como en la diabetes, la aterosclerosis, la hipertrofia cardíaca y varios tipos de cáncer (90–92).

Existe evidencia que demuestra que KDM4A está sobreexpresado en CaP y que, al fungir como uno de los coactivadores de RA dentro de su maquinaria transcripcional, es una pieza relevante en la progresión de la enfermedad (93). Debido a su implicación dentro de la patología, se han realizado numerosos estudios que buscan entender el mecanismo, o mecanismos, a través de los cuales KDM4A se relaciona con o promueve la tumorigénesis.

Por ejemplo, se ha observado que KDM4A promueve la proliferación celular mediante una vía de señalización llamada Lgr4/KDM4A/RA (94). Lgr4 es un receptor de hormonas glicoproteicas que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G y que contiene dominios con repetidos de leucina en el extremo N-terminal, los cuales le permiten interactuar con otras moléculas. Al entrar en contacto con su ligando, se activa la proteína G y se desencadenan una serie de cascadas de señalización involucradas en diferentes procesos del metabolismo celular (95). En el contexto del CaP, y de múltiples tipos de cáncer, tres de estas vías de señalización son esenciales: Wnt, que se relaciona con la regulación de la proliferación celular y el desarrollo de tejido (96); Notch, que se involucra en el desarrollo de los tejidos y la homeostasis de la diferenciación celular (97) y



Sonic Hedgehog (SHH), que es crucial durante el desarrollo celular (98). En la vía Lgr4/KDM4A/RA, la activación de cualquiera de estas tres cascadas de señalización, implica un desbalance de la regulación transcripcional de múltiples desmetilasas de lisina, siendo una de ellas KDM4A (99). En consecuencia, la sobreexpresión de KDM4A y su subsecuente interacción con RA, provocan el arresto del ciclo celular en la fase S, lo cual conlleva a una restricción de la apoptosis y, por lo tanto, promueve la tumorigénesis prostática (94).

También se ha estudiado la relación entre KDM4A y la sobreexpresión de factores de transcripción ETS. Las proteínas ETS son un grupo de factores de transcripción que, a través de su interacción con promotores y *enhancers* (potenciadores) en regiones específicas del DNA, facilitan el ensamblaje de la maquinaria transcripcional y regulan la expresión de ciertos genes (100). En el contexto del CaP, dos de los genes de estas proteínas, ERG (*V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog*) y ETV1 (*ETS variant transcription factor 1*), se consideran oncogenes debido a que son susceptibles a sufrir traslocaciones cromosómicas que provocan su sobreexpresión (101,102). Las mutaciones en ETV1, en específico, se correlacionan más con la reincidencia de CaP tras la prostatectomía radical y, por lo tanto, se asocian a tumores mucho más agresivos (103,104). La sobreexpresión de ETV1 facilita su interacción con KDM4A por lo que, cuando estos factores se unen, el complejo se asocia al DNA, específicamente a las regiones promotoras de dos genes muy importantes: YAP1 y PSMD10 (104,105). YAP1 forma parte de la vía de señalización Hippo, la cual tiene un rol crucial en la proliferación



y diferenciación celular, así como la regeneración, desarrollo y reparación del tejido (106) y PSMD10 se involucra en la estabilidad y la degradación proteica, pero también tiene relación con la regulación del ciclo celular (107). Debido a que ambos productos se asocian, de cierta forma, a la homeostasis de los tejidos, se ha traído a colación que su colaboración sinérgica promueve la tumorigénesis del CaP y que, más aún, su sobreexpresión se da de manera dependiente a la unión de ETV1/KDM4A (105).

Como dichos mecanismos, existen múltiples maneras en las que KDM4A promueve la tumorigénesis en el CaP y hay suficiente evidencia que esclarece y avala su sobreexpresión, lo cual otorga una explicación coherente a los resultados indicados en la **Figura 10**.

Por otro lado, **la Figura 11** también esquematiza la comparación de la expresión génica relativa entre TT y TN para los genes correspondientes a la **Tabla 3**. En este caso, a diferencia de la **Figura 10**, ninguno de los genes estudiados demostró una diferencia estadísticamente significativa, sin embargo, sí se puede apreciar que hay un gen cuya expresión en ambos tejidos es considerablemente baja comparada con el resto: KLK3/PSA.



KLK3 es un gen que codifica para el antígeno prostático específico (PSA), el cual, según lo indica la **Tabla 3** es una proteasa producida casi exclusivamente por las células del epitelio prostático. El aumento de este antígeno en la sangre se considera un indicativo de patologías prostáticas, ya que, en condiciones normales, la barrera epitelial de la próstata evita la filtración de PSA a la sangre (108). Según lo demuestra la **Figura 6**, KLK3 está co-localizado con RA, y su activación está mediada directamente por la unión RA/KDM4A, específicamente por la desmetilación de la región promotora de KLK3, en la posición H3K9me3 (93).

