



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MÉDICAS Y NUTRICIÓN SALVADOR  
ZUBIRÁN**

**T E S I S**

**CAMBIOS EN EL NIVEL DE METILACIÓN DE LOS PROMOTORES DE *GSTP1*  
Y *RASSF1A* POSTERIORES AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON  
HIPERPLASIA BENIGNA DE LA PRÓSTATA**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE ESPECIALISTA EN:  
GENÉTICA MÉDICA**

**PRESENTA :  
LETICIA SPINOSO QUIROZ**

**TUTOR:  
DR. OSVALDO M. MUTCHINICK BARINGOLTZ  
FACULTAD DE MEDICINA**

**CO-TUTORA:  
M. en C. BEATRIZ E SANCHEZ HERNANDEZ**

**MEXICO D.F JUNIO DE 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Osvaldo Mutchinick B. por haber vivido todo un proceso con él y llevarme sus enseñanzas en el ámbito genético y personal. ¡Qué gran forma la suya de impulsar a éste Departamento para ser el mejor!

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”. Al que nunca dejaré de pertenecer, al menos de corazón. Siempre he creído que su secreto para graduar a los mejores especialistas, es no preparar personas para ser buenos médicos, sino preparar buenos médicos para ser excelentes personas. ¡Gracias!

A la Maestra en Ciencias Beatriz Sánchez por la infinita paciencia, ayuda y amistad. No hay forma de haber trabajado esta tesis sin tí Bety. ¡Me has convertido en especialista!

Al la Dra. Jazmín Arteaga y el Dr. Juan José Morales por ser mis profesores, a los que sé, puedo recurrir por siempre. Este proceso ha sido mejor por saberme siempre apoyada por ustedes.

A mis profesores y amigos Renata, Vicky, Cristy, María, Yev, Leo: ¡los aprecio tanto! Hacen de este lugar, un mundo (genético) mejor.

Y lo más importante, MI FAMILIA: No hay palabras en que pueda expresar lo afortunada que soy por tenerlos.. porque son las mejores personas y equipo que pude pedir. Todo lo que hago es pensando en ustedes, así que esto es suyo! LOS AMO.

<b>ÍNDICE</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	4
<b>II. ANTECEDENTES</b>	6
II.1 Anatomía y fisiología de la próstata	6
II.2 Anomalías de la glándula prostática	9
II.2.1 Hiperplasia benigna de la próstata	9
II.2.2 Cáncer de próstata	11
II.3 Epidemiología de las principales enfermedades de la próstata	13
II.3.1 Estadísticas	13
II.4 Factores de riesgo para la hiperplasia benigna de la próstata y cáncer de próstata	18
II.4.1 Factores de riesgo para el desarrollo de HBP	18
II.4.2 Factores de riesgo para el desarrollo de CaP	21
II.5 Alteraciones moleculares relacionadas al cáncer de próstata	24
II.5.1 Factores genéticos	24
II.5.2 Factores epigenéticos	26
II.5.2.1 Metilación del ADN	26
II.5.2.2 Hipermetilación del ADN	27
II.5.2.3 Vías alteradas por metilación del promotor en cáncer de próstata	31
II.5.2.4 Hipometilación del ADN	38
II.5.2.5 Modificación de histonas	41
II.6 Biomarcadores del cáncer prostático	44
II.6.1 Marcadores protéicos: APE y Fosfatasa ácida	44
II.6.2 Marcadores de ADN: cambios epigenéticos	46
II.6.3 Marcadores de mRNA: PCA3	47
II.7 Moduladores epigenéticos para tratamiento de cáncer prostático	49
II.7.1 Reversión de la hipermetilación por inhibidores de DNA metiltransferasa	49
II.8 Diagnóstico de enfermedades prostáticas	50
II.9 Tamizaje y detección precoz	51
<b>III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	52
<b>IV. HIPOTESIS</b>	53
<b>V. JUSTIFICACIÓN</b>	53
<b>VI. OBJETIVOS</b>	55
<b>VII. MATERIAL Y METODOS</b>	56
VII.1 Diseño del estudio	56
VII.1.1 Descripción del estudio	56
VII.2 Población de estudio	57
VII.3 Extracción de ADN de sedimento urinario	57

VII.4 Conversión del ADN con bisulfito de sodio	58
VII.5 PCR cuantitativo metilación-específica	58
VII.6 Análisis estadístico	59
<b>VIII. RESULTADOS</b>	60
VIII.1 Características del grupo de estudio.	60
VIII.2 Niveles de Antígeno prostático específico durante el seguimiento	62
VIII.3 Porcentaje de metilación de los promotores de <i>GSTP1</i> y <i>RASSF1A</i>	62
<b>IX. DISCUSION</b>	69
<b>X. CONCLUSIONES</b>	72
<b>XI. ANEXOS</b>	73
ANEXO 1. Sistema TNM de clasificación de Cáncer de Próstata y calificación histo-pronóstica de Gleason	73
ANEXO 2. Hoja de Informe al Paciente	75
ANEXO 3. Carta de consentimiento informado	76
<b>XII.- BIBLIOGRAFIA</b>	77

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>PÁGINA</b>
<b>Tabla 1.</b> Lista de genes afectados por aberraciones epigenéticas en cáncer de próstata	<b>29</b>
<b>Tabla 2.</b> Genes hipermetilados en cáncer prostático	<b>29</b>
<b>Tabla 3.</b> Sensibilidad y especificidad del estudio de la HMP de <i>GSTP1</i> y <i>RASSF1A</i> para la detección del cáncer de próstata	<b>38</b>
<b>Tabla 4.</b> Cambios en la cromatina de algunos genes implicados en cáncr prostático.	<b>43</b>
<b>Tabla 5.</b> Concentración de APE (ng/ml) y Riesgo para CaP	<b>45</b>
<b>Tabla 6.</b> Antecedentes clínicos de los pacientes estudiados	<b>60</b>
<b>Tabla 7.</b> Antecedentes heredofamiliares relacionados a diversas patologías	<b>61</b>
<b>Tabla 8.</b> Niveles de antígeno prostático específico	<b>62</b>
<b>Tabla 9.</b> Niveles de metilación el promotor y de antígeno prostático específico en pacientes con HBP durante el seguimiento	<b>65</b>
<b>Tabla 10.</b> Análisis de regresión logística multivariado entre el %MP de <i>GSTP1</i> en ADN de SUR y otras variables confusoras	<b>67</b>
<b>Tabla 11.</b> Análisis de regresión logística y multivariado entre el %MP de <i>RASSSF1</i> en ADN de sedimento urinario y otras variables confusoras	<b>67</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
<b>Figura 1.</b> Anatomía del aparato reproductor masculino	6
<b>Figura 2.</b> Zonas de la glándula prostática	7
<b>Figura 3.</b> Corte frontal de la próstata	8
<b>Figura 4.</b> El Sistema de Gleason	12
<b>Figura 5.</b> Tasas de mortalidad por CaP ajustadas por edad en varios países en el año 2000	15
<b>Figura 6.</b> Tasas de mortalidad por cáncer de próstata en México	16
<b>Figura 7.</b> Distribución de casos de cáncer de próstata por institución	17
<b>Figura 8.</b> Metilación del ADN en la carcinogénesis	28
<b>Figura 9.</b> Prevalencia de genes afectados por hipermetilación en cáncer prostático	30
<b>Figura 10.</b> Factores de progresión y bloqueo del ciclo celular	34
<b>Figura 11.</b> Una hipótesis explicando la hipermetilación de <i>GSTP1</i> en cáncer prostático	36
<b>Figura 12.</b> Estructura de la cromatina activa e inactiva del promotor	41
<b>Figura 13A.</b> Curva de desnaturalización del producto amplificado de <i>GSTP1</i> .	64
<b>Figura 13B.</b> Curva de desnaturalización del producto amplificado de <i>RASSF1A</i> . Estructura de la cromatina activa e inactiva del promotor	64
<b>Figura 13C.</b> Curva de desnaturalización del producto amplificado de <i>ACTB</i> .	64

## **ABREVIATURAS:**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico  
**APE:** Antígeno Prostático Específico  
**AR:** Receptor de Andrógenos  
**ARNm:** Mensajero del ácido ribonucleico  
**BAD:** Biopsia con Aguja Delgada  
**CaP:** Cáncer de Próstata  
**CDKs:** Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas  
**DM2:** Diabetes mellitus tipo 2  
**DNMTs:** Metiltransferasas de ADN  
**EPOC:** Enfermedad pulmonar obstructiva crónica  
**EVC:** Evento vascular cerebral  
**FA:** Fosfatasa ácida  
**GST:** Genes supresores tumorales  
**GSTP1:** Glutacionina S-transferasa 1  
**GTP:** Guanosin-tri-fosfato  
**HAS:** Hipertensión arterial sistémica  
**HATs:** Enzima acetilasa de histonas  
**HBP:** Hiperplasia Benigna de la Próstata  
**HDACs:** Deacetilasas de histonas  
**HMGG:** Hipermetilación Global del Genoma  
**HMP:** Hipermetilación de promotores  
**IAM:** Infarto agudo al miocardio  
**INCMNSZ:** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México, DF.  
**MTH:** Metiltransferasa de histonas  
**P:** Próstata  
**PCA3:** Antígeno Prostático 3  
**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa  
**RASSF1A:** Proteína 1 de unión a Rass  
**qPCR:** PCR cuantitativo en tiempo real  
**SUR:** Sedimento urinario  
**TNM:** Tumor, Nódulo, Metástasis  
**TP:** Tejido prostático  
**TR:** Tacto Rectal  
**TRF:** Fluorescencia resuelta en el tiempo  
**%MP:** Porcentaje de Metilación del Promotor

## I. INTRODUCCIÓN

De todos los tipos de cáncer que afectan a la población masculina, el de próstata (CaP) ocupa el segundo lugar a nivel mundial (WHO 2012). En México, el CaP es la causa principal de cáncer en hombres con una tasa de mortalidad de 9.5/100,000 hombres. Al año se detectan alrededor de 6,500 nuevos casos de CaP y las tendencias de mortalidad en general por este cáncer se han incrementado (Sánchez-Barriga, 2013).

La determinación de niveles séricos de antígeno prostático específico (APE) es ampliamente usada en la práctica clínica como un método para identificar pacientes en riesgo o con CP, en algunos pacientes de nuestra población este biomarcador a niveles  $\geq 4$  ng/ml tiene una sensibilidad cercana al 94% (IC<sub>95%</sub>90.6-97.4) y una especificidad tan solo del 6% (IC<sub>95%</sub>2.5-9.2) (Sánchez B, 2014). Un estudio de tamizaje para diagnóstico de CaP en una muestra de la población masculina mexicana realizado en 2008 por el Centro Nacional de Excelencia Tecnológica en Salud de la SSA, hace referencia que el tamiz para CaP mediante el uso de APE y tacto rectal, dada su baja especificidad no contribuyen de forma substancial en una disminución de la mortalidad por CaP en nuestro país.

Hasta la fecha no se cuenta con marcadores diagnósticos y pronósticos precisos para el CaP. Por los antecedentes epidemiológicos de esta enfermedad en nuestro país es necesario contar con marcadores moleculares que en la

práctica clínica contribuyan junto con otros factores del individuo a identificar grupos de la población mexicana con un riesgo incrementado para desarrollar CaP y que a su vez permitan que esta neoplasia sea su detección una etapa temprana para ofrecer al paciente un tratamiento eficaz que contribuya a su total curación así como una mejor calidad de vida.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Anatomía y fisiología normal de la próstata

La próstata tiene forma cónica con la base hacia la vejiga y arriba y el vértice hacia adelante y abajo. Se sitúa por debajo de la vejiga, por encima del suelo perineal, por delante del recto y por detrás de la sínfisis del pubis. En el sector postero-superior de la base se ubican las vesículas seminales (Fig. 1, 3). Pesa normalmente 20 gramos (Juan & Tejerizo, 2002).

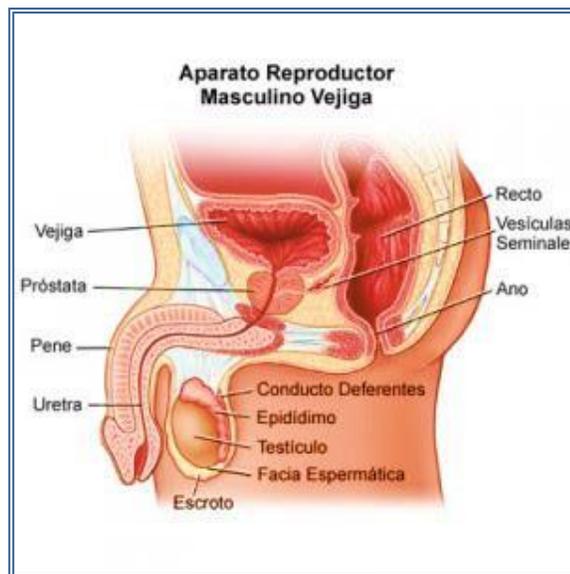


Fig 1: Anatomía del aparato reproductor masculino.

Se toma a la uretra para dividir a la glándula prostática en una porción posterior o glandular y otra anterior o fibromuscular. La uretra prostática se angula en el sector medio dividiéndose en proximal y distal. Así, la anatomía zonal queda representada de la siguiente manera (Juan & Tejerizo, 2002):

a) Porción posterior o glandular (Fig. 2)

\*Zona periférica (ZP): Corresponde al tejido que rodea a la uretra distal y forma parte de los sectores posteriores, laterales. Constituye el 70% de la glándula y es asiento de los carcinomas (70%). No desarrolla hiperplasia (Juan & Tejerizo, 2002)

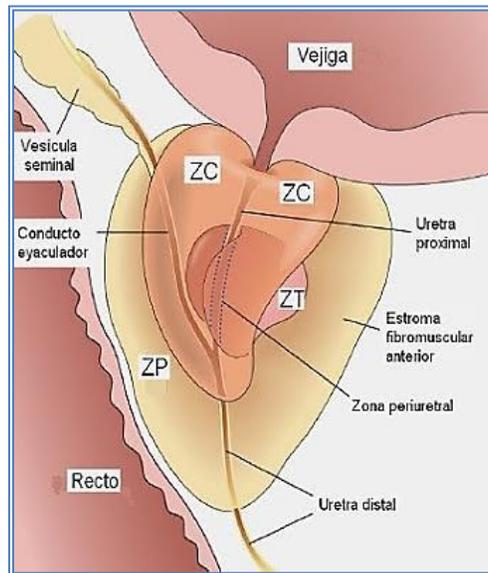


Fig 2.- Zonas de la glándula prostática

\*Zona central (ZC): Constituye el 25% del tejido glandular y forma la base de la próstata relacionándose con la uretra proximal. Es asiento del 10% de los carcinomas y no desarrolla hiperplasia prostática benigna (Juan & Tejerizo, 2002).

\*Zona transicional (ZT): Constituye 5% del tejido glandular y corresponde al tejido glandular ubicado a cada lado de la uretra proximal y esfínter periuretral. Es la zona donde se desarrolla la hiperplasia prostática benigna y el 20% de los carcinomas (Juan & Tejerizo, 2002).

\*Glándulas periuretrales: Constituyen el 1% del tejido glandular y se ubica dentro del músculo que forma el esfínter periuretral. Es asiento hiperplasia prostática benigna (Juan & Tejerizo, 2002).

b) Porción anterior o fibromuscular (Fig.2 )

\*Zona fibromuscular anterior: Está constituida por músculo y tejido fibroso. Su máximo grosor es 1 cm y se afina lateralmente formando la cápsula prostática fibrosa que cubre a la glándula en los sectores laterales y posterior (Juan & Tejerizo, 2002).

También existe una clasificación más sencilla que considera:

- a) Estroma fibromuscular anterior.
- b) Glándula externa: corresponde a la zona central y periférica, siendo el 95% del volumen de la glándula.
- c) Glándula interna: corresponde a la zona de transición y glándulas periuretrales. Es el 5% del volumen glandular (Juan & Tejerizo, 2002).

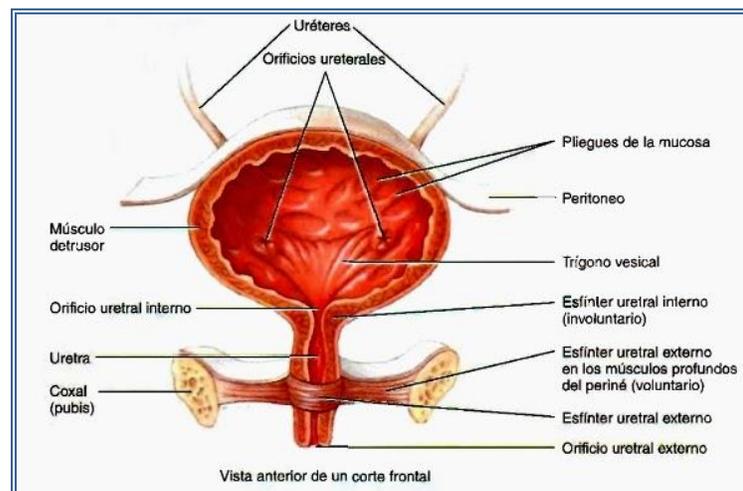


Fig. 3: Corte frontal de la próstata.

La próstata secreta varias proteínas: fosfatasa ácida, seminina, activador de plasminógeno y antígeno prostático específico (Balistreri, Candore, Lio, & Carruba, 2014).

## **II.2 Anomalías de la glándula prostática**

### *II.2.1 Hiperplasia benigna de la próstata*

La hiperplasia prostática benigna (HPB) se caracteriza histológicamente por el crecimiento progresivo de la glándula prostática debido a un proceso proliferativo no maligno que incluye tanto elementos epiteliales como estromales. (Briganti et al., 2009).

Se origina exclusivamente en la glándula interna, en un 95% en la zona transicional y en un 5% en las glándulas periuretrales. La HPB que afecta la zona transicional es en general nodular e incrementa el tamaño de los lóbulos laterales, tiene predominio glandular y se encuentra en las zonas laterales de la uretra creciendo en dirección al verum. Si la hipertrofia prostática afecta a las glándulas periuretrales, incrementa el tamaño del lóbulo medio protruyendo hacia la luz vesical (Briganti et al., 2009).