La subexpresión generalizada de KLK3 puede estar relacionada con el historial clínico de los sujetos de estudio. Las muestras de la cohorte pertenecían a pacientes con diagnóstico de CaP con un Gleason Score de 7, en cuya historia clínica se indicó un sometimiento a terapia de privación de andrógenos (ADT) fallido, el cual eventualmente derivó en una prostatectomía radical. Al ser KLK3 un gen regulado por el receptor de andrógenos, y al corresponder las muestras de tejido a pacientes con un tipo de cáncer muy avanzado, claramente independiente de la influencia androgénica, es probable que la pérdida de la dependencia a los andrógenos por parte del tumor haya resultado en una menor transcripción de genes regulados por RA, siendo uno de ellos KLK3.

El resto de los reguladores metabólicos estudiados: NR5A1, SRD5A2, CREB3, CREB3L4, CREBZF, CREBRF, ATF1 y CD2BP2, si bien, según lo indica la **Tabla 3**, tienen funciones



que varían desde la diferenciación sexual hasta la proliferación celular y han demostrado tener un rol relevante en el CaP, no revelaron alteraciones significativas en la **Figura 11**.



Conclusión

En este proyecto de investigación, a partir de RNA extraído de tejido prostático, se sintetizaron muestras de cDNA que se sometieron a un análisis de expresión génica RT-qPCR, con la intención de corroborar la hipótesis propuesta, en la cual se estableció que se esperaba una sobreexpresión identificable de uno, o más de uno, de los 19 correguladores seleccionados que, según la literatura, forman parte de la maquinaria transcripcional de RA, o bien, del mismo gen codificante de esta proteína, NR3C4. Con esta metodología, se encontró que NR3C4 no demostró variabilidad en su expresión génica en el tejido tumoral en comparación con el tejido sano, lo cual puede ser un indicativo de que los tumores estudiados en los sujetos de estudio ya eran, al momento de su prostatectomía, mayoritariamente independientes del suministro androgénico. Esta teoría, a su vez, va de la mano con la evidente subexpresión de KLK3/PSA en el tejido tumoral, dando a entender que, en los casos de estudio, la evolución de un tumor dependiente a uno independiente de andrógenos pudo haber causado que otras vías de señalización tumoral adquirieran mayor relevancia en comparación con la desregulación de RA.

Por otro lado, se encontró que KDM4A presentaba una sobreexpresión importante en las muestras de tejido tumoral; este hecho sugiere que esta desmetilasa en específico podría estar desempeñando un papel relevante en la progresión del cáncer. Aunque todavía no se han terminado de estudiar a profundidad los mecanismos a través de los cuales se



establece esta relación entre la desregulación de KDM4A y la tumorigénesis y, al menos en los casos de estudio analizados se desconocen las consecuencias bioquímicas y moleculares de su sobreexpresión, es lógico considerar que KDM4A altera, de alguna u otra forma, la estructura de la cromatina para favorecer la actividad transcripcional de las células cancerosas y, por ende, su supervivencia. Sin embargo, es importante notar que la sobreexpresión de un gen no garantiza la acumulación de su proteína en el tejido, ya que existen mecanismos postraduccionales y postranscripcionales que podrían estar regulando sus niveles funcionales; por lo tanto, estudios adicionales son necesarios para confirmar la relevancia oncológica de KDM4A.



Perspectivas

Profundizar en el uso de *KDM4A* como un posible biomarcador para el diagnóstico de CaP. Es importante tomar en consideración que, aunque PSA es el biomarcador de CaP estándar para su detección y monitoreo, en términos de sensibilidad y especificidad, tiene ciertas limitaciones (111) ya que puede elevarse significativamente ante la ocurrencia de lesiones prostáticas no cancerosas. En consecuencia, ante la gran incidencia de este tipo de cáncer en la población masculina mexicana, es ineludible la búsqueda de mejores alternativas que permitan explotar el potencial de los biomarcadores genéticos que puedan detectarse mediante técnicas de biología molecular (112), uno de los cuales podría ser *KDM4A*.