Aunque es poco común antes de los 40 años, alrededor del 50% de los hombres desarrollan síntomas relacionados a los 50 años de edad. La incidencia de la HPB aumenta 10% por década y llega al 80% a los 80 años de edad (Briganti et al., 2009).

No se ha descrito una correlación directa entre el grado de incremento del tamaño prostático y la presencia o severidad de los síntomas (Frenk Mora Julio, Tapia Conyer Roberto, Uribe Esquivel Misael, 2001).

Las complicaciones severas de la HPB incluyen: retención urinaria, hidronefrosis, infecciones recurrentes urinarias, cálculos de vejiga, hematuria recurrente y como estadio final la insuficiencia urinaria (Crawford, 2003).

El aparato urinario superior debe estudiarse en aquellos pacientes que serán sometidos a cirugía por HPB y presentan hematuria, evidencia de insuficiencia renal o antecedentes de infecciones urinarias, litiasis o enfermedades congénitas renales (Briganti et al., 2009).

Hay varios factores que influyen en el desarrollo de la hipertrofia prostática, entre ellos, la testosterona que estimula el crecimiento prostático. Probablemente la HPB se origina por cambios en los niveles séricos de testosterona que se abaten por una disminución del estímulo sobre las células de Leydig y por el aumento en la conversión de testosterona en andrógenos en los tejidos periféricos. Histológicamente, la HPB puede apreciarse con la aparición de nódulos microscópicos en el tejido periuretral en la zona de transición de la glándula prostática. Durante el envejecimiento y en presencia de andrógenos, el tejido hiperplásico avanza aun estadio microscópico que se manifiesta por una glándula agrandada a la palpación (Crawford, 2003).

Al efectuarse una placa simple, ocasionalmente pueden identificarse calcificaciones en proyección de la sínfisis pubiana que corresponden a calcificaciones en una HPB (Juan & Tejerizo, 2002).

Se observa agrandamiento de la glándula interna, que se diferencia con claridad de la glándula externa la cual se observa comprimida y desplazada.

Ecosonográficamente la hiperplasia puede manifestarse como:

- Múltiples nódulos
- Adenoma (un nódulo)
- Un agrandamiento difuso con calcificaciones y áreas quísticas.

### *II.2.2 Cáncer de próstata*

La mayoría de los cánceres de próstata (95%) son adenocarcinomas con un patrón de crecimiento lento y buena respuesta al tratamiento. Suele ser multifocal, originándose el 80% en la glándula externa (70% en la zona periférica y 10% en la zona central) y 20% en la glándula interna (zona transicional). Cuando el carcinoma se origina en la zona periférica se extiende a la grasa periprostática invadiendo la cápsula y hacia la glándula interna a través de la cápsula quirúrgica. Hay sectores débiles, sin cápsulas, por donde el tumor se expande con facilidad, estas regiones son: el ápex, el espacio graso invaginado, las vesículas seminales y los paquetes neurovasculares (Balistreri et al., 2014).

El CaP se puede identificar tanto por el grado como por el estadio. El grado describe qué tanto se asemeja el tejido tumoral al tejido glandular normal.

Basándose en la apariencia microscópica, se puede describir como de bajo, medio o alto grado. El método para establecer el grado, es el sistema o Score de Gleason, que usa puntuaciones del 2 al 10. Mientras más alta puntuación, mayor el grado del tumor. El sistema de Gleason identifica 5 patrones de crecimiento del adenocarcinoma prostático invasivo, representado en una escala progresivamente decreciente de diferenciación glandular (Fig. 4). El score de Gleason es la suma de la calificación dada por el patólogo a los dos patrones arquitecturales más predominantes del cáncer prostático en estudio, puede ir de 2 a 10 con todas las combinaciones posibles, que tendrán también sus implicaciones en el pronóstico del caso clínico (Bigelli, 2011).

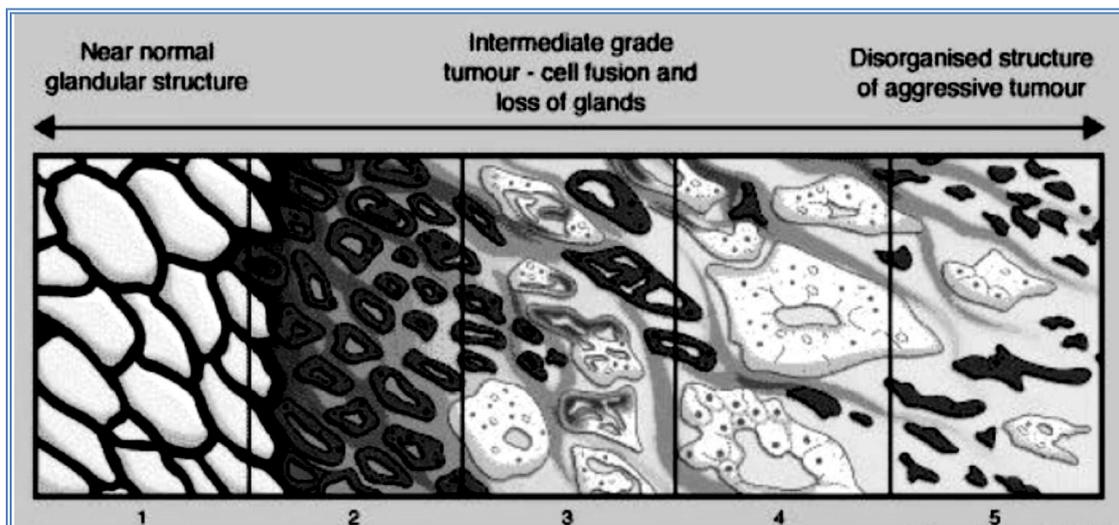


Fig. 4: El sistema de Gleason. Este sistema identifica 5 patrones de crecimiento del adenocarcinoma prostático invasivo, representado en una escala progresivamente decreciente de diferenciación celular.

La estadificación clínica de los tumores prostáticos se basa en la clasificación de Jesset y Witmore y/o clasificación TNM, con la última modificación

realizada en 2009 y vigente desde el 1 de enero de 2010 (Vallejos et al., 2013). (Anexo I).

De acuerdo con las características del grado tumoral y el estadio clínico el CaP se puede clasificar en:

a) Bajo riesgo: de buen pronóstico, aquellos pacientes con APE sérico de 10 ng/ml o menos, un Gleason de 6 o menos y estadio clínico T1c o T2a sin recaída bioquímica a 10 años de un 83%.

b) Riesgo intermedio: pacientes con APE de 10 a 20 mg/ml, Gleason de 7 con estadio clínico T2b, sin recaída bioquímica a 10 años de un 46%.

c) Riesgo elevado: pacientes con APE de más de 20 ng/ml, Gleason de 8 o más y un estadio clínico de T2c, sin recaída bioquímica a 10 años de 29% (Bigelli, 2011).

## **II.3 Epidemiología del las principales enfermedades de la próstata**

### *II.3.1 Estadísticas*

No existen actualmente datos fiables acerca de la HBP como causa primaria de muerte en la mayor parte de los países desarrollados. La mortalidad adscrita a la HBP varía de una región a otra y de un país a otro. Ekman (1989) intentó utilizar los índices de mortalidad por HBP de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 50 países, presentando los índices como muertes por cada 100.000 varones de 45 o más años. Los porcentajes presentados varían desde el 29.7 por cada 100.000 hombres de más de 45 años en Alemania del Este (1984) a 0.5 por cada

100.000 en Singapur (1985). El índice presentado para los EE.UU es de 1.8 por cada 100.000 varones (1983). Sin embargo, la falta de uniformidad en los criterios utilizados para atribuir la muerte a la HBP limitan la utilidad de estos datos (Ekman, 1989).

A nivel mundial el CaP es la segunda causa de muerte en hombres después del cáncer de pulmón, y en general el quinto cáncer más común. En el año 2008 se presentaron en el mundo 899,102 casos con una tasa de incidencia ajustada por edad de 27.9/100,000 hombres (Carter, Piantadosi, & Isaacs, 1990).

Tres cuartas partes de los casos registrados por CaP ocurren en países desarrollados (644,000 casos). En EE.UU., el CaP es la causa principal de cáncer en el hombre después del cáncer de piel. La Sociedad Americana del Cáncer estimó que, en 2013, 238,590 hombres serán diagnosticados con CaP y 29,720 morirán por esta causa (Brawley et al., 2012). Las tasas mayores de mortalidad por CaP se observan en Australia/Nueva Zelanda (104.2/100,000) (Siegel et al, 2013). Las tasas de incidencia más baja de CP se observan en Asia central y sur con una tasa estimada de 4.1/100,000 (Ferlay et al., 2010). En el periodo 1993-2003 se observó que la morbilidad por CaP en Latinoamérica tiene una tendencia hacia el incremento. Mientras que las tasas de mortalidad han variado en esta región, se ha observado un incremento de la mortalidad en Brasil, Colombia y Ecuador y un decremento en Argentina, Costa Rica y Chile. Estas diferencias son debidas a susceptibilidad genética, exposición a diferentes factores de riesgo o diferencias en la calidad de los sistemas de salud e incluso en los registros de cáncer (Center et al., 2012)

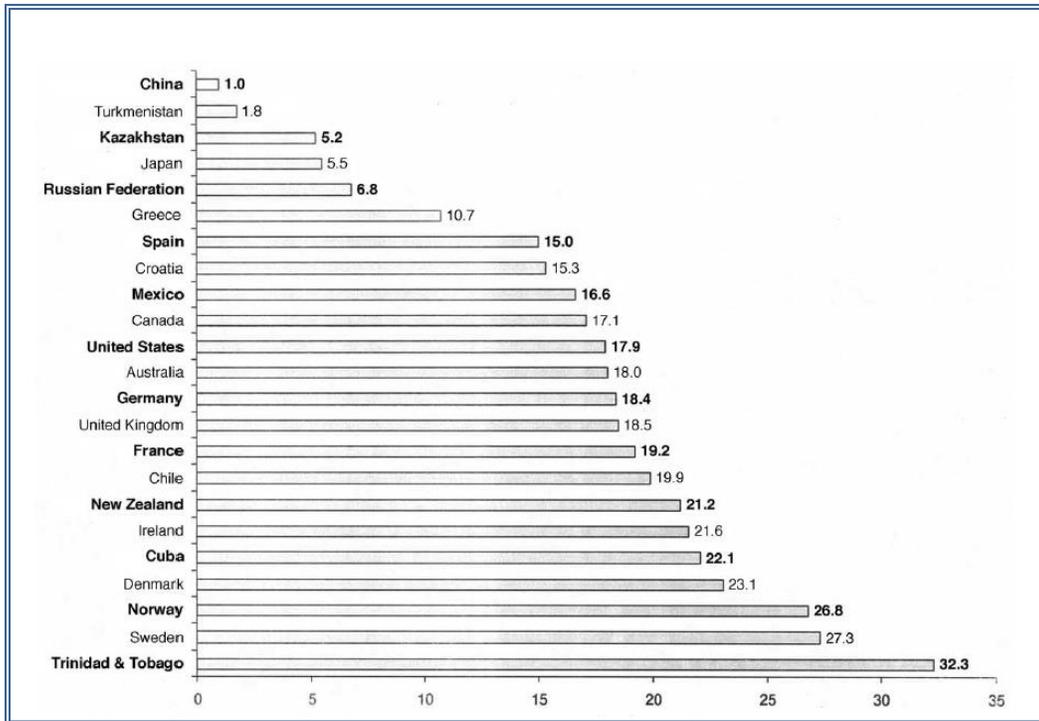


Fig. 5: Tasas de mortalidad por CaP ajustadas por edad en varios países en el año 2000. Tasa por 100,000 hombres. (Adaptada de American Cancer Society).

Se espera que el número de hombres mayores de 65 años aumente 4 veces a nivel mundial entre los años 2000 y 2050, lo que se traduciría en aumento en el número de pacientes diagnosticados con CaP que requerirán tratamiento para su enfermedad (Crawford, 2003).

La mortalidad tiene un comportamiento similar, con tasas más altas reportadas en el Caribe y Escandinavia, y las más bajas en China, Japón y países de la ex Unión Soviética (Fig. 5) (Crawford, 2003).

En México, en 1999, las neoplasias malignas ocuparon el segundo lugar en la tabla de mortalidad general.

El CaP fue la segunda neoplasia más frecuente, en el hombre en edad post reproductiva (Fig. 6), con 3,766 defunciones y tasa de 71.7 por 100 mil en el grupo de 65 años y más (Frenk Mora Julio, Tapia Conyer Roberto, Uribe Esquivel Misael, 2001).

Durante el trienio de 1993-1995, el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas lo ubicó en el cuarto lugar respecto a la localización con 9,088 casos y una media anual de 3,029, correspondiéndole el 4.9% del total de neoplasias registradas. El tipo histológico más frecuentemente reportado es el adenocarcinoma. Las entidades federativas con mayor número de casos son: Distrito Federal, Jalisco y Veracruz (Frenk Mora Julio, Tapia Conyer Roberto, Uribe Esquivel Misael, 2001).

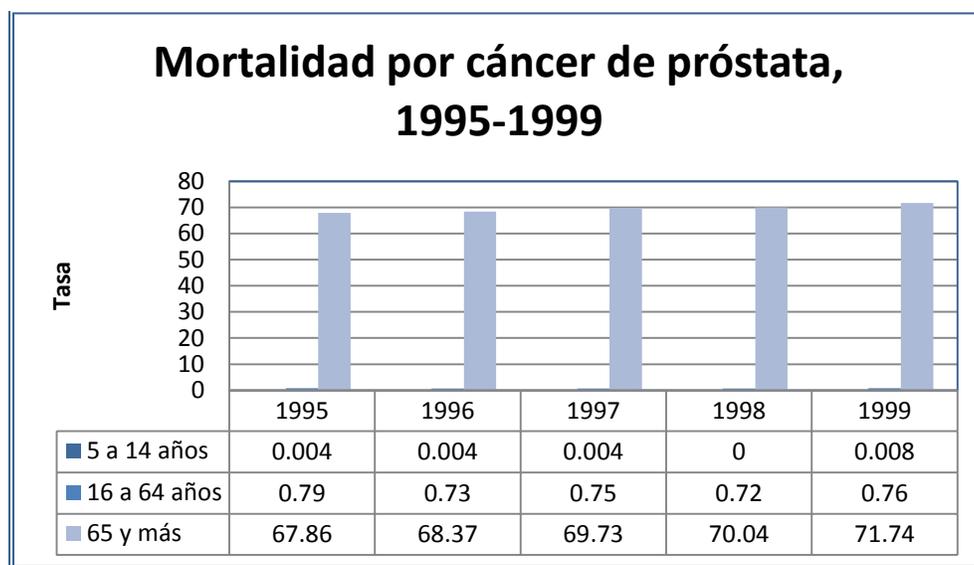


Fig. 6: Mortalidad por cáncer de próstata en México.

\*Tasa por 100,000 habitantes.

Fuente: Elaborado por el Centro nacional de Vigilancia Epidemiológica/SSA.  
Anuario de mortalidad, D.G.E.I./INEGI/CONAPO

Cifras más recientes demuestran que el CaP es un problema de salud publica en Mexico, ya que actualmente es la causa principal de cáncer en hombres

(tasa de mortalidad de 9.5/100,000 hombres en 2008) y en segundo lugar se encuentra el tumor maligno de traquea, bronquios y pulmon (tasa de mortalidad de 8.4/100,000 hombres en 2008); al año se detectan 6,500 nuevos casos de CaP, y las tendencias de mortalidad en general por este cáncer se han incrementado. En los años 1970-1974 se identificó una tasa de mortalidad por CaP de 5.5/100,000 habitantes. En el periodo 2000-2010 murieron en México 51,389 individuos por CaP, en el año 2000 se observaron 3,885 muertes por este padecimiento y en el año 2010, 5,411 (Fig. 6). La tasa cruda de mortalidad durante el periodo de estudio se incrementó de 7.8 a 9.8/100,000 hombres (Sánchez-Barriga 2013)

De acuerdo con el Registro Histopatológico de Neoplasias en México (Fig 7), la notificación por Institución, el sector público reportó más del 70% de los casos, y el sector privado, el 22.6% (Frenk Mora Julio, Tapia Conyer Roberto, Uribe Esquivel Misael, 2001).

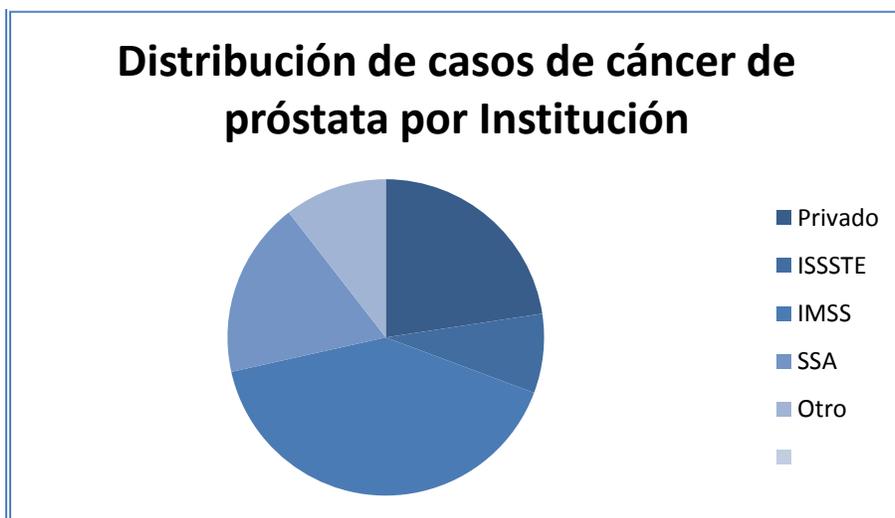


Fig. 7: Distribución de casos de cáncer de próstata por Institución.

Fuente: Registro histopatológico en México/DGE. Elaborado por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica/SSA.