Bibliografía

1. Kumar VL, Majumder PK. Prostate gland: Structure, functions and regulation. *Int Urol Nephrol*. mayo de 1995;27(3):231-43.
2. Kirby RS. The natural history of benign prostatic hyperplasia: what have we learned in the last decade? *Urology*. noviembre de 2000;56(5):3-6.
3. McNeal JE. The zonal anatomy of the prostate. *The Prostate*. 1981;2(1):35-49.
4. Murray TBJ. The Pathogenesis of Prostate Cancer. En: *Urology Department, Frimley Park Hospital, Portsmouth Rd, Frimley, Camberley GU16 7UJ, UK, Bott SR, Lim Ng K, editores. Prostate Cancer [Internet]. Exon Publications; 2021 [citado 15 de junio de 2023]. p. 29-42. Disponible en: <https://exonpublications.com/index.php/exon/article/view/360>*
5. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Prostate Cancer Development: Therapeutic Implications. *Medicines*. 30 de julio de 2019;6(3):82.
6. Hall JE, Guyton AC. *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. 12th ed. Philadelphia, Pa: Saunders/Elsevier; 2011. 1091 p.
7. Pernar CH, Ebot EM, Wilson KM, Mucci LA. The Epidemiology of Prostate Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med*. diciembre de 2018;8(12):a030361.
8. 278. En México, cada año se detectan más de 25 mil casos de cáncer de próstata | Secretaría de Salud | Gobierno | gob.mx [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.gob.mx/salud/prensa/278-en-mexico-cada-ano-se-detectan-mas-de-25-mil-casos-de-cancer-de-prostata>
9. Vietri MT, D'Elia G, Caliendo G, Resse M, Casamassimi A, Passariello L, et al. Hereditary Prostate Cancer: Genes Related, Target Therapy and Prevention. *Int J Mol Sci*. 4 de abril de 2021;22(7):3753.
10. Wang G, Zhao D, Spring DJ, DePinho RA. Genetics and biology of prostate cancer. *Genes Dev*. 1 de septiembre de 2018;32(17-18):1105-40.
11. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*. 1 de junio de 2009;119(6):1420-8.
12. Body JJ, Casimiro S, Costa L. Targeting bone metastases in prostate cancer: improving clinical outcome. *Nat Rev Urol*. junio de 2015;12(6):340-56.
13. Bolaños P, Chacón C. Escala patológica de Gleason para el cáncer de próstata y sus modificaciones. *Rev En Línea*. 2017;34(1):237-43.
14. Zhou M. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia, PIN-like carcinoma, ductal carcinoma, and intraductal carcinoma of the prostate. *Mod Pathol*. enero de 2018;31:71-9.



15. Bostwick DG, Qian J. High-grade prostatic intraepithelial neoplasia. *Mod Pathol.* marzo de 2004;17(3):360-79.
16. Diamandis EP. Prostate-specific Antigen: Its Usefulness in Clinical Medicine. *Trends Endocrinol Metab TEM.* 1 de octubre de 1998;9(8):310-6.
17. Sardana G, Dowell B, Diamandis EP. Emerging biomarkers for the diagnosis and prognosis of prostate cancer. *Clin Chem.* diciembre de 2008;54(12):1951-60.
18. Heemers HV, Tindall DJ. Androgen Receptor (AR) Coregulators: A Diversity of Functions Converging on and Regulating the AR Transcriptional Complex. *Endocr Rev.* 1 de diciembre de 2007;28(7):778-808.
19. Naamneh Elzenaty R, Du Toit T, Flück CE. Basics of androgen synthesis and action. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* julio de 2022;36(4):101665.
20. So AI, Hurtado-Coll A, Gleave ME. Androgens and prostate cancer. *World J Urol.* 1 de noviembre de 2003;21(5):325-37.
21. Heinlein CA, Chang C. Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview. *Endocr Rev.* 1 de abril de 2002;23(2):175-200.
22. Matsumoto T, Takeyama K ichi, Sato T, Kato S. Study of Androgen Receptor Functions by Genetic Models. *J Biochem (Tokyo).* 1 de agosto de 2005;138(2):105-10.
23. Borráz-León JJ, Herrera-Pérez JJ, Cerda-Molina AL, Martínez-Mota LA. Testosterona y salud mental: una revisión. *Psiquiatr Biológica.* mayo de 2015;22(2):44-9.
24. Androgen Physiology, Pharmacology, Use and Misuse - PubMed [Internet]. [citado 13 de octubre de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25905231/>
25. Nieschlag E, Behre HM. Testosterone: action, deficiency, substitution. 4th ed. Cambridge: Cambridge university press; 2012.
26. Wilson JD. The Critical Role of Androgens in Prostate Development. *Endocrinol Metab Clin North Am.* septiembre de 2011;40(3):577-90.
27. Nassar GN, Leslie SW. Physiology, Testosterone. En: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024 [citado 13 de junio de 2024]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK526128/>
28. Litvinov IV, De Marzo AM, Isaacs JT. Is the Achilles' Heel for Prostate Cancer Therapy a Gain of Function in Androgen Receptor Signaling? *J Clin Endocrinol Metab.* julio de 2003;88(7):2972-82.
29. Plymate SR, Tenover JS, Bremner WJ. Circadian Variation in Testosterone, Sex Hormone-Binding Globulin, and Calculated Non-Sex Hormone-Binding Globulin Bound Testosterone in Healthy Young and Elderly Men. *J Androl.* 10 de septiembre de 1989;10(5):366-71.