## **II.4 Factores de riesgo para hiperplasia benigna de la próstata y cáncer de próstata**

### *II.4.1 Factores de riesgo para el desarrollo de HBP*

Diferentes grupos de trabajo han propuesto diversas hipótesis para explicar el crecimiento patológico de la próstata. Este aumento del volumen prostático es causado por hiperplasia celular y apoptosis reducida. Se ha demostrado la expresión de péptidos regulatorios del crecimiento prostático (Marcelli et al., 1999). La acción paracrina o autocrina de los factores de crecimiento, que está modulada por hormonas sexuales, también está involucrada en el desarrollo de la HBP (Ball et al, 2003). Además, han sido identificados algunos sistemas de señalización intraprostáticos importantes en la regulación de la proliferación celular y la producción de la matriz extracelular en el estroma prostático. Un fino balance entre los factores promotores de crecimiento y los inhibidores del mismo, mantienen el crecimiento normal de la glándula durante el desarrollo y la quiescencia en la adultez. Cuando este balance es alterado, se manifiesta la patología. En su origen se encuentran implicados diferentes factores que pueden ser causantes de HBP, pero que aisladamente no tienen la suficiente entidad para generar la patología (Eaton 2003). En la génesis de la HBP se han descrito diversos factores que en algunas ocasiones no se puede demostrar su participación activa pero sí se puede afirmar que son necesarios para su desarrollo. Muchos autores sugieren que una edad superior a 50 años y la presencia de hormonas androgénicas producidas por los testículos juegan un papel importante en la génesis de HBP, así como la existencia en la célula prostática de 5- $\alpha$ -reductasa, enzima que transforma la

testosterona en dihidrotestosterona (DHT), metabolito activo (Eaton 2003). La DHT es imprescindible para el desarrollo de la próstata. Durante el período embrionario, sin DHT no se desarrolla la glándula, aunque los niveles de testosterona estén dentro de la normalidad y exista un desarrollo conservado de las características masculinas y de la espermatogénesis, como ocurre en el pseudohermafroditismo primario, en el que existe una ausencia de 5- $\alpha$ -reductasa y los individuos presentan una próstata vestigial, conservando el resto de las características masculinas y no afectándose la reproducción. Igualmente, en personas anorquictomizados, antes de la edad adulta se observa una involución en su próstata, con ausencia de patología a este nivel. La estimulación androgénica es vital en la generación de hiperplasia del tejido glandular y estromal de la próstata. Existen evidencias de que no se desarrolla HBP en individuos castrados antes de la pubertad y es raro que se desarrolle en aquellos castrados después de la pubertad. En el tejido prostático se lleva a cabo la conversión de la testosterona sintetizada en las gónadas a dihidrotestosterona, mediante la acción de la 5- $\alpha$ -reductasa, enzima responsable en buena medida del crecimiento fisiológico y patológico de la glándula. Sin embargo, ha podido establecerse la influencia de otros compuestos tales como factores de crecimiento y hormonas sexuales (Marcelli et al., 1999).

La teoría de la “célula primordial” explica la HBP como una alteración del balance del crecimiento de las células nuevas y la maduración y muerte de las más viejas. Aunque la HBP histológicamente puede aparecer en varones de 40 años, clínicamente se suele manifestar a partir de los 60 años. Por esto

algunos autores consideran la edad como un factor importante en la génesis de la enfermedad. Con el envejecimiento se produce una serie de cambios morfológicos a nivel de la zona cervical de la vejiga en su unión con la uretra y la próstata, pudiendo comprimir ésta a partir del lóbulo medio, elevando la zona cervical, variando su eje y favoreciendo la obstrucción (Ball, 2003).

Además de los factores hormonales y la edad, en la génesis de HBP se han descrito otros factores relacionados con su etiología (Eaton 2003).

a) Genéticos: La HBP aparece con más frecuencia en familiares de primer orden. Lo que se evidencia sobre todo en próstatas de gran tamaño que requieren un tratamiento quirúrgico y que aparecen en edades relativamente jóvenes (antes de los 60 años).

b) Dietéticos. El consumo de vegetales ricos en carotenos y fitoestrógenos podría tener una acción protectora, como ocurre en los países asiáticos cuya prevalencia sintomática es menor sin diferencia en la histológica. También se sugiere que podría estar implicado el bajo nivel socioeconómico.

c) Raza: La HBP se observa más en negros americanos que en blancos americanos. Igualmente, es más prevalente en judíos y menos en los pueblos orientales.

d) Hiperinsulinismo: Diferentes autores han relacionado la HBP con la obesidad, hipertensión arterial y diabetes, por separado. El investigador sueco Hammarsten propuso que en situaciones metabólicas asociadas al hiperinsulinismo se evidencia mayor agrandamiento de la glándula prostática, no sólo en la zona de transición, sino que existe un crecimiento significativo en toda la

glándula (Hammarsten y Hogsted, 2002). Pacientes afectados con síndrome metabólico (obesidad, hiperglicemia, hipertrigliceridemia, hiperuricemia, hipertensión arterial), presentan una mayor estimulación del simpático, lo que produce un aumento en la producción de los receptores adrenérgicos de la próstata, aumentando su crecimiento. Esta teoría puede tener una cierta explicación si se analiza la acción de los inhibidores alfa adrenérgicos en el tratamiento de la HBP y su acción beneficiosa en pacientes diabéticos, ya que disminuyen la resistencia a la insulina y mejoran su perfil lipídico. La insulina produce un efecto estimulador del hipotálamo a nivel del núcleo ventromedial que regula el sistema nervioso simpático, aumentando las catecolaminas, las cuales se sugiere pueden ejercer un efecto trófico retardando el proceso apoptótico. Por ello, se sugiere como estrategia el control de estos factores de riesgo y medidas encaminadas a disminuir la hiperinsulinemia.

#### *II.4.2 Factores de riesgo para el desarrollo de CaP*

a) Edad: El CaP está asociado con el envejecimiento. En Estados Unidos más del 70% de todos los casos son diagnosticados en mayores de 65 años de edad. Es relativamente raro que se diagnostique en hombres con menos de 50 años, pero después de ésta edad, la incidencia y mortalidad aumenta exponencialmente (Balistreri et al., 2014).

La probabilidad de desarrollar CaP aumenta de 0.005% entre individuos menores de 39 años, a 2.2% (1 en 45) para aquéllos entre 40 a 59 años, y 13.7%

(1 en 7) en hombres de 60 a 79 años. El riesgo acumulado a lo largo de la vida para desarrollar cáncer es de 16.7% (1 en 6) (Briganti et al., 2009).

Los estudios de necropsia sugieren que la probabilidad de desarrollar evidencia histológica de cáncer prostático es aún mayor. Carter y su grupo (Carter et al., 1990) demostraron que 20% de hombres entre 50 y 60 años, y 50% de aquellos entre 70 y 80 años tenían evidencia histológica de malignidad. En México, las necropsias sugieren que el 10.6% en los varones de 50 a 59 años, el 43.6% entre los 80 y 89 años, y el 83% de entre 90 a 99 años, tienen cáncer prostático (Crawford, 2003).

b) Raza: Los individuos de raza afroamericana tienen los índices más altos de cáncer prostático en el mundo (273.3 por 100,000 hombres). La incidencia en éste grupo es cerca de 60% más alta que entre caucásicos (172.9 por 100,000), que a su vez es mayor que en hispanicos (127.6 por 100,000) y asiáticos (107.2 por 100,000). En cuanto a índices de mortalidad, para Afroamericanos son 3.3 veces más altos que para hispanicos, y 5 veces más que para asiáticos (Crawford, 2003). Según datos del Instituto Nacional de Cáncer, hay un porcentaje más elevado de afroamericanos con enfermedad metastásica, pero no tienen riesgo incrementado en comparación con caucásicos de presentar lesiones de alto grado (Briganti et al., 2009).

c) Historia familiar y susceptibilidad genética: El riesgo de desarrollar CaP se duplica para hombres que tienen un hermano o padre afectado. Cuando dos o más familiares de primer grado se encuentran afectados, el riesgo aumenta entre 5 y 11 veces (Heidenreich et al., 2010). Estudios epidemiológicos indican que

hombres con historia familiar positiva son diagnosticados en promedio 6 a 7 años antes que aquellos sin antecedentes familiares (Crawford, 2003).

La agregación familiar puede ser causada por herencia de un gen de susceptibilidad, pero también puede deberse a exposición a factores ambientales comunes (Balistreri et al., 2014).

Se han identificado 7 loci de susceptibilidad, pero se dificulta demostrar el ligamiento de los genes candidatos conocidos hasta ahora. *Smith et al.* usaron análisis de ligamiento basado en Gwas, y mapearon el locus de susceptibilidad para cáncer prostático hereditario en el brazo largo del cromosoma 1 en familias de alto riesgo de Suecia y Estados Unidos. En estas familias, el cáncer prostático se desarrolló a edad temprana y con más de 5 familiares afectados en 2 generaciones. Un meta análisis subsecuente con 772 familias con cáncer prostático hereditario, demostró evidencia débil para un ligamiento genético en solo 6% de las familias. Sin embargo hay alta evidencia de ligamiento en un subgrupo de 8 familias; en 2 de éstas, un gen dentro del locus HPC1 (2',5' oligoadenilato sintetasa ribonucleasa 1 (*RNASEL*), demostró mutación germinal deletérea. Se cree que el gen *RNASEL* es un supresor tumoral que regula la proliferación celular y apoptosis. Aunque éste puede ser un gen de susceptibilidad, las mutaciones en él solo darían cuenta de un número limitado de casos de cáncer hereditario (Brothman, 2002)

La agregación familiar también puede ocurrir por polimorfismos en genes que son importantes para el desarrollo y función de la próstata (Brothman, 2002).

Entre los genes candidatos, está el dominio de transactivación, codificado por el exón 1 del gen de receptor de andrógenos (*RA*), que tiene 2 diferentes variantes de repetidos (CAG y GGC) que afectan la transcripción y activación del gen. La secuencia CAG varía en longitud de 11 a 31 repetidos en hombres sanos, y el número se relaciona inversamente a la actividad transcripcional del receptor de andrógenos. Algunos estudios sugieren que una longitud más corta se asocia con riesgo incrementado a desarrollar cáncer. Otro gen candidato es *SRD5A2*, que codifica la 5 alfa reductasa tipo 2 que cataliza la conversión de testosterona a dihidrotestosterona. La variante Ala49Thr aumenta la actividad catalítica de la enzima, e incrementa el riesgo a cáncer prostático, particularmente en afroamericanos e hispanos (Brothman, 2002).

## **II.5 Alteraciones moleculares relacionadas al cáncer de próstata**

### *II.5.1 Factores genéticos*

El cáncer de próstata es una enfermedad multifactorial cuya etiología comprende factores genéticos, condiciones ambientales y el microambiente. Se debe distinguir entre las formas familiares y las hereditarias, considerando a éstas últimas aquellas con patrón de herencia Mendeliano (5% de los casos), y las formas familiares dan cuenta del 13-25% de los casos (Alberti, 2010).

Aunque muchos genes pueden influenciar el riesgo para cáncer prostático, los intentos actuales se basan en identificar variantes basadas en polimorfismos de nucleótido único (SNPs).

Se han asociado 74 SNPs con CaP (Cremers et al., 2015). Cada SNP independiente puede aumentar el CaP 1.1 a 1.65, así que hombres con cuatro o cinco de éstos SNPs están expuestos a riesgo a CaP 4 a 5 veces más alto que sujetos sin ellos (Alberti, 2010).

Entre estos SNPs, un polimorfismo en el gen del receptor de vitamina D (*VDR*) parece jugar un rol significativo en su desarrollo. En células prostáticas, la vitamina D 1,25-(OH)<sub>2</sub> se une al VDR nuclear formando un complejo que por un lado regula la transcripción de varios genes involucrados en diferenciación y crecimiento celular, particularmente promoviendo la expresión de IGFBP-3 (proteína 3 de unión al factor de crecimiento de insulina), que inhibe proteínas involucradas en CaP; y por otro lado, modula los genes metabolizadores de andrógenos (Alberti, 2010).

De los polimorfismos relacionados a genes involucrados en carcinogénesis, el genotipo nulo del gen *GSTT1* localizado en 22q11.23, al causar disminución en la detoxificación de arilaminas e hidrocarburos pueden influenciar el riesgo para desarrollar CaP (Alberti, 2010).

Los estudios de actividad génica demuestran que la expresión génica difiere entre la zona periférica y la zona transicional, influenciando así el crecimiento y diferenciación del tejido prostático. Los genes de la zona periférica, como GDF 15 y TARP se ven sobre expresados en CaP, mientras que los genes de la zona transicional como Wnt y FOXF1, FOXF2 están altamente expresados en hiperplasia prostática benigna (Alberti, 2010).

Cremers et al. Demostraron similitud de asociación en SNPs para CaP esporádico y Ca hereditario, lo que sugiera un sobrelape en la etiología genética (Cremers et al., 2015).

### *II.5.2 Factores epigenéticos*

El CaP es una enfermedad compleja con alteraciones a nivel del ciclo celular, la reparación del ADN, apoptosis, respuesta hormonal y mecanismos de adhesión celular. Diversos estudios sugieren que tanto genes supresores de tumor inactivos, oncogenes activos, receptores de hormonas, citocinas, así como receptores de factores de crecimiento están reguladas no solo por mecanismos genéticos sino también por modificaciones epigenéticas (Esteller 2007). Estas modificaciones se definen como cambios heredables en la expresión génica que ocurren sin cambios en la secuencia de DNA y en diversos tipos de cáncer parecen contribuir a la transformación maligna y progresión. Los mecanismos epigenéticos fisiológicos que pueden modificar la estructura de la cromatina se denominan epigenoma y comprenden la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y las modificaciones en el ARN (Li, Carroll, & Dahiya, 2005).

#### *II.5.2.1 Metilación del ADN*

Un tipo de aberración epigenética es la metilación del ácido desoxirribonucleico (ADN), catalizada por DNA metiltransferasa (DNMTs). Los cambios en metilación pueden ocurrir como hipo o hipermetilación. Ambas formas pueden conducir a inestabilidad y silenciamiento transcripcional de los genes, y

ambas han sido implicadas en varias malignidades, incluyendo el cáncer prostático (Schulz & Hatina, 2006).

La metilación de citosinas dentro de los dinucleótidos CpG del ADN es la modificación epigenética más estudiada. Estos dinucleótidos CpG se encuentran en regiones ricas de CpG y se conocen como islas CpG. Se calcula que del 3-6% de estas citosinas se encuentran normalmente metiladas en el ADN humano (Baylin et al. 2001) para proteger la integridad del genoma, evitando la inserción y activación de la transcripción de secuencias móviles o de elementos capaces de insertarse en el genoma tales como transposones y retrotransposones. A nivel germinal, existen genes tejido-específico que son regulados a través de la metilación del ADN. Tal es el caso de la impronta genómica y de la inactivación del cromosoma X en las mujeres, donde se requiere de la hipermetilación del ADN de uno de los dos alelos de un gen para establecer en el primer caso una expresión monoalélica y en el segundo una reducción de dosis génica (Delcuve, Rastegar, and Davie 2009).

#### *II.5.2.2 Hipermetilación del ADN*

La hipermetilación de promotores, es la anomalía epigenética más común y mejor caracterizada en los cánceres humanos. Se han reportado más de 30 genes que sufren hipermetilación aberrante en cáncer prostático. Aquí se incluyen genes supresores de tumor clásicos y genes involucrados en diferentes vías celulares como respuestas hormonales, invasión/arquitectura tumoral, control del ciclo celular y reparación del ADN (Li et al., 2005).

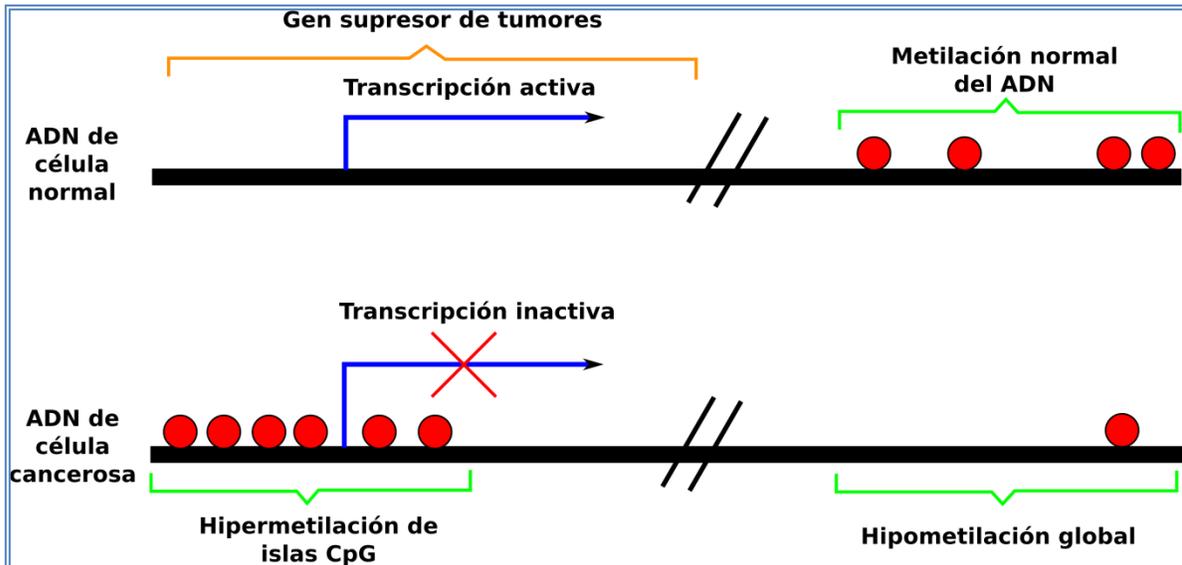


Fig. 8: Metilación del ADN en la carcinogénesis. En tejido normal, la metilación es preferencialmente encontradas en las citosinas de las regiones codificantes de los genes y las islas CpG de los promotores se encuentran demetilados. En el envejecimiento y en las lesiones preneoplásicas, la metilación se prolonga hacia los promotores. En la medida que estos se metilan se bloquea la transcripción, que puede llevar a la inactivación de los genes supresores de tumores, y que se pueden reactivar con el uso de agentes demetilantes (Gronbaek, Hother, and Jones 2007)

Para muchos de estos genes, la hipermetilación del promotor es el mecanismo principal que ocasiona su pérdida funcional en el CaP (Fig. 8). El silenciamiento inapropiado de estos genes puede contribuir a la iniciación, progresión, invasión y metástasis del cáncer (Tabla 1, 2). La hipermetilación de estos genes en el CaP se correlaciona con el grado patológico o estadio clínico, y con independencia androgénica (Fig. 9) (Li et al., 2005).

**Tabla 1: Lista de genes afectados por aberración epigenética en cáncer prostático.**

Aberración epigenética	Gen
<b>1. Hipermetilación de ADN</b>	
Respuesta hormonal	<i>AR, ESR1, ESR2, RARB, RARRES1</i>
Control del ciclo celular	<i>CCND2, CDKN2A</i>
Invasión y Arquitectura tumoral	<i>APC, CAV1, CD44, CDH1, CDH13, LAMA3, LAMB3, LAMC2</i>
Reparación de daño al ADN	<i>GSTP1, MGMT</i>
Señales de transducción	<i>DAB2IP, DAPK1, EDNRB, RASSF1</i>
Respuesta inflamatoria	<i>PTGS2</i>
Otros	<i>HIC1, MDR1, PXMP4</i>
<b>2. Hipometilación de ADN</b>	<i>CAGE, HIPSE, PLAUI</i>
<b>3. Hipoacetilación de histonas</b>	<i>CAR, CPA3, RARB, VDR</i>
<b>4. Metilación de histonas</b>	<i>GSTP1, PSA</i>

Los genes están enlistados alfabéticamente en cada categoría.

**Tabla 2: Genes hipermetilados en cáncer de próstata**

Hipermetilación	Genes	Nota
<b>Casi consistentemente (70-95%)</b>	<i>GSTP, RARB2, RASSF1A, APC, COX2, MDR1, TIG1, HIC1</i>	<i>HIC1, MDR1</i> y <i>RASSF1A</i> también metilados en tejido paraneoplásico.
<b>En algunos casos (20-70%)</b>	<i>CD44, ESR2, CDH1, SFRP1, TMS1, ETNRB, CDKN1C, MGMT, RUNX3, THBS1, CDH13</i>	Datos discrepantes para muchos de estos genes.
<b>En pocos casos</b>	<i>AR, CDKN2A, CDKN1B, DAPK, ESR1, NKX3</i>	Datos discrepantes para muchos de estos genes.

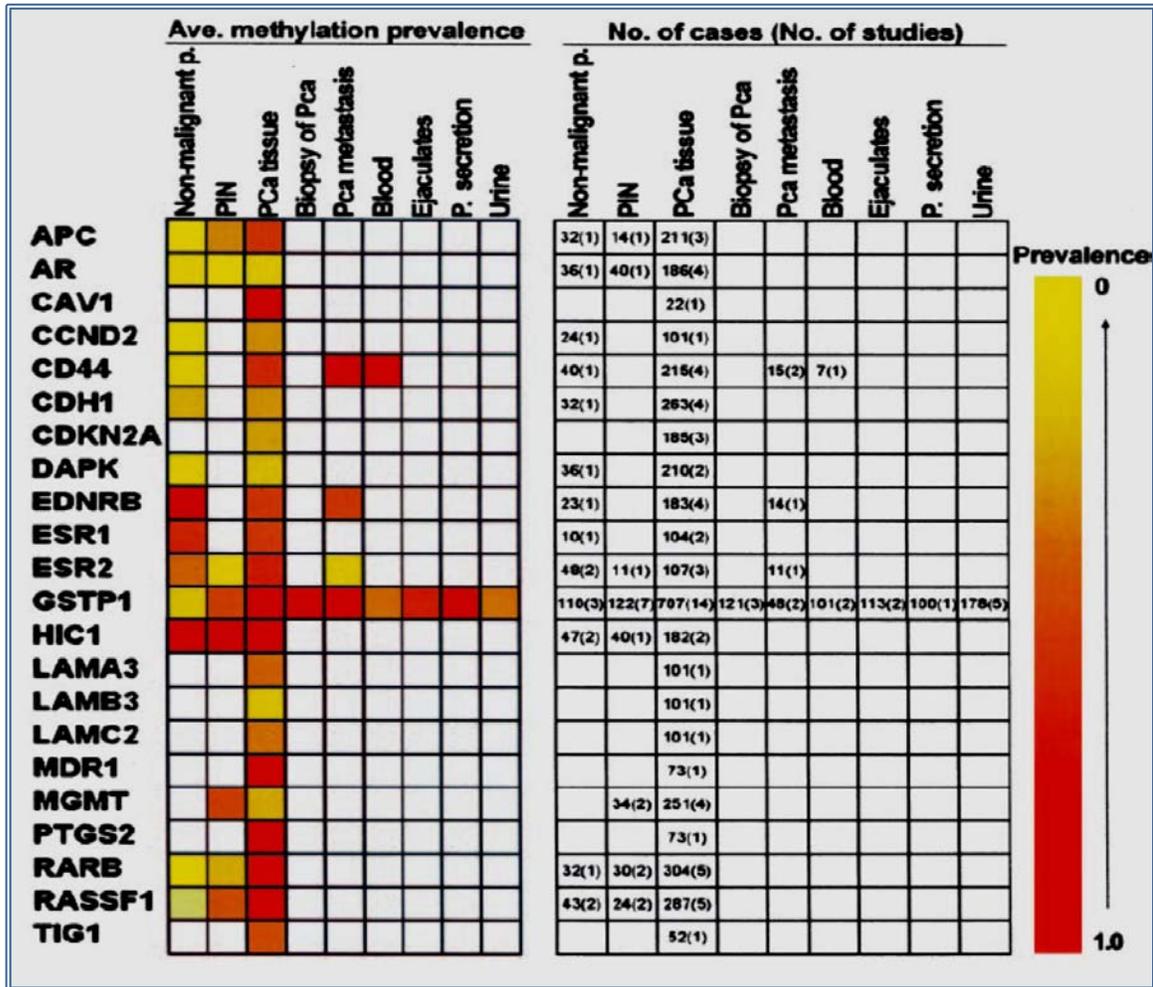


Fig. 9: Prevalencia de genes afectados por hipermetilación en cáncer prostático. La prevalencia de hipermetilación fue recabada de muestras estudiadas, incluyendo tejido prostático no maligno, tejido de cáncer primario de próstata, neoplasia intraepitelial prostática, biopsias de cáncer prostático, tejido de cáncer prostático metastásico y líquidos corporales de pacientes con cáncer de próstata (sangre, eyaculado, secreciones prostáticas y orina). Se calculó un score promedio para cada gen en cada tipo de muestra, al dividir la suma de la prevalencia de hipermetilación de ADN, entre el número de estudios y fue hecha una escala en color entre rojo (1.0 o 100% de metilación) y amarillo (0 o 0% de metilación). Lo blanco indica datos no obtenidos (no se ha realizado estudio para el gen en el tipo de muestra). La lista del panel derecho es del número total de muestras estudiadas y el número de estudios (en paréntesis) para el gen y tipo de muestra en la celda correspondiente del panel izquierdo. PCa=Cáncer de próstata. P=Próstata.

### *II.5.2.3 Vías alteradas por metilación de promotores en cáncer de próstata*

#### a) Genes de respuesta hormonal

La próstata es una glándula endocrina que responde a hormonas sexuales como andrógenos, estrógenos y progestágenos, a través de receptores específicos. Las modificaciones epigenéticas participan en la regulación transcripcional de receptores nucleares de esteroides (Li et al., 2005).

El receptor de andrógenos (AR) media la actividad androgénica, que es esencial para el desarrollo tanto de la próstata normal, como de una cancerosa. Inicialmente, el cáncer prostático es andrógeno dependiente, pero eventualmente se hace independiente después de la terapia con deprivación androgénica. Del 20% al 30% de cánceres andrógeno independientes, no expresan AR. La pérdida de la expresión en este subgrupo se asocia a metilación del promotor, que es más prevalente en cáncer prostático andrógeno independiente que en cáncer prostático primario dependiente de andrógenos, lo que sugiere que el silenciamiento epigenético de AR por hipermetilación de ADN puede ser un mecanismo alternativo que lleva a independencia androgénica en un subgrupo de pacientes con cáncer prostático avanzado (Schulz & Hatina, 2006).

Jarrad y su grupo (Izbicka, Davidson, Lawrence, MacDonald, & Von Hoff, 1999), reportaron metilación aberrante del promotor del AR en líneas celulares AR-negativas. Consistente con este resultado Izbicka y su grupo (Izbicka et al., 1999) demostraron que 5,6-dihidro-5'azacitidina, un inhibidor de la ADN

metiltransferasa, puede restaurar la sensibilidad androgénica en líneas celulares andrógeno-insensibles en líneas celulares, que después se hacen sensibles a la inhibición del crecimiento por antiandrogénicos. La incidencia de la inactivación *AR* mediada por metilación en el cáncer prostático va del 0% al 20% en cánceres primarios, y del 13% al 28% en cánceres andrógeno independientes (Li et al., 2005).

La próstata expresa dos tipos de receptores estrogénicos (ERs): ER $\alpha$  (*ESR1*) y ER $\beta$  (*ESR2*). Se ha documentado la pérdida o disminución en la expresión de éstos, en el cáncer prostático. Expresión baja de ESR también se asocia con pobre pronóstico con terapia endocrina con estrógenos. El gen *ESR1* se encuentra metilado en cáncer prostático, y el estado de metilación se asocia con la progresión tumoral (Li et al., 2005).

#### b) Genes de ciclo celular

Una característica importante de las células tumorales es su habilidad proliferativa incrementada, que se encuentra asociado a inadecuada regulación del ciclo celular. Los inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas (CDKIs) son reguladores negativos de la progresión del ciclo celular y se consideran potenciales supresores tumorales. Actualmente, CDKIs se agrupan en 2 familias: la familia INK4, que incluye *CDKN2A* (p16), *CDKN2B* (p15), *CDKN2C* (p18), y *CDKN2D* (p19), que inhiben específicamente las CDKs 4 y 6; y la familia CIP/KIP que incluye *CDKN1A* (p21), *CDKN1B* (p27) y *CDKN1C* (p57), que inhiben a la mayoría de CDKs. Se ha descrito falla en la inhibición del ciclo celular en CaP, secundaria a alteraciones en la expresión de CDKI. En diversos cánceres,

incluyendo el de próstata, CDKN2A se inactiva por diversos mecanismos, incluyendo silenciamiento por hipermetilación. Se ha descrito inactivación mediada por metilación de CDKN2A en cáncer y tejido prostático, con incidencia de inactivación del 0% al 16%. La metilación en el exón 2 de este gen es más frecuente en CaP (66%) que la metilación en la región promotora, sin embargo, la metilación en este exón no afecta la expresión génica, lo que no deja claro la relevancia funcional de este evento epigenético. Sin embargo, como la hipermetilación del exón 2 solo se observa en tejido canceroso, puede servir como biomarcador para detectar o confirmar una neoplasia prostática. Es rara la inactivación por metilación, de otros genes del ciclo celular como CDKN2B, CDKN1A y CDKN1B (Fig. 10) (Li et al., 2005).

c) Genes de arquitectura e invasión celular

El sistema de adhesión cadherina-catenina es crítico para la preservación de la arquitectura tisular normal, y es regulado por una familia de proteínas llamadas colectivamente moléculas de adhesión celular. Se ha reportado que la expresión disminuida de E-cadherina (*CDH1*) y otras moléculas de adhesión, tienen una significancia pronóstica en varios cánceres humanos, incluido el prostático (Li et al., 2005).

En tumores prostáticos humanos, la expresión de *CDH1* se ve reducida, y su promotor se encuentra metilado en grados variables. Se ha demostrado que la metilación del promotor y del primer exón ocurre en 30% en bajo grado, y 70% en alto grado en muestras de cáncer prostático, y está asociado con expresión

ausente o disminuida de *CDH1* detectada por inmunohistoquímica. *Kallakury et al.* reportaron una prevalencia de 80% de metilación en *CDH1* en muestras de cáncer prostático analizadas por PCR metilación específica. Además, la metilación del promotor de *CDH1* está incrementada en tumores prostáticos avanzados, lo que sugiere que puede ser un biomarcador para determinar la progresión tumoral (Brothman, 2002).

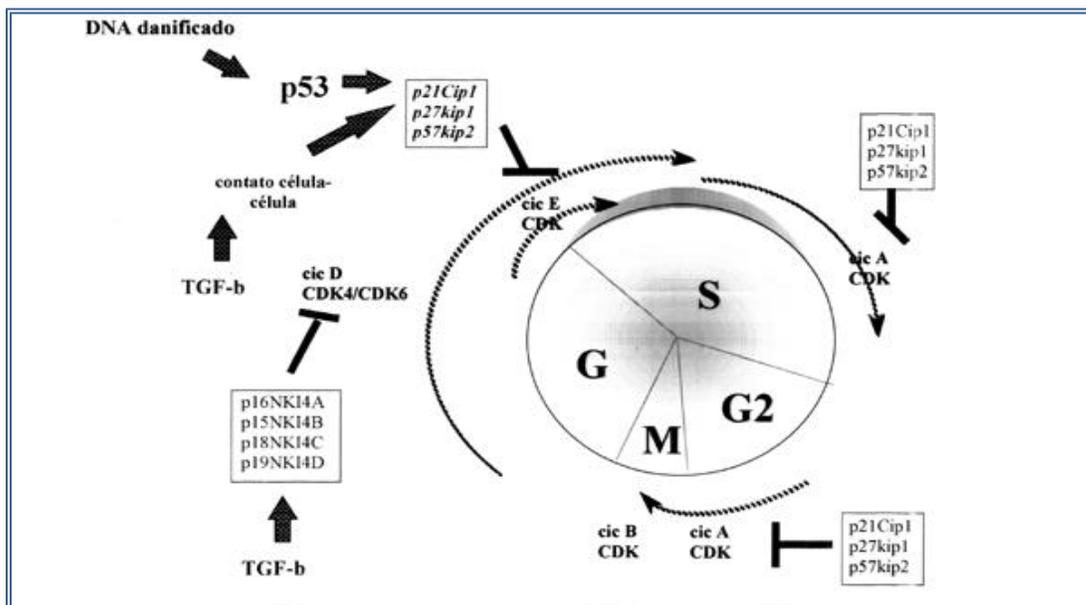


Fig. 10: Factores de progresión y bloqueo del ciclo celular. Las ciclinas son reguladoras de las subunidades CDKs. Diferentes ciclinas se asocia a diferentes CDKs, pudiendo asociarse a más de una CDK en las diferentes etapas del ciclo celular. La función del complejo ciclina/CDK es bloqueada por una serie de inhibidores específicos. Éstos se agrupan en familias como p21/p27/p57, que bloquea múltiples complejos ciclina/CDKs, y la familia p16/p15/p18/p9, que inhibe los complejos CDK4/CDK6. Algunos factores pueden arrestar el ciclo celular en G1, por ejemplo a respuesta al daño causado al ADN, que activa a p53 para inducir la producción de p21. Otros factores pueden actuar a través de diferentes grupos de inhibidores del ciclo, como TGF-β que induce la producción tanto de p15 como de p27 (Ward, 2002)

CD44 es una proteína integral de membrana involucrada en adhesión de la matriz, y transducción de señales. En cáncer prostático, la pérdida de su expresión se asocia a metilación de su promotor. Esta expresión y metilación se asocian con

el estadio del cáncer y el pronóstico del paciente. Otros genes involucrados en el sistema de adhesión cadherina-catenina también han demostrado inactivación mediada por metilación en cáncer prostático, incluyendo H cadherina (*CDH13*), *APC*, *CAV1*, *LAMA3*, *LAMB3* y *LAMC2* (Li et al., 2005).

d) Genes de reparación del ADN

Se ha reportado la hipermetilación de 2 genes involucrados en la reparación del ADN, *GSTP1*, *MGMT*. En el cáncer prostático, la metilación del promotor de *GSTP1* es la alteración epigenética más frecuentemente detectada (Schulz & Hatina, 2006).

*GSTP1* localizado en 11q13.2, pertenece a una superfamilia de genes de glutatión S-transferasas (GSTs) que juegan un papel importante en la detoxificación de componentes electrofílicos (como carcinógenos y drogas citotóxicas, por conjugación de glutatión). *GSTP1* funciona como un detoxificador al neutralizar radicales libres y se ha descrito que la expresión de este gen se encuentra disminuida o ausente en casi el 100% de los tejidos con CaP y en el 50% de las neoplasias intraepiteliales prostáticas (NIP), comparado con células normales de la próstata o células de HBP (Fig. 11) (Syeed et al. 2010; Meiers, Shanks, and Bostwick 2007). La inactivación de *GSTP1* puede llevar a aumentar la vulnerabilidad celular al daño oxidativo al DNA y a la acumulación de aductos de DNA, que pueden preceder a otras alteraciones genéticas relevantes en la carcinogénesis (Li et al., 2005).

De acuerdo a los resultados de diversos estudios se calcula que el rango de sensibilidad de este marcador genético es del 82 al 98% y su especificidad del 100% para la detección de CaP en tejido prostático (Harden, Guo, et al. 2003; Trock et al. 2012)

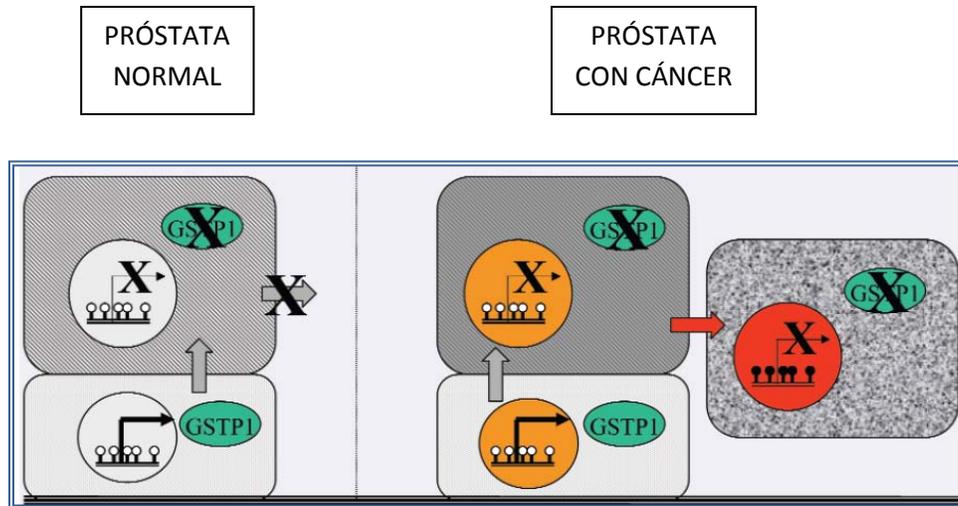


Fig. 11: Una hipótesis explicando la hipermetilación de *GSTP1* en cáncer de próstata. Izquierda: *GSTP1* es expresado normalmente solo en células basales del epitelio prostático y regulado a la baja en las células secretorias terminales diferenciadas. Como estas células no proliferan, el gen inactivo nunca es replicado. Derecha: En el cáncer prostático, las células con un *GSTP1* inactivo atraviesan la fase S, cuando las metiltransferasas de ADN están más activas.