30. Kyprianou N, Isaacs JT. Quantal relationship between prostatic dihydrotestosterone and prostatic cell content: Critical threshold concept. *The Prostate*. enero de 1987;11(1):41-50.
31. Davey RA, Grossmann M. Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin Biochem Rev*. febrero de 2016;37(1):3-15.
32. Chang C, Saltzman A, Yeh S, Young W, Keller E, Lee HJ, et al. Androgen receptor: an overview. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 1995;5(2):97-125.
33. Gelmann EP. Molecular Biology of the Androgen Receptor. *J Clin Oncol*. 1 de julio de 2002;20(13):3001-15.
34. Haelens A, Tanner T, Denayer S, Callewaert L, Claessens F. The Hinge Region Regulates DNA Binding, Nuclear Translocation, and Transactivation of the Androgen Receptor. *Cancer Res*. 1 de mayo de 2007;67(9):4514-23.
35. Takayama K, Inoue S. Transcriptional network of androgen receptor in prostate cancer progression. *Int J Urol*. agosto de 2013;20(8):756-68.
36. AR androgen receptor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 5 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/367>
37. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. enero de 2013;38(1):23-38.
38. Pal D, Ghatak S, Sen CK. Chapter 3 - Epigenetic Modification of MicroRNAs. En: Sen CK, editor. *MicroRNA in Regenerative Medicine* [Internet]. Oxford: Academic Press; 2015 [citado 5 de julio de 2024]. p. 77-109. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124055445000034>
39. DNMT1 DNA methyltransferase 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1786>
40. KDM4B lysine demethylase 4B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23030>
41. HDAC2 histone deacetylase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3066>
42. KDM4A lysine demethylase 4A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9682>
43. KDM4C lysine demethylase 4C [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23081>
44. KDM4D lysine demethylase 4D [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55693>



45. KDM3A lysine demethylase 3A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/55818>
46. KDM2B lysine demethylase 2B [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/84678>
47. KDM1A lysine demethylase 1A [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/23028>
48. KDM4E lysine demethylase 4E [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/390245>
49. NR5A1 nuclear receptor subfamily 5 group A member 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2516>
50. SRD5A2 steroid 5 alpha-reductase 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6716>
51. KLK3 kallikrein related peptidase 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/354>
52. CREB3 cAMP responsive element binding protein 3 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10488>
53. CREB3L4 cAMP responsive element binding protein 3 like 4 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/148327>
54. CREBZF CREB/ATF bZIP transcription factor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58487>
55. CREBRF CREB3 regulatory factor [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/153222>
56. ATF1 activating transcription factor 1 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/466>
57. CD2BP2 CD2 cytoplasmic tail binding protein 2 [Homo sapiens (human)] - Gene - NCBI [Internet]. [citado 4 de julio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10421>
58. El-Alfy M, Luu-The V, Huang XF, Berger L, Labrie F, Pelletier G. Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology*. marzo de 1999;140(3):1481-91.
59. Fujita K, Nonomura N. Role of Androgen Receptor in Prostate Cancer: A Review. *World J Mens Health*. septiembre de 2019;37(3):288-95.