Alteraciones en la metilación de *GSTP1* también se han detectado en orina, plasma y suero con una sensibilidad del 70% y una especificidad del 70-100% (Tabla 3) para la detección de CaP (Bastian et al. 2005; Mulero-Navarro and Esteller 2008; Trock et al. 2012; Wu et al. 2011) La hipermetilación cáncer específica de este marcador, puede servir como biomarcador para la detección clínica del cáncer prostático (Schulz & Hatina, 2006).

#### e) Genes supresores tumorales

La pérdida funcional medida por metilación, de genes supresores tumorales, como *RB1*, *MLH1* y *VHL*, es rara en cáncer próstático. Sin embargo, se ha reportado el silenciamiento por hipermetilación, principalmente en genes de la familia Ras (*RASSF1A*) (Li et al., 2005).

*RASSF1A* (isoforma A de la proteína de la familia con dominio de asociación a Ras) se localiza en 3p21.3 y codifica una proteína similar a las proteínas efectoras RAS. Actúa río abajo en la vía apoptótica de Ras debido a su capacidad de unirse a RAS en un mecanismo dependiente de GTP. Estudios in vitro e in vivo demuestran que su sobreexpresión en células cancerosas lleva al arresto del ciclo celular, se reduce la formación de colonias e inhibe el crecimiento tumoral. Por esto, se le ha propuesto una actividad de supresor tumoral. En el cáncer prostático, la metilación de su promotor es un evento común, que ocurre en el 54% al 96% de muestras tumorales. El 64% de muestras de neoplasia intraepitelial prostática, exhiben hipermetilación del promotor, que también se ha asociado con estadios avanzados. Estos hallazgos indican que la metilación del promotor de *RASSF1* ocurre en el desarrollo temprano del cáncer, incrementa conforme el cáncer progresa, y es un biomarcador tumoral para el diagnóstico y determinación de riesgo del cáncer prostático (Li et al., 2005).

De acuerdo a los resultados en diversos estudios se calcula que la especificidad de *RASSF1A* es de 59 al 83% y su sensibilidad del 55 al 80% para el diagnóstico de CaP en tejido prostático (Mulero-Navarro and Esteller 2008) mientras que en sedimento urinario su especificidad es casi del 73% (Liu et al.

2002). La HMP de *RASSF1A* se ha descrito en las NIP con una frecuencia del 64% y en el CaP de se ha asociado con el avance del tumor según la clasificación de Gleason, por lo cual se ha considerado que HMP de este gen podrían ser indicador del inicio del cáncer, así como de su progresión (Tabla 3) (Liu et al. 2002; Bastian et al. 2005)

**Tabla 3.- Sensibilidad y especificidad del estudio de la HMP de *GSTP1* y *RASSF1A* para la detección del CaP**

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

#### *II.5.2.4 Hipometilación del ADN*

La metilación del ADN en genomas de mamíferos, es un mecanismo de defensa por el cual ADN repetitivo se silencia transcripcionalmente para prevenir

su propagación. La desmetilación de ADN normalmente metilado (hipometilación), puede disruptar este mecanismo de defensa, llevando a alteraciones estructurales y funcionales del genoma (Li et al., 2005).

Hay dos tipos de hipometilación: global o genómica, que se refiere a una disminución global del contenido de 5-metilcitosina en el genoma; y localizada o gen específica, que se refiere a disminución en la metilación de citosinas por debajo del nivel “normal” de metilación. Este último proceso afecta regiones específicas del genoma, como regiones promotoras de proto oncogenes o secuencias normalmente con altos niveles de metilación, como secuencias repetitivas y oncogenes. Ambos tipos de hipometilación se han implicado en cáncer humano (Li et al., 2005).

#### a) Hipometilación global

Los hallazgos iniciales respecto a la metilación de ADN en la próstata salieron de estudios por (Bedford & van Helden, 1987). Ellos observaron que el contenido global de 5-metilcitosina de próstatas con hiperplasia prostática benigna y tumores metastásicos eran significativamente más bajos que en ADN de tumores prostáticos no metastásicos. Estudios posteriores encontraron que la hipometilación global se asocia con el estadio clínico y metastásico del cáncer prostático (Li et al., 2005).

#### b) Hipometilación gen específica

Los genes de células cancerosas se encuentran hipometilados, no así los de células normales. Específicamente, los tejidos cancerosos contienen 2

oncogenes *ras* hipometilados. *C-Ha-ras* y *c-Ki-ras*. Otros ejemplos incluyen *c-JUN* y *c-MYC* en cáncer hepático, y el gen *pS2* en cáncer de mama (Schulz & Hatina, 2006).

En la próstata, el gen *PLAU* es altamente expresado en la mayoría de tejidos cancerosos prostáticos y líneas celulares de cáncer invasivo. Este gen codifica un activador plasminógeno urocinadas, que es una proteína que promueve la invasión tumoral y metástasis en diferentes malignidades, incluyendo el cáncer prostático. La hipometilación del promotor de *PLAU* se ha asociado con la expresión incrementada en líneas celulares hormono-dependientes (Li et al., 2005).

Otros genes hipometilados en el cáncer prostático es *CAGE*, cuya hipometilación ocurre en aproximadamente el 40% de los cánceres de próstata.

Hay poca información acerca de la coexistencia de hipo e hiper metilación global y regional en cáncer, en que la actividad ADN metiltransferasa es alta. La metilación del ADN se ha considerado como mecanismo por el cual se regula la expresión de genes tejido específico. Por lo tanto, la hipometilación gen específica observada en algunos cánceres puede resultar de inhibición transcripcional disruptada de genes tumorigénicos normalmente silenciados. Además la hipometilación gen específica puede asociarse con hipometilación global pero no con hipermetilación gen específica. Por lo tanto hipo e hipermetilación pueden contribuir individualmente al proceso de carcinogénesis (Balistreri et al., 2014).

### II.5.2.5 Modificación de histonas

Un segundo tipo de aberración epigenética involucra la estructura de la cromatina. El patrón de estos cambios (código de histonas), (Schulz & Hatina, 2006), consiste en modificaciones covalentes en las colas de las histonas, interacciones ADN-cromatina, fosforilación, ubiquitinación, sumoilación y glucosilación entre otros mecanismos importantes. En las células normales, es necesario que exista un balance preciso en el ADN acetilado activo y acetilado inactivo (Fig. 12) (Schulz & Hatina, 2006).

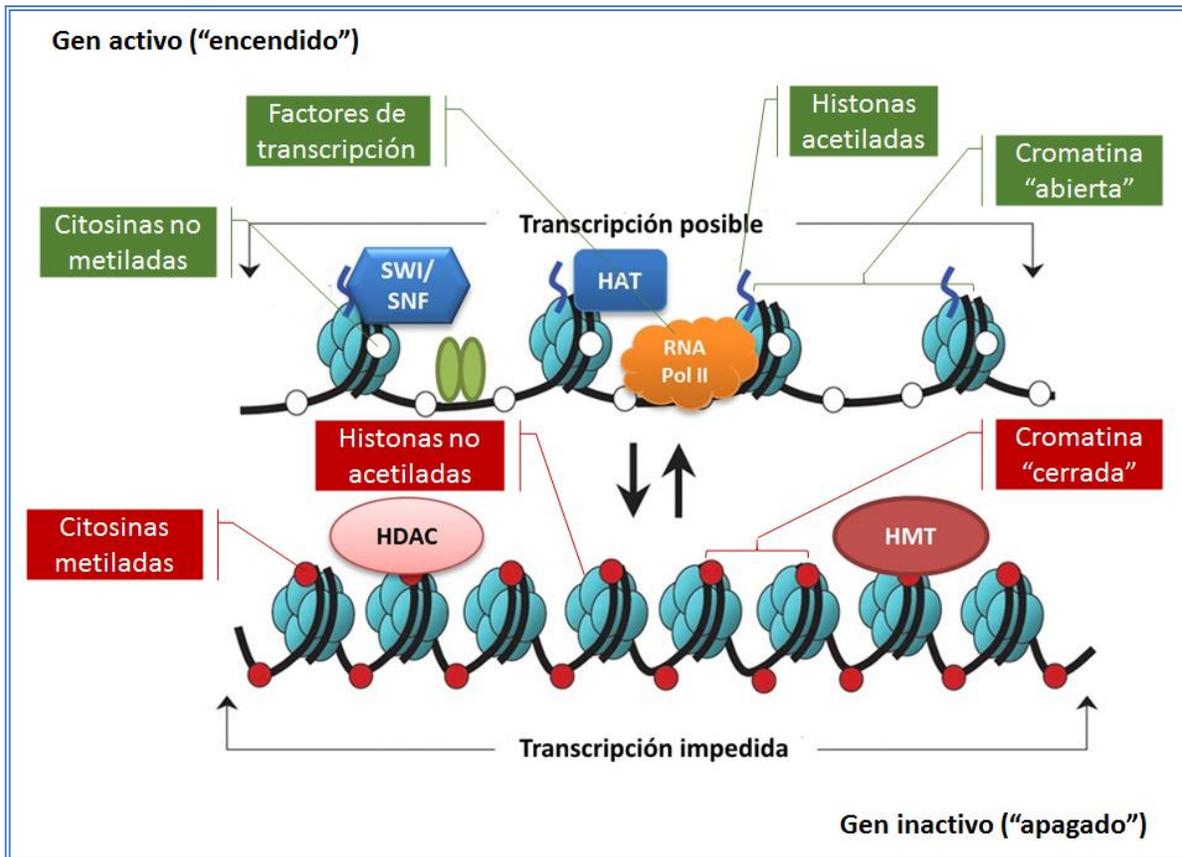


Fig.12: Estructura de la cromatina activa e inactiva del promotor. La cromatina transcripcionalmente activa es caracterizada por citosinas no metiladas y colas de histonas acetiladas. Cuando las citosinas se metilan se unen a dominios de unión al ADN metilado(MBDs), que atraen a deshacetilasas de histonas (HDACs), que van a remover los grupos acetilos de las colas de histonas. El ADN se transforma en una estructura de cromatina cerrada llevando la marca de silenciamiento la histona He lisina 9 trimetilación. (Gronbaek, Hother, and Jones 2007).

Este balance es controlado por enzimas acetiladoras de histonas (HATS) así como enzimas deacetilasas de histonas (HDACs). Otras modificaciones incluyen la metilación de residuos de lisina de las histonas, que es catalizada por metiltransferasas de histonas (MTH) y es un proceso que regula la expresión génica y la estructura de la cromatina (Bronner et al. 2007).

En general, la metilación en la lisina de H3K9, H3K27 y and H4K20 se han asociado con silenciamiento génico mientras que la metilación en H3K4, H3K36 y and H3K se ha asociado con activación (Bronner et al. 2007). Las acetiltransferasas han demostrado incrementar la actividad de varios factores de transcripción al inducir la acetilación de histonas, lo que facilita el acceso del promotor a la maquinaria transcripcional. Contrariamente, las deacetilasas reducen los niveles de acetilación en las histonas y esta ocasiona represión transcripcional (Schulz & Hatina, 2006).

Estos dos mecanismos regulatorios están relacionados. El control epigenético exitoso requiere la cooperación e interacción de ambos mecanismos, y la disrupción de cualquiera de estos procesos produce expresión génica aberrante vista en la mayoría de cánceres humanos (Tabla 4) (Schulz & Hatina, 2006).

Tanto los cambios genéticos como epigenéticos son responsables de la disrupción en las vías de señalización celulares en cáncer. Los proto-oncogenes pueden ser sobreexpresados por ganancia de cromosomas, amplificación génica, translocaciones y mutaciones activadoras. Los genes supresores de tumor (GST)

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

**Tabla 4: Cambios en la cromatina en el cáncer de próstata**

<b>Factor</b>	<b>Función</b>	<b>Cambios en CaP</b>	<b>Observaciones</b>
<b>BRG1</b>	Remodelación	Mutación (en una línea celular, pero no en tejidos)	
<b>CTCF</b>	Control transcripcional	Mutación (pocos casos)	
<b>CTCF/BORIS</b>	Control transcripcional, reprogramación genética	Aumento (probablemente pequeño)	
<b>EZH2</b>	Metilasa de histonas, represión	Aumento	Aumento gradual con progresión
<b>HMG-I(Y)</b>	Arquitectura, recombinación	Aumento	Paralelo a inestabilidad cromosómica
<b>LSD1</b>	Demetilación de histonas, coactivador	Aumento	En cáncer refractario a andrógenos
<b>MBD2/MECP2</b>	Represión dependiente metilación	Falta expresión proteica	de mRNA presente
<b>MTA1</b>	Remodelación, deacetilación, represión	Aumento	Aumento gradual con la progresión
<b>SOX7</b>	Activación transcripcional	Aumento (pocos casos)	
<b>YY1</b>	Represor o activador	Aumento	Niveles más altos localizados en cáncer

La compilación no considera metiltransferasas de DNA o deacetilasas de histonas ni coactivadores o co-represores del receptor de andrógenos.

Varios genes de significancia biológica en CaP, están regulados por modificaciones de histonas. Uno de estos genes *CAR*, que es un receptor de

adenovirus, se ha detectado expresión disminuida en cáncer prostático y se asocia con un score de Gleason aumentado. En líneas celulares urogenitales, incluyendo la línea celular de CaP PC-3, la activación de *CAR* está modulada por acetilación de histonas (Schulz & Hatina, 2006).

## **II.6. Biomarcadores del cáncer prostático**

Para ser aplicable clínicamente, un biomarcador tumoral ideal debe ser detectable en especímenes clínicos obtenidos a través de procedimientos mínimamente invasivos.

### *II.6. 1 Marcadores proteicos: APE y fosfatasa ácida*

El APE es una serina proteasa afín a la calicreína que se produce casi exclusivamente en las células epiteliales de la próstata. Su función fisiológica es disolver el semen coagulado. Un aumento en sangre acompaña frecuentemente un crecimiento anormal de la glándula, por lo cual es el marcador más usado por la mayoría de los urólogos para la detección del CaP (Tabla 5) (Sánchez, 2014). Para efectos prácticos tiene especificidad de órgano, pero no de cáncer. Por tanto, las concentraciones séricas pueden aumentar el presencia de HPB, prostatitis y otras enfermedades no malignas. El valor de APE como variable independiente es un mejor factor predictivo de cáncer que los hallazgos sospechosos en el tacto rectal (Heidenreich et al., 2010).

**Tabla 5: Correlación entre concentración sanguínea de APE y riesgo a desarrollar CaP.**

<b>Concentración de APE (ng/ml)</b>	<b>Riesgo de CaP</b>
<b>0-0.5</b>	6.6%
<b>0.6-1</b>	10.1%
<b>1.1-2</b>	17.0%
<b>2.1-3</b>	23.9%
<b>3.1-4</b>	26.9%

Uno de los primeros marcadores séricos para el diagnóstico del CaP fue la fosfatasa ácida (FA). A principios de 1930, se describió un incremento de la actividad de la FA en el sitio de metástasis así como niveles elevados de la proteína en suero. Esta observación permitió establecer a la FA como un biomarcador de progresión y respuesta a la terapia de deprivación de andrógenos en el cáncer metastásico. Whitesel y colaboradores reportaron que hombres con niveles elevados de FA previo a la cirugía tuvieron nodulos positivos y desarrollaron metástasis comparados con aquellos con FA normal y que además podría predecir el pronóstico combinado con otros factores (Whitesel et al. 1984). Con el uso del APE, los niveles séricos de FA fueron siendo menos utilizados y debido a su menor sensibilidad no se emplea para el tamizaje, estadiaje o pronóstica del CaP. Sin embargo, estudios recientes han demostrado que FA es un buen marcador para el pronóstico de pacientes en tratamiento con enfermedad agresiva y que tienen un alto riesgo a una recaída (Taira et al. 2007).

### *II.6.2 Marcadores de ADN: cambios epigenéticos*

La hipermetilación del ADN parece cumplir este requerimiento para ser considerado como un biomarcador, por varias razones. Primero, siempre ocurre en regiones definidas (islas CpG) y puede ser detectado usando técnicas con alta sensibilidad, como PCR metilación específica, o de alta resolución como la secuenciación genómica con bisulfito. Segundo, el ADN hipermetilado se asocia virtualmente con todos los tipos tumorales, cada uno teniendo su propio sello de genes metilados, como el gen *GSTP1* en cáncer prostático. Estas características hacen la hipermetilación del ADN un excelente candidato para biomarcador tumoral (Briganti et al., 2009).

Como el gen *GSTP1* es el más frecuentemente metilado en cáncer prostático, se han hecho intentos para detectar cáncer prostático mediante la identificación de islas CpG *GSTP1* en muestras clínicas, incluyendo plasma y suero, secreciones prostáticas, orina y biopsias prostáticas. Goessl et al. examinaron metilación de este gen en muestras de orina después de masaje prostático, y detectaron cáncer con una especificidad del 98% y una sensibilidad de 73%. *GSTP1* también se puede usar para detectar células ocultas de CaP en células linfáticas. Kollermann et al. Encontraron evidencia de hipermetilación de éste gen en 90% de nódulos linfáticos de pacientes con CaP, y solo 11.1% en una cohorte sin cáncer, lo que sugiere que la detección de metilación de *GSTP1* puede tener un papel en el estadiaje molecular del cáncer (Li et al., 2005).

Usar el estado de metilación de un solo gen como biomarcador tiene limitaciones, incluyendo sensibilidad insuficiente, falta de especificidad en diferenciar cáncer prostático de enfermedad no maligna y de otros cánceres. El examen de patrón de metilación de múltiples genes puede sobreponer estas limitaciones y ofrecer mejor posibilidades pronosticas y diagnósticas. Al establecer patrones de metilación de múltiples genes en tejido prostático, varios estudios han demostrado mejorar la sensibilidad y especificidad en detectar cáncer prostático. Por ejemplo, al examinar la metilación de *GSTP1*, *APC*, *RASSF1* y *MDR1* puede distinguir cáncer prostático primario de tejidos prostáticos benignos, con sensibilidades de 97%-100% y especificidades de 92%-100% (Li et al., 2005).

Otra aplicación potencialmente útil para perfiles de metilación, es en la clasificación molecular del cáncer prostático. El sistema de clasificación actual depende de observaciones histopatológicas que no son capaces de predecir si un tumor latente progresará a un tumor clínicamente relevante o si responderá a terapia androgénica (Schulz & Hatina, 2006) (Li et al., 2005).

### *II.6.3 Marcadores de mRNA: PCA3*

El implemento de marcadores para CaP en fluidos corporales es necesario para mejorar la especificidad en el diagnóstico; uno de los bio marcadores más analizados, por su potencial utilidad clínica, como una herramienta para predecir el resultado de la biopsia es el *PCA3* (Brothman, 2002).

Bussemaker en 1999, fue el primero en describir el gen del cáncer de próstata 3, llamado inicialmente DD3 y actualmente *PCA3*, el cual es uno de los

genes más específicos para CaP. Su transcripción es un ARNm no codificante localizado en 9q21.22 que es sobreexpresado de 60 a 100 veces más en el CaP comparado con tejido prostático benigno. En 2003, Hesels reportó que el *PCA3* es sobre expresado en 95% de las células examinadas y demostró la potencial utilidad clínica de la prueba para *PCA3* en orina generando un score con un punto de corte de 35. En la actualidad existen varias pruebas en orina par *PCA3* realizadas en diferentes metodologías, como fluorescencia resuelta en el tiempo (TRF), reacción en cadena en tiempo real cuantitativa de la polimerasa (qPCR) y amplificación del RNA media por transcripción; ésta última con un primer valor de corte fijado en 50 mostró una sensibilidad de 69% a 83% y un valor predictivo negativo de 80% a 90% (Balistreri et al., 2014).

Se mide en sedimento urinario obtenido después de un masaje prostático. Las principales ventajas del *PCA3* sobre el PSA son su sensibilidad y especificidad mayores. La concentración de *PCA3* presenta aumentos leves, pero significativos, en biopsias positivas, pero no se ve afectada por el volumen prostático ni la prostatitis. Hay datos contradictorios acerca de si los valores de *PCA3* están relacionados con la agresividad del tumor (Brothman, 2002).

En un futuro próximo es posible que varias pruebas diagnósticas moleculares pasen del laboratorio al contexto clínico, por ejemplo detección de genes de fusión *TMPRSS2-ERG* específicos del CaP en el sedimento de orina obtenido después de un masaje prostático (Brothman, 2002).

Hasta ahora en nuestro país, ninguno de los biomarcadores señalados se utiliza habitualmente para asesorar a pacientes sobre la necesidad de practicar una biopsia de próstata para descartar un CaP.

## **II.7 Moduladores epigenéticos para tratamiento de cáncer prostático**

### *II.7.1 Reversión de la hipermetilación por inhibidores DNA metiltransferasa*

A diferencia de alteraciones genéticas como las mutaciones, los cambios epigenéticos son potencialmente reversibles. Esta propiedad los hacen un blanco atractivo para terapia contra el cáncer. In vitro se han usado ampliamente la 5-azacitidina, y la 5-aza-deoxicitidina (análogos inhibidores de DNMTs), para revertir la hipermetilación anormal de ADN anormal y restaurar la expresión génica silenciada. Solo se ha logrado éxito limitado en ensayos clínicos con estas drogas (Li et al., 2005).

Aunque los agentes desmetilantes pueden proteger contra algunos cánceres, también pueden promover inestabilidad genómica y aumentar el riesgo de cáncer en otros tejidos, por lo tanto se debe tener precaución en seleccionar el tipo de paciente para incluirse en ensayos clínicos que involucren este tipo de terapias (Li et al., 2005).

## **II.8 Diagnóstico de enfermedades prostáticas**

La definición de cualquier enfermedad es importante en el reconocimiento y diagnóstico de la misma. En el caso de la HBP existen profundas discrepancias entre los autores sobre qué combinación de síntomas, obstrucción de flujo urinario y tamaño prostático pueden establecer una definición precisa de esta patología con un amplio consenso sobre la necesidad de testículos funcionales y cierta edad para el desarrollo de la misma (Heidenreich et al., 2010). La mayoría de los pacientes que solicitan tratamiento, lo hacen en relación a las molestias que afectan su calidad de vida. Por esto es de gran importancia contar con herramientas de diagnóstico útiles y estandarizadas que permitan valorar cuantitativamente los síntomas, la gravedad de los mismos y la afectación de la calidad de vida resultante, con el fin de comprobar la eventual progresión de la enfermedad y llevar a cabo el tratamiento idóneo (Sánchez-Barriga, 2013).

Ciertas entidades internacionales han desarrollado una serie de pautas o recomendaciones para poder diagnosticar HBP. Dentro de éstas se incluye un mínimo de estudios clínicos que proveen la información necesaria (Frenk Mora Julio, Tapia Conyer Roberto, Uribe Esquivel Misael, 2001):

a) El índice Internacional Prostate Symptoms Score (IPSS) es a menudo el más recomendado y consiste en ocho preguntas, siete de las cuales exploran los síntomas urinarios y una de ellas investiga la calidad de vida.

b) El examen rectal digital, es otra evaluación fuertemente recomendada para el diagnóstico de HBP.

c) La determinación de antígeno prostático específico (PSA) se recomienda en la mayoría de las pautas internacionales, si bien es opcional con el objetivo de inferir el volumen prostático y excluir el CaP.

d) La determinación de creatinina urinaria es otro estudio recomendado debido a que la existencia de una obstrucción urinaria durante un período prolongado de tiempo puede conducir a una insuficiencia renal.

e) Se recomienda incluir en el diagnóstico la flujometría y la medida del volumen residual de vaciamiento urinario.

Diagnóstico diferencial: No toda la sintomatología del tracto urinario inferior es debida a HBP. Una correcta historia clínica con antecedentes personales y familiares delimitará el diagnóstico con mayor precisión.

### ***II.9 Tamizaje y detección precoz***

En el ensayo sobre el tamizaje de cáncer PLCO (Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian) se aleatorizó a 76,693 varones en 10 centros estadounidenses a someterse a un tamizaje anual con PSA y tacto rectal. Tras 7 años de seguimiento la incidencia de CaP por 10,000 años-persona fue de 116 (2,820 cánceres) en el grupo de control sin tamizaje (Heijnsdijk et al., 2012).

### **III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La hiperplasia benigna de próstata (HBP) es el tumor benigno más frecuente en varones mayores de 60 años. Es una de las enfermedades que con mayor frecuencia se presentan en hombres adultos de avanzada edad. Constituye la segunda causa de ingreso para intervención quirúrgica y la primera causa de consulta en los servicios de urología (González et al., 2005).

En México la HBP, es un padecimiento frecuente, datos del Instituto Mexicano del Seguro Social mostraron que en 2005 se otorgaron a nivel nacional por este padecimiento 1,235 consultas en el grupo de menores de 45 años, 12,393 en el grupo de 45 a 59 años y de 60,246 en el grupo de 60 años o más (Intranet, IMSS).

Actualmente existe una variabilidad muy amplia en el manejo de los pacientes con HBP, pues de acuerdo con datos de la Secretaría de Salud hasta 2009 no se contaba con criterios estandarizados para su manejo en hospitales de primero y segundo nivel. Esto tiene como consecuencia una enorme variabilidad en el diagnóstico y tratamiento de estos pacientes, lo que en consecuencia repercute en la calidad de la atención y en un incremento en la utilización de recursos (SSA, 2009)

El agrandamiento permanente de la próstata en hombres mayores de 50 años es un padecimiento común que puede ser benigno o puede tratarse de un cáncer de próstata (CaP). El diagnóstico de las anomalías prostáticas puede realizarse a través de la determinación sérica de antígeno prostático específico (APE), el tacto rectal y el ultrasonido transrectal (Andriole et al., 2009). Si alguno de estos

parámetros resulta alterado es necesario realizar una biopsia transrectal que permita confirmar si el cáncer está presente (Börgermann et al. 2011; Loeb y Catalona., 2008).

La determinación de niveles séricos de APE es obligadamente usada en la práctica clínica como un método no invasivo para diferenciar la HBP del CaP. Su baja especificidad hacen de este un marcador diagnóstico poco preciso ya que del 20 al 30% de los individuos con CaP pueden tener niveles normales de APE y o bien la elevación del mismo, puede ocurrir en procesos inflamatorios e hiperplásicos benignos (Agnihotri et al. 2014; Börgermann et al., 2011; McKenzie et al., 2011).

En cuanto a la la utilidad pronóstica del APE los estudios en diversas poblaciones son controversiales y lo que hace necesaria la búsqueda y análisis de otros marcadores que pudieran ser útiles en el seguimiento de pacientes después del tratamiento.

#### **IV. HIPÓTESIS**

El incremento en los niveles de metilación de los promotores de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en el ADN de células del sedimento urinario de pacientes con hiperplasia benigna de la próstata después del tratamiento pueden ser indicadores de la aparición de una neoplasia maligna.

#### **V.JUSTIFICACIÓN**

De acuerdo con lo revisado en la literatura, queda de manifiesto la necesidad de contar con marcadores diagnósticos y pronósticos que permitan predecir el

cambios benignos o malignos en paciente con anomalías prostáticas. Es importante considerar que el diagnóstico histopatológico por biopsia con aguja delgada cuenta con algunas limitaciones debido que para realizar el análisis histopatológico de una biopsia es necesario contar con una cantidad suficiente del mismo y que este tenga un patrón de crecimiento característico del tipo de tumor, atipia nuclear, ausencia de células basales y presencia de material extracelular proveniente de la glándula. La falta de alguna de estas características puede limitar en ciertas ocasiones la precisión del diagnóstico y entonces se requiere repetir el procedimiento y aumentar la probabilidad de infecciones u otras complicaciones en la salud del paciente.

Se ha reportado que existen perfiles de metilación específicos regiones promotoras de los genes que se observan en cierto tipos de cáncer pero no en tumores benignos, por ejemplo la metilación del promotor de *GSTP1* en CaP, *VHL* en cáncer renal, *MLH1* en cáncer de colon y *APC* en cáncer esofágico.

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

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

Los eventos de metilación aberrante pueden ocurrir al inicio de una transformación neoplásica sin embargo esto puede variar dependiendo el gen y el tipo celular, la edad, las diferencias étnicas, exposición a factores ambientales etc. De ahí la importancia de saber la frecuencia con que estos cambios ocurren en células tumorales, células hiperplásicas y células sanas. Todavía hay muchas interrogantes por ser contestadas para entender el significado biológico y las consecuencias de este proceso de proliferación celular. Por todo lo mencionado, es necesario generar nuevas opciones el diagnóstico precoz, la atención oportuna de los pacientes e implementación de medidas en todos los sectores de la población con mayor riesgo por su edad y antecedentes familiares, para la promoción de salud por medio de campañas de sensibilización dirigidas a vencer la resistencia de los hombres a realizarse exámenes médicos periódicos invasivos, en general no aceptados por una gran proporción de la población masculina, por otros no invasivos y confiables.

## **VI. OBJETIVOS:**

### ***VI.1 Objetivo general:***

Determinar la utilidad de ciertos marcadores moleculares en el seguimiento con hiperplasia benigna prostática a través de métodos no invasivos.

## *VI.2 Objetivos específicos:*

1. Cuantificar el nivel de metilación de los promotores de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en ADN sedimento urinario de pacientes con hiperplasia benigna de la próstata antes y después del tratamiento.
2. Evaluar si cambios en el nivel de metilación de los promotores de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en ADN sedimento urinario tienen alguna utilidad pronóstica.

## **VII. MATERIAL Y MÉTODOS.**

### *VII.1 Diseño del estudio:*

#### *VII.1.1 Descripción del estudio:*

A todos los pacientes se les informó de los objetivos y procedimientos del estudio y todos aquellos pacientes que otorgaron su consentimiento informado por escrito fueron incluidos en el estudio con la seguridad de que la información recabada para este estudio era confidencial, que su participación era voluntaria pudiéndose negar a participar en cualquier momento y que eso no repercutiría en su tratamiento ni seguimiento dentro del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán. El estudio tuvo un carácter observacional y no experimental, por lo que careció de maniobras activas que influyeran directamente en la historia natural de su enfermedad ya que solo se tomaron muestras de orina. En dichas muestras se realizó la extracción de ADN para cuantificar el grado de metilación de los genes *GSTP1* y *RASSF1A*. De las muestras de suero se determinó el APE.

### *VII.1.2 Población de estudio*

En este estudio se incluyeron un total de 14 pacientes que asisten a la clínica de Urología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán como parte del seguimiento en su tratamiento al haber sido diagnosticados con hiperplasia benigna de la próstata entre los años 2007 y 2010. En ese periodo, a los pacientes se les había invitado a participar en el estudio “Uso de marcadores genéticos para el diagnóstico de cáncer de próstata por métodos no invasivos” realizado por el Departamento de Genética del mismo Instituto. En dicho estudio se les había realizado el diagnóstico de hiperplasia benigna por anatomía patológica y se les cuantificaron los niveles de metilación de los promotores de los genes *GSTP1* y *RASSF1A* en ADN de tejido prostático, sedimento urinario y plasma todo ello antes ser sometidos a tratamiento farmacológico y/o quirúrgico. Nuevamente en el mes de julio de 2014 se les invitó a participar en el presente estudio para hacer un seguimiento de su patología y cuantificar en el ADN de sedimento urinario los niveles de metilación de los promotores mencionados. Cada participante firmó un consentimiento informado y contestó una encuesta de antecedentes clínico-genéticos

### *VII.1.3 Extracción de ADN de sedimento urinario*

La extracción de ADN de plasma se llevó a cabo empleando un kit comercial (QiAmp DNA Micro Kit de QIAGEN®) de acuerdo con las condiciones del proveedor. Para cada muestra de ADN se determinó su concentración y su pureza mediante espectrofotometría y se mantuvo a -70°C hasta su uso.

### VII.1.3 Conversión de ADN con bisulfito de sodio

Para la conversión con bisulfito de sodio, se usaron 1.5 microgramos de ADN empleando el kit EpiTect Bisulfite (QIAGEN®). El ADN modificado se cuantificó por espectrofotometría y se mantuvo a -70 °C hasta su uso.

### VII.1.4 PCR cuantitativo metilación-específica

La cuantificación de la metilación se realizó en el ADN convertido con bisulfito de sodio de sedimento urinario por qPCR de tiempo real con SYBR green (Qiagen®) empleando los primers: *GSTP1-FM* 5-GTCGTGATTTAGTATTGGGG-3 y *GSTP1-RM* 5-CTAATAACGAAAACACTACGACGA-3; *RASSF1A-FM* 5-GCGTTGAAGTCGGGGTTC-3 y *RASSF1AFM* 5- CCCGTACTTCGCTAACTTTAA-3. . Como gen endógeno se utilizó  $\beta$ -actina (*ACTB*) el cual fue amplificado usando los primers: *ACTB-F* 5-GGTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3 y *ACTB-R* 5-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3. Las condiciones de amplificación para todos los fragmentos fueron 15°Cx15s y 40 ciclos a 94°Cx45s, 56°Cx45s y 72°Cx30s (Bastian et al., 2005). El porcentaje de metilación del promotor (%MP) fue determinado mediante la cuantificación absoluta para ello se realizaron curvas estándar para cada gen de interés utilizando concentraciones conocidas de alelos metilados de ADN de la línea celular Jurkat tratados in vitro con la metiltransferasa SssI (New England Biolabs®) y alelos no metilados provenientes del ADN de la línea celular Jurkat tratadas con Azacitidina (New England Biolabs®). Para validar las curvas se consideraron 3 parámetros propuestos en la literatura: el valor de  $R^2$  cercano a 0.99, la pendiente (M) lo más cercano a 3.2 y una eficacia

de reacción cercana a 1.0. Para corroborar que la amplificación que se estaba cuantificando fuera específica se realizó un análisis de desnaturalización (Melting) de cada amplificado asegurando que solo se observara un solo pico de amplificación. Cada muestra fue cuantificada por triplicado y promediada. La cuantificación de la metilación se representó en porcentaje de copias metiladas del promotor y se calculó mediante la fórmula  $\%MP = (\text{no. de copias metiladas gen de interés de la cuantificación absoluta} / \text{total de copias del gen } ACTB \text{ en la muestra}) / \text{total de ADN metilado y no metilado} \times 100$  (Bastian et al. 2005).

#### *VII.1.5 Análisis estadístico:*

Para describir a la población de estudio, se utilizaron medidas de tendencia central. Para el APE se estableció como punto de corte un valor  $\geq 4$  ng/ml tal como se usa en la práctica clínica (Platz et al. 2004). Los puntos de corte para los distintos marcadores moleculares se determinó a partir de un análisis por curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio. Para el PMP se consideraron como positivos todos los valores  $\geq 10$  y todos los valores  $\geq 20$  de acuerdo a los resultados de un estudio previo realizado por nuestro grupo (Sanchez B., 2014). La comparación de variables categóricas fue analizada mediante la prueba exacta de Fisher. Los datos fueron analizados con el programa STATA versión 9.0. Para determinar diferencias estadísticamente significativas se consideró un valor de  $p \leq 0.05$

## VIII. RESULTADOS

### VIII.1 Características del grupo de estudio.

La muestra analizada estuvo conformada por 14 pacientes con hiperplasia prostática benigna. Todos fueron pacientes del INCMNSZ. El promedio de edad al diagnóstico fue 64.7 años con un rango de 53 a 75 años. Se propone que la obesidad y tabaquismo son factores de riesgo para desarrollo de CaP, por lo que se determinó el índice de masa corporal, siendo el promedio de 24.83. Se determinó que en este grupo, 4 pacientes (28.5%) fueron fumadores. El 100% de los pacientes tenía alguna comorbilidad, 11 de ellos (78.5%) tenían diagnóstico de síndrome metabólico (Tabla 6).