60. Shafi AA, Yen AE, Weigel NL. Androgen receptors in hormone-dependent and castration-resistant prostate cancer. *Pharmacol Ther.* diciembre de 2013;140(3):223-38.
61. Beilin J, Ball EM, Favaloro JM, Zajac JD. Effect of the androgen receptor CAG repeat polymorphism on transcriptional activity: specificity in prostate and non-prostate cell lines. *J Mol Endocrinol.* agosto de 2000;25(1):85-96.
62. Giovannucci E, Stampfer MJ, Krithivas K, Brown M, Dahl D, Brufsky A, et al. The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de abril de 1997;94(7):3320-3.
63. Heinlein CA, Chang C. Androgen Receptor in Prostate Cancer. *Endocr Rev.* 1 de abril de 2004;25(2):276-308.
64. Feldman BJ, Feldman D. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nat Rev Cancer.* octubre de 2001;1(1):34-45.
65. Denmeade SR, Lin XS, Isaacs JT. Role of programmed (apoptotic) cell death during the progression and therapy for prostate cancer. *The Prostate.* abril de 1996;28(4):251-65.
66. Attar RM, Takimoto CH, Gottardis MM. Castration-resistant prostate cancer: locking up the molecular escape routes. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 de mayo de 2009;15(10):3251-5.
67. Devlin HL, Mudryj M. Progression of prostate cancer: Multiple pathways to androgen independence. *Cancer Lett.* 18 de febrero de 2009;274(2):177-86.
68. Oh WK, Hurwitz M, D'Amico AV, Richie JP, Kantoff PW. Hormone-refractory Prostate Cancer. En: *Holland-Frei Cancer Medicine 6th edition* [Internet]. BC Decker; 2003 [citado 28 de junio de 2024]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK13931/>
69. Amaral TMS, Macedo D, Fernandes I, Costa L. Castration-resistant prostate cancer: mechanisms, targets, and treatment. *Prostate Cancer.* 2012;2012:327253.
70. Sountoulides P, Rountos T. Adverse Effects of Androgen Deprivation Therapy for Prostate Cancer: Prevention and Management. *ISRN Urol.* 25 de julio de 2013;2013:240108.
71. Saraon P, Drabovich AP, Jarvi KA, Diamandis EP. Mechanisms of Androgen-Independent Prostate Cancer. *EJIFCC.* 28 de abril de 2014;25(1):42-54.
72. Koivisto P, Kononen J, Palmberg C, Tammela T, Hyytinen E, Isola J, et al. Androgen receptor gene amplification: a possible molecular mechanism for androgen deprivation therapy failure in prostate cancer. *Cancer Res.* 15 de enero de 1997;57(2):314-9.
73. Labrie F, Bélanger A, Dupont A, Luu-The V, Simard J, Labrie C. Science behind total androgen blockade: from gene to combination therapy. *Clin Investig Med Med Clin Exp.* diciembre de 1993;16(6):475-92.



74. Mellado B, Codony J, Ribal MJ, Visa L, Gascón P. Molecular biology of androgen-independent prostate cancer: the role of the androgen receptor pathway. Clin Transl Oncol Off Publ Fed Span Oncol Soc Natl Cancer Inst Mex. enero de 2009;11(1):5-10.
75. Montgomery RB, Mostaghel EA, Vessella R, Hess DL, Kalthorn TF, Higano CS, et al. Maintenance of intratumoral androgens in metastatic prostate cancer: a mechanism for castration-resistant tumor growth. Cancer Res. 1 de junio de 2008;68(11):4447-54.
76. Lamont KR, Tindall DJ. Androgen regulation of gene expression. Adv Cancer Res. 2010;107:137-62.
77. Senapati D, Kumari S, Heemers HV. Androgen receptor co-regulation in prostate cancer. Asian J Urol. julio de 2020;7(3):219-32.
78. Heemers HV, Regan KM, Schmidt LJ, Anderson SK, Ballman KV, Tindall DJ. Androgen modulation of coregulator expression in prostate cancer cells. Mol Endocrinol Baltim Md. abril de 2009;23(4):572-83.
79. Tan ME, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong E leong. Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. Acta Pharmacol Sin. enero de 2015;36(1):3-23.
80. Jamroze A, Chatta G, Tang DG. Androgen receptor (AR) heterogeneity in prostate cancer and therapy resistance. Cancer Lett. octubre de 2021;518:1-9.
81. Yang G, Li C, Tao F, Liu Y, Zhu M, Du Y, et al. The emerging roles of lysine-specific demethylase 4A in cancer: Implications in tumorigenesis and therapeutic opportunities. Genes Dis. marzo de 2024;11(2):645-63.
82. Labbé RM, Holowatyj A, Yang ZQ. Histone lysine demethylase (KDM) subfamily 4: structures, functions and therapeutic potential. Am J Transl Res. 1 de diciembre de 2013;6(1):1-15.
83. Baby S, Gurukkala Valapil D, Shankaraiah N. Unravelling KDM4 histone demethylase inhibitors for cancer therapy. Drug Discov Today. 1 de agosto de 2021;26(8):1841-56.
84. MedchemExpress.com [Internet]. [citado 11 de septiembre de 2024]. LSD1 Protein, Human (sf9, His-GST) from supplier medchemexpress.com. Disponible en: <https://www.medchemexpress.com/recombinant-proteins/lsd1-protein-human-sf9-his-gst.html>
85. Kang JY, Kim JY, Kim KB, Park JW, Cho H, Hahm JY, et al. KDM2B is a histone H3K79 demethylase and induces transcriptional repression via sirtuin-1-mediated chromatin silencing. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. octubre de 2018;32(10):5737-50.
86. Dandawate P, Ghosh C, Palaniyandi K, Paul S, Rawal S, Pradhan R, et al. The Histone Demethylase KDM3A, Increased in Human Pancreatic Tumors, Regulates Expression of DCLK1 and Promotes Tumorigenesis in Mice. Gastroenterology. diciembre de 2019;157(6):1646-1659.e11.
87. Cascante A, Klum S, Biswas M, Antolin-Fontes B, Barnabé-Heider F, Hermanson O. Gene-Specific Methylation Control of H3K9 and H3K36 on Neurotrophic BDNF *versus* Astroglial GFAP Genes by