**Tabla 6: Antecedentes clínicos de los pacientes estudiados**

NO. DE CONTROL GENÉTICA	EDAD AL DX	MESES SEGUIMIENTO	IMC	TAB	OTRO DIAGNÓSTICO
009/01	60	84	19	-	Divertículos
015/01	68	83	20.14	-	DM2
022/01	63	81	24.8	-	Dislipidemia
027/01	70	81	27.21	-	DM2/HAS
045/01	56	79	26.70	-	Cáncer de estómago
054/01	65	78	24.16	-	Gastritis
102/01	53	74	23.95	-	HAS
105/01	73	72	27.25	+	Dislipidemia
106/01	75	72	22.22	-	Dislipidemia/ HAS/DM2/ Cardiopatía isquémica
109/01	70	71	26.25	-	HAS
173/01	64	62	25.31	+	Dislipidemia
205/01	64	53	23.14	+	DM2/HAS
218/01	62	48	30.79	+	Obesidad/EPOC/DM2
227/01	63	48	26.77	-	HAS/DM2/Gota

DX: Diagnóstico; TAB: Tabaquismo; IMC: Índice de Masa Corporal; DM2: Diabetes Mellitus tipo 2; HAS: Hipertensión Arterial Sistémica; EPOC: Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica.

En cuanto a los antecedentes heredofamiliares relacionados al cáncer tres de los pacientes (21.4%) tenían un padre afectado con algún tipo de cáncer, y dentro de éstos, uno (7.1%) con CaP y uno (7.1%) con HPB. Cinco de los pacientes (35.7%) tuvieron una madre afectada de cáncer. En cuanto a los hermanos de los probandos, 6 (42.8%) tuvieron algún cáncer, dentro de éstos 1 (7.1%) CaP y 2 (14.2%) HPB. Dos de los pacientes (14.2%) tuvieron algún hijo afectado de cáncer, ninguno de ellos de próstata (Tabla 7).

**Tabla 7. Antecedentes heredofamiliares relacionados diversas patologías.**

NO. DE CONTROL GENETICA	PADRE	MADRE	H1	H2	H3	H4
009/01	Cáncer gástrico		Cáncer de próstata			
015/01	Cáncer gástrico		IAM	Cáncer de mama		
022/01			IAM	IAM	Accidente	Hipertiroidismo
027/01	EVC	Cáncer Cervicouterino	DM2	Alcoholismo	HAS	DM2
045/01	Enfermedad de Parkinson	Leucemia	Artritis	DM2		
054/01	Hiperplasia Prostática Benigna	HAS	IAM			
102/01		HAS	Litiasis	Asma		
105/01	Cáncer de próstata	DM2	DM2	Hepatitis	DM2	
106/01	HAS	HAS	EVC	IAM		
109/01	IAM/HAS	Cáncer de mama	Cáncer de mama			
173/01			Hiperplasia Prostática Benigna			
205/01	IAM/HAS	DM2	Úlcera gástrica	IAM		
218/01		Cáncer de colon	DM2	DM2/Hiperplasia Prostática Benigna		
227/01		Cáncer de colon	HAS	DM2	Cáncer vesicular	DM2

IAM: Infarto agudo al miocardio; HAS: Hipertensión Arterial Sistémica; DM2: Diabetes Mellitus tipo 2; EVC: Evento Vascular Cerebral; Hermano 1; Hermano 2; Hermano 3; Hermano 4.

### VII.2 Niveles de Antígeno Prostático Específico durante el seguimiento.

Se les dio seguimiento en un promedio de 70.4 meses, con un intervalo de 48 a 84. A todos los pacientes se les determinó niveles de APE. Se estratificó a los pacientes de acuerdo a los niveles como: normal < 4 ng/ml, intermedio  $\geq 4$  <10 ng/ml, altamente sospechoso  $\geq 10$  ng/ml. Al momento del diagnóstico de la HBP, la mediana de APE fue 6, y el promedio 5.8, y posterior al tratamiento, los niveles se redujeron, con un promedio de 4 y una mediana de 2.5 (Tabla 8). Del total de pacientes, 12 tuvieron niveles de APE superiores a 4ng/ml a diferencia de 5 durante el seguimiento. Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p=0.018$ )(Tabla8).

**Tabla 8. Niveles de Antígeno Prostático Específico .**

<b>NIVELES DE APE</b>	<b>HBP n=14 Inicial</b>	<b>HBP n=13 Seguimiento</b>
<b>&lt;4 ng/ml</b>	2	8
<b><math>\geq 4</math> &lt;10 ng/ml</b>	11	5
<b><math>\geq 10</math> ng/ml</b>	1	0
<b>Promedio</b>	6	4

### VII.3 Porcentaje de metilación de los promotores GSTP1 y RASSF1A

El porcentaje de metilación del promotor (%MP) fue determinado mediante cuantificación absoluta de copias metiladas de las regiones promotoras de los genes de interés empleando PCR de tiempo real. De acuerdo a lo descrito en la metodología, cada muestra de interés fue convertida con bisulfito de sodio y amplificada por triplicado el cual fue promediado. La figuras 13A, B y C muestran un ejemplo de las curvas de amplificación en condiciones desnaturalizantes lo que

demuestra que la amplificación de las muestras y la cuantificación fue específica. La cuantificación de los niveles de metilación fue absoluta a partir de una curva estándar obtenida a partir de una cantidad conocida de copias de ADN convertidas con bisulfito de sodio del gen *ACTB* (gen endógeno) y una cantidad conocida copias metiladas de *GSTP1* y *RASS1A*. La sensibilidad establecida para este ensayo permitió cuantificar correctamente desde 200 copias hasta 0.2 copias convertidas. Para validar las curvas se consideraron 3 parámetros propuestos en la literatura: el valor de  $R^2$  cercano a 0.99, la pendiente (M) lo más cercano a 3.2 y una eficacia de reacción cercana a 1.0.

Como puede observarse en las figuras 13 A,B y C, es posible observar un solo pico a la temperatura de desnaturalización correspondiente a cada gen. Para *ACTB*, la temperatura de desnaturalización fue cercana a 75 °C mientras que *RASSF1A* y *GSTP1* fue más cercana a los 80 °C

Una vez cuantificado se realizó el cálculo del número de copias de *ACTB*, *GSTP1* y de *RASSF1A* en las muestras de pacientes con CaP y con HBP y se determinó el %MP como la razón de la (*cantidad del gen de interés / cantidad del gen endógeno*) x 100 (Tabla 9).

Se les dio seguimiento en un promedio de 70.4 meses, con un intervalo de 48 a 84. A todos los pacientes se les determinó el porcentaje de metilación del promotor (%MP) de *GSTP1* en el ADN de sedimento urinario (SUR). Los datos al momento del diagnóstico de HBP para este promotor fueron: 16.7 en tejido prostático y 9.5 en sedimento urinario y las medianas de 8.9 y 2.9 respectivamente. Posterior al tratamiento, los niveles se redujeron en SUR, con un

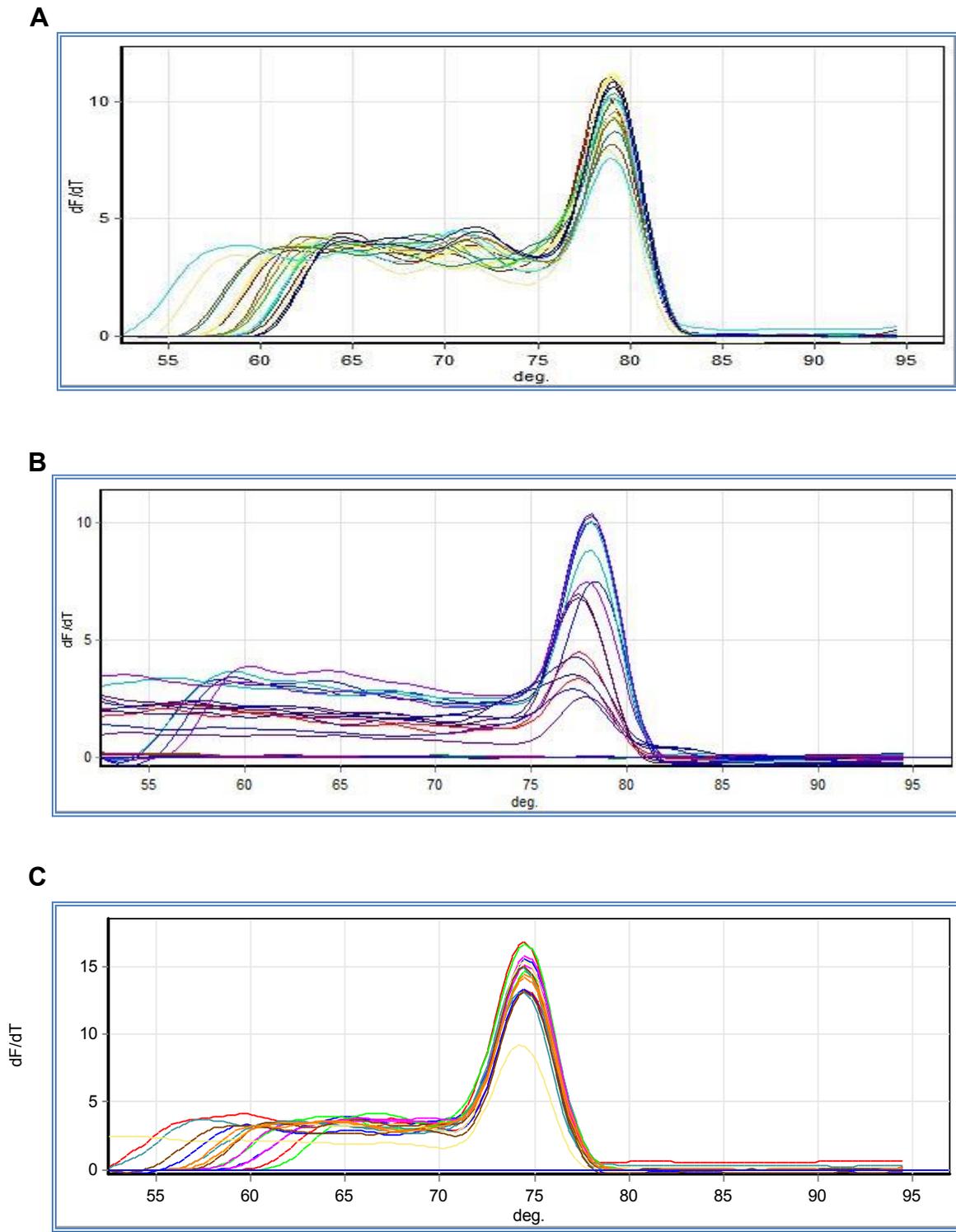


Figura 13. A) Curva de desnaturalización del producto amplificado de *GSTP1*. B) Curva de desnaturalización del producto amplificado de *RASSF1A*. C) Curva de desnaturalización del producto amplificado de *ACTB*. En todos los casos se observa un solo pico lo que indica que el producto amplificado y la incorporación de SYBR Green fueron específicos.

**TABLA 9. Niveles de metilación del promotor y de antígeno prostático específico en pacientes con HBP durante el seguimiento.**

NO. DE CONTROL GENETICA	MESES SEGUIMIENTO	%MP DE GSTP1 EN TP INICIAL	%MP DE GSTP1 EN SUR INICIAL	%MP DE GSTP1 EN SUR SEGUIMIENTO	%MP DE RASSF1A EN TP INICIAL	%MP DE RASSF1A EN SUR INICIAL	%MP DE RASSF1A EN SUR SEGUIMIENTO	APE INICIAL	APE SEGUIMIENTO
009/01	84	17.11	3.17	5.4	18.0	7.0	↓5.4	5.5	2.6
015/01	83	2.67	2.67	4.9	0.0	3.7	1.3	10.7	9.9
022/01	81	35.70	19.35	↑22.6	5.3	9.2	7.0	6.0	5.6
027/01	81	8.03	0.05	6.4	5.7	8.5	↑14.6	4.3	4.5
045/01	79	2.54	20.05	↓3.9	0.0	1.2	5.5	2.9	2.1
054/01	78	3.84	1.06	0.0	10.0	2.9	↑11.7	7.4	0.6
102/01	74	24.21	65.63	↓1.9	2.0	1.0	4.9	4.9	ND
105/01	72	0.42	6.55	1.9	5.0	3.6	6.7	5.5	3.8
106/01	72	46.77	11.2	↓7.2	15.5	3.2	2.7	6.1	1.5
109/01	71	3.3	0.03	0.0	18.0	1.3	2.6	7.3	6.8
173/01	62	9.8	3.1	3.1	2.8	0.0	4.1	3.2	2.4
205/01	53	2.3	0.14	2.6	1.7	1.8	0.6	6.7	0.8
218/01	48	11.13	0	↑12.8	19.3	0.0	2.1	4.3	2.0
227/01	48	65.86	0	↑55.1	17.9	28.6	↑62.3	9.5	9.0
mediana	73.0	8.9	2.9	4.4	5.5	3.1	5.1	5.8	2.5
promedio	70.4	16.7	9.5	9.1	8.7	5.1	9.4	6.0	4.0

%MP: Porcentaje de metilación del promotor, TP: Tejido prostático; SUR: Sedimento urinario; APE: Antígeno Prostático Específico

promedio de 9.1 y mediana 4.4. En un estudio previo realizado por nuestro grupo se determinó un punto de corte de positividad para el %MP de *GSTP1*  $\geq$  10, considerando una sensibilidad de 47.56%, una especificidad de 72.55% y una valor para la curva ROC de 0.67 (IC95% 0.60-0.75) (Sanchez B., 2014). Del total de pacientes, 4 tuvieron niveles de metilación de *GSTP1* superiores a 10% en SUR, a diferencia de 3 posterior al tratamiento (Tabla 9). Al comparar los niveles de metilación antes del tratamiento y después del tratamiento no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación de *GSTP1* de estos pacientes ( $p=0.59$ )

A todos los pacientes se les determinó el %MP de *RASSF1A*. Al momento del diagnóstico de HBP, la mediana en TP fue 5.5, y el promedio 8.7, y en SUR la mediana fue de 3.1 y el promedio de 5.1. Posterior al tratamiento, los niveles aumentaron en SUR, con una mediana de 5.1 y un promedio de 9.4. En un estudio previo realizado por nuestro grupo se determinó un punto de corte de positividad para el %MP de *RASSF1A*  $\geq$  10, considerando una sensibilidad de 39.02%, una especificidad de 74.1 y una valor para la curva ROC de 0.60 (IC95% 0.52-0.69) (Sánchez B., 2014) Del total de pacientes, uno tuvo niveles de metilación de *RASSF1A* superiores a 10% al momento del diagnóstico a diferencia de 3 pacientes cuyos niveles se elevaron durante el seguimiento (Tabla 9).

Aún así, al comparar en estos pacientes los niveles de metilación antes y después del tratamiento no hubo diferencias estadísticamente significativas en los niveles de metilación *RASSF1A*. ( $p=0.59$ ).

**TABLA 10. Análisis de regresión logística multivariado entre el %MP de GSTP1 en ADN de sur y otras variables confusoras**

Ordered logistic regression					Number of obs = 13
Log likelihood = 0					LR chi2(6) = 11.16
					Prob > chi2 = 0.0835
					Pseudo R2 = 1.0000
<b>GSTP1 SUR SEGUIMIENTO</b>	<b>Coef.</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>z</b>	<b>P&gt; z </b>	<b>[95% Conf. Interval]</b>
Meses de seguimiento	-2.496792	1.62e+07	-0.00	1.000	-3.17e+07 3.17e+07
Índice de masa corporal	10.14473	5.42e+07	0.00	1.000	1.06e+08 1.06e+08
APE al diagnóstico	-.7820072	1.042957	-0.75	0.453	-2.826165 1.262151
Edad al diagnóstico	-2.510362	3.89e+07	-0.00	1.000	-7.63e+07 7.63e+07
RASSF1A en seguimiento en SUR	15.31838	3.61e+08	0.00	1.000	-7.08e+08 7.08e+08
APE en seguimiento	10.93917	7.12e+07	0.00	1.000	-1.39e+08 1.39e+08

**Tabla 11. Análisis de regresión logística multivariado entre el %MP de RASSF1A en ADN de sedimento urinario y otras variables confusoras**

Ordered logistic regression					Number of obs = 13
Log likelihood = -3.6168073					LR chi2(6) = 6.81
					Prob > chi2 = 0.3386
					Pseudo R2 = 0.4850
<b>RASSF1A SUR SEGUIMIENTO</b>	<b>Coef.</b>	<b>Std. Err.</b>	<b>z</b>	<b>P&gt; z </b>	<b>[95% Conf. Interval]</b>
Meses de seguimiento	.3563516	.3212598	1.11	0.267	-.273306 .9860093
Índice de masa corporal	.862072	.6907067	1.25	0.212	-.4916883 2.215832
APE al diagnóstico	-.7820072	1.042957	-0.75	0.453	-2.826165 1.262151
Edad de diagnóstico	.2994466	.3306579	0.91	0.365	-.348631 .9475241
GSTP1 en seguimiento en SUR	13.33668	10.11414	1.32	0.187	-6.486682 33.16004
APE en seguimiento	-1.564854	1.339881	-1.17	0.243	-4.190972 1.061265

Un paciente (ID-227/01) de los 14 analizados mantuvo los niveles elevados APE, *GSTP1* y *RASSF1A* durante el seguimiento. Otro paciente (ID-22/01) mantuvo niveles elevados de APE y *GSTP1* antes y después del tratamiento. Esta positividad se observó en tejido prostático antes del tratamiento (Tabla 9). No se observó alguna asociación en cuanto los niveles de *GSTP1* ( $p=0.08$ ) y *RASSF1A* ( $p=0.33$ ) y a la exposición de factores como tabaquismo, IMC o antecedentes familiares de cáncer y la positividad de los marcadores moleculares (Tablas 10 y 11).

Los valores de APE si mostraron diferencias significativas al comparar los niveles antes y después del tratamiento ( $p=0.0183$ ). Antes del tratamiento 12 pacientes eran positivos y después del tratamiento solo 5 mantuvieron la positividad.