- KDM4A/C Regulates Neural Stem Cell Differentiation. *J Mol Biol.* 9 de octubre de 2014;426(20):3467-77.
88. Histone demethylase KDM4A regulates adipogenic and osteogenic differentiation via epigenetic regulation of C/EBP α and canonical Wnt signaling | *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. [citado 9 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-019-03289-w>
89. Histone Demethylases KDM4A and KDM4C Regulate Differentiation of Embryonic Stem Cells to Endothelial Cells: *Stem Cell Reports* [Internet]. [citado 9 de septiembre de 2024]. Disponible en: [https://www.cell.com/stem-cell-reports/fulltext/S2213-6711\(15\)00159-9](https://www.cell.com/stem-cell-reports/fulltext/S2213-6711(15)00159-9)
90. Qi H, Jing Z, Xiaolin W, Changwu X, Xiaorong H, Jian Y, et al. Histone Demethylase JMJD2A Inhibition Attenuates Neointimal Hyperplasia in the Carotid Arteries of Balloon-Injured Diabetic Rats via Transcriptional Silencing: Inflammatory Gene Expression in Vascular Smooth Muscle Cells. *Cell Physiol Biochem.* 2015;37(2):719-34.
91. Hu Q, Chen J, Zhang J, Xu C, Yang S, Jiang H. IOX1, a JMJD2A inhibitor, suppresses the proliferation and migration of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II by regulating the expression of cell cycle-related proteins. *Int J Mol Med.* enero de 2016;37(1):189-96.
92. Zhang QJ, Chen HZ, Wang L, Liu DP, Hill JA, Liu ZP. The histone trimethyllysine demethylase JMJD2A promotes cardiac hypertrophy in response to hypertrophic stimuli in mice. *J Clin Invest.* junio de 2011;121(6):2447-56.
93. Shin S, Janknecht R. Activation of androgen receptor by histone demethylases JMJD2A and JMJD2D. *Biochem Biophys Res Commun.* 3 de agosto de 2007;359(3):742-6.
94. Zhang J, Li Q, Zhang S, Xu Q, Wang T. Lgr4 promotes prostate tumorigenesis through the Jmjd2a/AR signaling pathway. *Exp Cell Res.* 15 de noviembre de 2016;349(1):77-84.
95. S K, M M, T M, Y M, I K, R H, et al. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor-4 (LGR4, Gpr48) is essential for renal development in mice. *Nephron Exp Nephrol* [Internet]. 2006 [citado 17 de septiembre de 2024];104(2). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16785743/>
96. Hayat R, Manzoor M, Hussain A. Wnt signaling pathway: A comprehensive review. *Cell Biol Int.* junio de 2022;46(6):863-77.
97. Zhou B, Lin W, Long Y, Yang Y, Zhang H, Wu K, et al. Notch signaling pathway: architecture, disease, and therapeutics. *Signal Transduct Target Ther.* 24 de marzo de 2022;7(1):95.
98. Carballo GB, Honorato JR, de Lopes GPF, Spohr TCL de S e. A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Commun Signal CCS.* 20 de marzo de 2018;16:11.
99. Yi T, Weng J, Siwko S, Luo J, Li D, Liu M. LGR4/GPR48 Inactivation Leads to Aniridia-Genitourinary Anomalies-Mental Retardation Syndrome Defects. *J Biol Chem.* marzo de 2014;289(13):8767-80.



100. Genomic and biochemical insights into the specificity of ETS transcription factors - PubMed [Internet]. [citado 19 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21548782/>
101. Clark JP, Cooper CS. ETS gene fusions in prostate cancer. *Nat Rev Urol*. agosto de 2009;6(8):429-39.
102. Oh S, Shin S, Janknecht R. ETV1, 4 and 5: an oncogenic subfamily of ETS transcription factors. *Biochim Biophys Acta*. agosto de 2012;1826(1):1-12.
103. Shin S, Kim TD, Jin F, van Deursen JM, Dehm SM, Tindall DJ, et al. Induction of Prostatic Intraepithelial Neoplasia and Modulation of Androgen Receptor by ETS Variant 1/ETS-Related Protein 81. *Cancer Res*. 15 de octubre de 2009;69(20):8102-10.
104. Kim TD, Jin F, Shin S, Oh S, Lightfoot SA, Grande JP, et al. Histone demethylase JMJD2A drives prostate tumorigenesis through transcription factor ETV1. *J Clin Invest*. 126(2):706-20.
105. Kim TD, Oh S, Lightfoot SA, Shin S, Wren JD, Janknecht R. Upregulation of PSMD10 caused by the JMJD2A histone demethylase. *Int J Clin Exp Med*. 2016;9(6):10123-34.
106. Fu M, Hu Y, Lan T, Guan KL, Luo T, Luo M. The Hippo signalling pathway and its implications in human health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*. 8 de noviembre de 2022;7(1):1-20.
107. PSMD10 Gene - GeneCards | PSD10 Protein | PSD10 Antibody [Internet]. [citado 19 de septiembre de 2024]. Disponible en: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=PSMD10#summaries>
108. Penney KL, Schumacher FR, Kraft P, Mucci LA, Sesso HD, Ma J, et al. Association of KLK3 (PSA) genetic variants with prostate cancer risk and PSA levels. *Carcinogenesis*. junio de 2011;32(6):853-9.
109. Asada R, Kanemoto S, Kondo S, Saito A, Imaizumi K. The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *J Biochem (Tokyo)*. 1 de mayo de 2011;149(5):507-18.
110. Labrie C, Lessard J, Aicha SB, Savard MP, Pelletier M, Fournier A, et al. Androgen-regulated transcription factor AlbZIP in prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1 de febrero de 2008;108(3):237-44.
111. Rafikova G, Gilyazova I, Enikeeva K, Pavlov V, Kzhyshkowska J. Prostate Cancer: Genetics, Epigenetics and the Need for Immunological Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 14 de agosto de 2023;24(16):12797.
112. Akhtar A, Fuchs E, Mitchison T, Shaw RJ, St Johnston D, Strasser A, et al. A decade of molecular cell biology: achievements and challenges. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23 de septiembre de 2011;12(10):669-74.



Apéndice A

Carta de Consentimiento Informado

Por medio de la presente autorizo a los médicos para que obtengan un fragmento (2 gramos) del tejido tumoral prostático que me será resecado mediante cirugía, así como una muestra de sangre (aproximadamente 10 mL). Estoy en el entendido que estas muestras serán empleadas para un proyecto de investigación sobre aspectos genéticos del cáncer de próstata en donde participan el Instituto Nacional de Cancerología y el Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán.

Estoy consciente de que los resultados de este estudio no estarán directamente relacionados con el pronóstico o tratamiento de mi enfermedad y que, la información que se obtenga del estudio será con fines científicos y estrictamente confidenciales.

Nombre del paciente: _____

Firma del paciente: _____

Fecha: _____

Testigo: _____



Apéndice B

Tabla 12. Registro de las secuencias de los primers (forward y reverse) utilizadas en RT-qPCR en función del gen analizado

Gen	Forward primer	Reverse primer
	Clave: Secuencia	Clave: Secuencia
ACTB	qACT1: 5'-CCT GGA GAA GAG CTA CGA GC-3'	qACT2: 5'-CCA GGA AGG AAGGCT GGA AG-3'
NR5A1	qSF11: 5'-GGA CAA ATT CCA GCA GCT GC-3'	qSF12: 5'-GGT ACA GGT ACT CCT TGG CC-3'
DNMT1	qDNM1: 5'-TTG GGC TGA TGC AGG AGA AG-3'	qDNM2: 5'-AGG TGC AGT CGG AAT TGC TC-3'
KDM4B	qK4B1: 5' ACA TCG ACG TGG TGA TC-3'	qK4B2: 5'-TTG TAC TGC GTG AAG AGG CC-3'
HDAC2	qHDA1: 5'-CGA GCA TCA GAC AAG CGG AT-3'	qHDA2: 5'-GGG TTG CTG AGC TGT TCT GA-3'
KDM4A	qK4A1: 5'-GGA AAA GAA CTG CTG GC-3'	qK4A2: 5'-AGT CGT CAG GCT GCA TCA TC-3'
KDM4C	qK4C1: 5'-CTA AGA GTT GGC GCC ATC CA-3'	qK4C2: 5'-TTC TTC ATC ACT TGG CGC CT-3'
KDM4D	qK4D1: 5'-ACA GAG CTG GCT TGG CTA AG-3'	qK4D2: 5'-TTG AGT AAA CAC TGC CC-3'
KDM3A	qK3A1: 5'-GTG ATG GTG TCT GGA GTG CA-3'	qK3A2: 5'-TCC TAC TGT GGC TCC TGT GA-3'
KDM2B	qK2B1: 5'-GTT ACT ACG AGA CGC CCG AG-3'	qK42B2: 5'-CAT GTT GTC CAC CCA GTC CA-3'
KDM1A	qK1A1: 5'-ACG ACT CTT CTT TGC GGG AG-3'	qK1A2: 5'-AAT TCT TCC CGC TTC TCG CA-3'
KDM4E	qK4E1: 5'-TGG ATC CGC ATT CCA AAG CT-3'	qK4E2: 5'-GAC TGC AAC CTC GAC CTT GA-3'
SRD5A2	qSR521: 5'-ATC GAG GGA GGC CTT ATC CA-3'	qSR522: 5'-AGA CAC CCA AGC TAA ACC Gt-3'
NR3C4	qAR1: 5'-GGA CGA GGA TGA CTC AGC TG-3'	qAR2: 5'-GCT GTT GCT GAA GGA GTT GC-3'
KLK3	qPSA1: 5'-GCA CAG CCT GTT TCA TCC TG-3'	qPSA2: 5'-GAG TCA TCA CCT GGC CTG AG-3'
CREB3	B35: 5'-CAG TGG TTG GAC GGC TCA-3'	B33: 5'-TCT GCA CTG GGA GCC TGA-3'
CREB3L4	B3L4F: 5'-GAG AGG ATG CAG GGG GAA AC-3'	B3L4R: 5'-ACC ATA AAT GCT GGG CTC CA-3'
CREBZF	BZFF: 5'-GAG AAC CAG GAG CTG CGG-3'	BZFR: 5'-AGC GAC TCT CCT CCT GCA-3'
CREBRF	BRFF: 5'-AGC CAA AAT GCA GTC CTG A-3'	BRFR: 5'-CCG AAT CCT TCA TCA TGG TCC T-3'
ATF1	ATF1F: 5'-ATC CGA ACT ACA CCT TCA GCT AC-3'	ATF1R: 5'-TTG GGG GTC ATC TGT CTT AGT TG-3'
CD2BP2	BP2F: 5'-TCA TTG TCC CCA AGA AGA AGC T-3'	BP2R: 5-AGA GTG TTT GCC TTT AAA GCG G-3'

Nota. Todos los primers fueron proporcionadas por Roche® México.



Apéndice C

Preparación de reactivos

Acetato de sodio 1 M	Añadir 136.08 g de Acetato de sodio•3H ₂ O en 800 mL de agua bidestilada. Agitar y ajustar el pH a 7 con ácido acético diluido. Ajustar el volumen a 1 L, con agua bidestilada. Esterilizar en autoclave.
Bromuro de etidio (1 mg/mL)	Añadir 1 g de bromuro de etidio a 100 mL de agua destilada. Agitar con barra magnética hasta la disolución completa del colorante. Almacenar en una botella ámbar o cubrir su contenedor con aluminio.
DEPC (dietil pirocarbonato) 0.1%	En un matraz de 2 L, añadir 1 L de agua bidestilada, agregar 17 mL de dietil pirocarbonato en etanol al 10%. Mezclar y, con agua bidestilada, completar el volumen hasta 1700 mL. Incubar a 37 °C durante 18 horas, con agitación. Esterilizar en autoclave.
EDTA (ácido etilenodiaminatetraacético) 0.5 M	Añadir 186.1 g de EDTA•2H ₂ O disódico en 800 mL de agua bidestilada. Agitar y ajustar el pH a 8.0 con NaOH. Esterilizar en autoclave.



Etanol 75%	A 375 mL de etanol al 100%, añadir agua bidestilada (CBP) 500 mL. Mezclar y almacenar a 2 °C.
MOPS (3-(N-morfolino)propanosulfónico) 1X	En una probeta, añadir 100 mL de MOPS 10X preparado previamente. Ajustar el volumen a 1 L, con agua tratada con DEPC. Agitar.
MOPS 10X	En un vaso de precipitados de 1 L, pesar 42 g de MOPS (<i>Sigma Aldrich, minimum 99.5% titration</i>). Agregar 700 mL de agua tratada con DEPC (0.1%) y mezclar. Ajustar el pH de la solución hasta 7, con NaOH 2 N. Agregar 20 mL de acetato de sodio 1 M y 20 mL de EDTA 0.5 M. Transferir a matraz y ajustar el volumen a 1 L, con agua tratada con DEPC. Esterilizar por filtrado.