## **IX. DISCUSIÓN**

La determinación de niveles séricos de APE es ampliamente usada en la práctica clínica por su alta sensibilidad en el diagnóstico presuntivo de CaP, sin embargo este es un método diagnóstico poco preciso debido a que una gran proporción de pacientes con otras patologías benignas de la próstata pueden tener niveles en los mismos rangos observados en los pacientes con cáncer. La elevada proporción de falsos positivos, condiciona una cantidad considerable de biopsias prostáticas innecesarias, basadas en los valores de APE. Diversos factores pueden influir en la baja especificidad, uno de ellas es la etnicidad. Se ha observado que del 25% al 35% de los pacientes caucásicos e hispanos con biopsias positivas para CaP tienen niveles de APE  $<2\text{ng/ml}$ , mientras que del 70 al 80% de los pacientes afroamericanos con una biopsia positiva para este cáncer tienen el mismo valor de APE (Baden et al., 2011). Otros factores que condicionan el incremento del APE son la irritación, la prostatitis, la hiperplasia o el infarto prostático. El APE también puede aumentar conforme avanza la edad del hombre, incluso si la próstata es normal. También se ha descrito que la eyaculación puede provocar un aumento temporal del PSA en la sangre (Herschman et al., 1997).

Dada la baja especificidad del PSA, diversos grupos de investigación analizan nuevos biomarcadores biológicos de alta sensibilidad y especificidad que permitan contribuir al diagnóstico preciso, la detección temprana y el pronóstico confiable de diversas patologías prostáticas como la hiperplasia benigna y el cáncer. Cambios epigenéticos como la metilación aberrante en regiones promotoras de algunos genes han sido propuestos como marcadores candidato para diferenciar una

patología prostática maligna de una benigna (Kulis y Esteller 2010). Por ocurrir con elevada frecuencia en el ADN de células tumorales, la metilación aberrante o hipermetilación de promotores muestra una elevada sensibilidad para el diagnóstico de CaP y tienen una alta especificidad para identificar patologías no malignas en las cuales estas modificaciones no se observan u ocurren con menor frecuencia (Hessels et al., 2004). La metilación de promotores tiene ventajas importantes para su estudio al ser modificaciones epigenéticas estables en el ADN de casi cualquier tipo de tejido así como en el ADN de fluidos corporales sin requerir de condiciones especiales para su colecta y almacenamiento (Ellinger et al. 2008). Esto ha permitido la estandarización de ensayos de alta sensibilidad y especificidad en diversos tipos de muestras incluidos fluidos corporales como plasma y orina sin requerir de un proceso invasivo evitando complicar el estado de salud del paciente. Nuestro estudio es el primero que analiza la utilidad de la metilación de los promotores de *GSTP1* y *RASSF1A* en el seguimiento de la HBP en pacientes mexicanos mestizos. Los marcadores usados en este estudio fueron evaluados previamente en una muestra de la población mestiza mexicana. Para el nivel de metilación  $\geq 10\%$  de *GSTP1* y *RASSF1A* en ADN de SUR mostraron un valor predictivo positivo (VPP) individual de 58.2 y 55.2% respectivamente para diagnosticar CaP mientras que en conjunto el VPP fue de 69.8%. En este mismo grupo de pacientes el APE a un punto de corte de  $< 4\text{ng/ml}$  mostró un VPP de 44.6%. Para el nivel de metilación mencionado, los marcadores *GSTP1* y *RASSF1A* en ADN de SUR mostraron un valor predictivo negativo (VPN) individual de 63.3 y 60.3% respectivamente y de 67.8% en conjunto mientras que para el  $\text{APE} \geq 4\text{ng/ml}$  el VPN fue de 54.6.

Los resultados de nuestro estudio no mostraron diferencias estadísticamente significativas al comparar el % de la MP de *GSTP1* y *RASSF1A* presente en el ADN de SUR de los pacientes antes y después del tratamiento (Tabla 9). Si bien tres pacientes disminuyeron los niveles de metilación a <10% de *GSTP1*, uno mantuvo los niveles positivos y 2 más incrementaron a  $\geq 10\%$ . Para *RASSF1A* uno mantuvo la positividad y dos incrementaron a >10%. Estos cambios no tuvieron relación con el tiempo transcurrido de tratamiento, ni con la edad de diagnóstico ni entre marcadores durante el seguimiento (Tablas 10 y 11).

Después del tratamiento los valores de APE cambiaron de forma significativa ( $p=0.0183$ ) mostrando que el APE puede ser un marcador pronóstico útil en el seguimiento de pacientes posterior al tratamiento. Nuestros resultados muestran que la metilación de promotores en ADN de sedimento urinario, son marcadores con mejor VPN para distinguir a los individuos con HBP durante el diagnóstico inicial y para en el seguimiento después del tratamiento.

Sigue siendo una necesidad apremiante en la práctica clínica generar opciones para la detección oportuna de CaP, por lo que este conjunto de marcadores epigenéticos podría ser una herramienta diagnóstica dirigida a hombres en una edad donde el riesgo para este cáncer se incrementa, en aquellos que presentan alguna enfermedad prostática y en aquellos que requieren de un seguimiento posterior a la prostatectomía parcial o radical considerando que el paciente debe que continuar con un control para evitar una recidiva.

## **IX. CONCLUSIONES**

1. Este estudio demuestra que las alteraciones en la metilación son poco frecuentes en la HBP en esta muestra de la población mexicana.
2. Los resultados de este protocolo ofrecen la posibilidad de incluir en la práctica clínica el uso de dos marcadores moleculares con un mayor valor predictivo negativo que el antígeno prostático específico.
3. Es posible que el estudio de otros marcadores podrían incrementar la precisión diagnóstica y minimizar el número de biopsias de próstata necesarias para el diagnóstico
4. Es posible que en algún momento este tipo de marcadores podrían tener algún beneficio como marcadores pronóstico de respuesta terapéutica y contribuir además en el análisis pronóstico de progresión clínica de la enfermedad o para el estudio de la sobrevida del paciente.
5. Por otra parte los resultados de este estudio confirman la utilidad de las sedimento urinario como una opción en la búsqueda alteraciones epigenéticas por métodos no invasivos.
6. Los resultados de este estudio podrían contribuir a generar nuevas opciones para la prevención la detección temprana del CaP y atención oportuna así como para la promoción de salud por medio de campañas de sensibilización dirigidas a vencer la resistencia de los hombres a realizarse exámenes médicos periódicos no aceptados por una gran proporción de la población masculina ofreciéndoles alternativas de diagnóstico no invasivo y confiable.

## X. ANEXOS

### ANEXO 1

Sistema TNM de clasificación de Cáncer de Próstata y calificación histo-pronóstica de Gleason

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

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

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

Categoría N: Exploración física y técnicas de imagen.

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

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

La lateralidad no afecta a las categorías N.

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

Tx No se puede evaluar el tumor primario.

T0 No hay evidencia de tumor primario.

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

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

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

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

T2 Tumor limitado a la próstata.

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

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

T2c El tumor abarca ambos lóbulos.

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

T3a Extensión extracapsular unilateral o bilateral.

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

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

Nx No se pueden evaluar los ganglios linfáticos regionales

N0 No se demuestran metástasis ganglionares regionales

N1 Metástasis ganglios linfáticos regionales.

Mx No se pueden evaluar las metástasis a distancia.

M0 No hay metástasis a distancia.

M1 Metástasis a distancia

M1a Ganglio/s linfático/s no regionales.

M1b Hueso/s

M1c Otra/s localización/es

Clasificación anatomopatológica pTNM

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

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

Grado histopatológico

GX No se puede evaluar el grado de diferenciación

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

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

G3-4 Pobremente diferenciado/indiferenciado (marcada anaplasia) (Gleason 7-10)

## ANEXO 2

### Hoja de informe al paciente

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

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

### ANEXO 3

#### Carta de consentimiento informado.

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

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

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

-----

**Paciente**

-----

**Médico informante**

-----

Testigo

México, D.F. a \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ del año 200\_\_.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Alberti, C. (2010). Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: Few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 14(1), 31–41.
- Baden J, Adams S, Astacio T, Jones J, Markiewicz J, Painter J, et al. Predicting prostate biopsy result in men with prostate specific antigen 2.0 to 10.0 ng/ml using an investigational prostate cancer methylation assay. *Journal of Urology* 2011,186:2101-2106.
- Balistreri, C., Candore, G., Lio, D., & Carruba, G. (2014). Prostate cancer: from the pathophysiologic implications of some genetic risk factors to translation in personalized cancer treatments. *Cancer Gene Therapy*, 21(1), 2–11.  
<http://doi.org/10.1038/cgt.2013.77>
- Ball EMA, Risbridger GP. New perspectives on growth factor-steroid interaction in the prostate. *Cyt Growth Fact Rev* 2003; 14:5-16
- Bastian, P. J., J. Ellinger, A. Wellmann, N. Wernert, L. C. Heukamp, S. C. Muller, and A. von Ruecker. 2005. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clin Cancer Res* 11 (11):4097-106.
- Baylin, S. B., M. Esteller, M. R. Rountree, K. E. Bachman, K. Schuebel, and J. G. Herman. 2001. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10 (7):687-92.
- Bedford, M. T., & van Helden, P. D. (1987). Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate, 47(20), 5274–5276. Retrieved from  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2443238](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2443238)
- Bigelli, P. (n.d.). Score De Gleason En Pacientes Con Cancer Prostatico, 1–36.
- Brawley OW. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol.* 2012;30:195-200.

- Briganti, A., Capitanio, U., Suardi, N., Gallina, A., Salonia, A., Bianchi, M., ... Montorsi, F. (2009). Benign Prostatic Hyperplasia and Its Aetiologies. *European Urology, Supplements*, 8, 865–871. <http://doi.org/10.1016/j.eursup.2009.11.002>
- Bronner, C., T. Chataigneau, V. B. Schini-Kerth, and Y. Landry. 2007. The "Epigenetic Code Replication Machinery", ECREM: a promising drugable target of the epigenetic cell memory. *Curr Med Chem* 14 (25):2629-41.
- Brothman, A. R. (2002). Cytogenetics and molecular genetics of cancer of the prostate. *American Journal of Medical Genetics - Seminars in Medical Genetics*, 115, 150–156. <http://doi.org/10.1002/ajmg.10694>
- Carter, H., Piantadosi, S., & Isaacs, J. (1990). Clinical evidence for and implications of the multistep development of prostate cancer. *Journal of Urology*, (143), 742–746.
- Center MM, Jemal A, Lortet-Tieulent J, et al. International variation in prostate cancer incidence and mortality rates. *Eur Urol*. 2012;61:1079-92.
- Crawford, E. D. (2003). Epidemiology of prostate cancer. *Urology*, 62, 3–12. <http://doi.org/10.1016/j.urology.2003.10.013>
- Cremers, R. G., Galesloot, T. E., Aben, K. K., van Oort, I. M., Vasen, H. F., Vermeulen, S. H., & Kiemeneij, L. a. (2015). Known susceptibility SNPs for sporadic prostate cancer show a similar association with “hereditary” prostate cancer. *The Prostate*, 75(5), 474–483. <http://doi.org/10.1002/pros.22933>
- Delcuve, G. P., M. Rastegar, and J. R. Davie. 2009. Epigenetic control. *J Cell Physiol* 219 (2):243-50.
- Eaton CL. Aetiology and pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Curr Opin Urol* 2003; 13:7-10
- Ekman P. BPH epidemiology and risk factors. *Prostate Suppl*. 1989;2:23-31.
- Ellinger J, von Rucker A, Wernert N, Buttner R, Bastian PJ, Muller SC: [Prostate cancer research. Biomarkers as promising options for optimized diagnosis and treatment]. *Der Urologe Ausg A* 2008, 47(9):1190-1192.

Esteller, M. 2007. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum Mol Genet* 16 Spec No 1:R50-9.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer- Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>.

Frenk Mora Julio, Tapia Conyer Roberto, Uribe Esquivel Misael, V. M. O. (2001). *Programa de Acción: Cáncer de Próstata* (pp. 01–51).

Ge YZ, Xu LW, Jia RP, Xu Z, Feng YM, Wu R, Yu P, Zhao Y, Gui ZL, Tan SJ *et al*: The association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: evidence from 19 published studies. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* 2014, **35**(4):3881-3890.

Goessl, C., H. Krause, M. Muller, R. Heicappell, M. Schrader, J. Sachsinger, and K. Miller. 2000. Fluorescent methylation-specific polymerase chain reaction for DNA-based detection of prostate cancer in bodily fluids. *Cancer Res* 60 (21):5941-5.

Gonzalzo, M. L., C. P. Pavlovich, S. M. Lee, and W. G. Nelson. 2003. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clin Cancer Res* 9 (7):2673-7.

González SI, Salcedo JL, Martínez MA. Últimos avances en el diagnóstico de la hiperplasia benigna de próstata. *Acta Bioquim Clin Latinoam* 2005; 39:171-85.

Gronbaek, K., C. Hother, and P. A. Jones. 2007. Epigenetic changes in cancer. *APMIS* 115 (10):1039-59.

Hammarsten J, Hogstedt B. La hiperinsulinemia como factor de riesgo de la hiperplasia benigna de prostática. *Eur Urol* 2002 (ed esp); IX:28-35.

Harden, S. V., Z. Guo, J. I. Epstein, and D. Sidransky. 2003. Quantitative GSTP1 methylation clearly distinguishes benign prostatic tissue and limited prostate adenocarcinoma. *J Urol* 169 (3):1138-42.

Harden, S. V., H. Sanderson, S. N. Goodman, A. A. Partin, P. C. Walsh, J. I. Epstein, and D. Sidransky. 2003. Quantitative GSTP1 methylation and the

detection of prostate adenocarcinoma in sextant biopsies. *J Natl Cancer Inst* 95 (21):1634-7.

Heidenreich, a, Bolla, M., Joniau, S., Mason, M. D., Matveev, V., Mottet, N., ... Zattoni, F. (2010). Guía clínica sobre el cáncer de próstata. *European Association of Urology*, 196.

Heijnsdijk, E. a. M., Wever, E. M., Auvinen, A., Hugosson, J., Ciatto, S., Nelen, V., ... de Koning, H. J. (2012). Quality-of-Life Effects of Prostate-Specific Antigen Screening. *New England Journal of Medicine*, 367, 595–605.  
<http://doi.org/10.1056/NEJMoa1201637>

Herschman JD, Smith DS, Catalona WJ. Effect of ejaculation on serum total and free prostate-specific antigen concentrations. *Urology*. (1997). pp. 239–43

Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes JA: Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer. *Expert review of molecular diagnostics* 2004, 4(4):513-526

INEGI. *Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer*. Instituto Nacional de Geografía e Informática. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2780&e p=50>.

Izbicka, E., Davidson, K., Lawrence, R., MacDonald, J., & Von Hoff, D. (1999). 5,6-Dihydro-5-azacytidina (DHAC) affects estrogen sensitivity in estrogen-refractory human breast carcinoma cell lines. *Anticancer Research*, 19(2A), 1293–8.

Jarrard, D. F., Kinoshita, H., Shi, Y., Sandefur, C., Hoff, D., Meisner, L. F., ... Nassif, N. (1998). Methylation of the androgen receptor promoter CpG island is associated with loss of androgen receptor expression in prostate cancer cells. *Cancer Research*, 58(23), 5310–5314.

Jeronimo, C., H. Usadel, R. Henrique, J. Oliveira, C. Lopes, W. G. Nelson, and D. Sidransky. 2001. Quantitation of GSTP1 methylation in non-neoplastic prostatic tissue and organ-confined prostate adenocarcinoma. *J Natl Cancer Inst* 93 (22):1747-52.

- Juan, C., & Tejerizo, C. (2002). Programa De Actualización Continua. *Surgery*.
- Kampfrath T, Levinson SS. Brief critical review: Statistical assessment of biomarker performance. *Clin Chim Acta*. 2013 Apr 18;419:102-7.
- Kulis M, Esteller M: DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* 2010, 70:27-56.
- Li, L. C., Carroll, P. R., & Dahiya, R. (2005). Epigenetic changes in prostate cancer: Implication for diagnosis and treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(2), 103–115. <http://doi.org/10.1093/jnci/dji010>
- Liu, L., J. H. Yoon, R. Damman, and G. P. Pfeifer. 2002. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* 21 (44):6835-40.
- Loeb S, Catalona WJ. 2008. What to do with an abnormal PSA test. *Oncologist* 13(3):299–305
- Marcelli M, Cunnigam GR. Hormonal signaling in prostatic hyperplasia and neoplasia. *J Clin Endoc Metab* 1999; 84:3463-8.
- McKenzie P, Delahunt B, deVoss K, Ross B, Tran H, Sikaris K. 2011. Prostate specific antigen testing for the diagnosis of prostate cancer. *Pathology*. 43(5):403.
- Meiers, I., J. H. Shanks, and D. G. Bostwick. 2007. Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007. *Pathology* 39 (3):299-304.
- Mulero-Navarro, S., and M. Esteller. 2008. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 68 (1):1-11.
- Munoz-Pinedo, C., E. Gonzalez-Suarez, A. Portela, A. Gentilella, and M. Esteller. 2013. Exploiting tumor vulnerabilities: epigenetics, cancer metabolism and the mTOR pathway in the era of personalized medicine. *Cancer Res* 73 (14):4185-9.
- Pan, J., J. Chen, B. Zhang, X. Chen, B. Huang, J. Zhuang, C. Mo, and S. Qiu. 2013. Association between RASSF1A Promoter Methylation and Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One* 8 (9):e75283.

Platz EA, De Marzo AM, Giovannucci E: Failure to detect prostate cancer in the PSA era: comments on N Engl J Med 2003; 349: 215-224 and N Engl J Med 2003; 349: 335-342. *Cancer causes & control : CCC* 2004, 15(1):91-94.

Sánchez, B. (2014). *Uso de marcadores epigenéticos para diagnóstico de cáncer de próstata por métodos no invasivos*. Universidad Nacional Autónoma de México.

Sánchez-Barriga, J. J. (2013). Tendencias de mortalidad y años potenciales de vida perdidos por cáncer de próstata en los 32 estados y en las 7 regiones socioeconómicas de México en el periodo 2000-2010. *Gaceta Medica de Mexico*, 149, 576–585. <http://doi.org/10.1016/j.arbres.2014.03.020>

Schulz, W. a., & Hatina, J. (2006). Epigenetics of prostate cancer: Beyond DNA methylation. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10, 100–125. <http://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2006.tb00293.x>

Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2013;63:11-30.

SSA. Hiperplasia prostática 2009.

[http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/176\\_GPC\\_HIPERPLASIA\\_PROSTATICA/Gpc\\_hipertrofia\\_prostatica.pdf](http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/176_GPC_HIPERPLASIA_PROSTATICA/Gpc_hipertrofia_prostatica.pdf)

Suh, C. I., T. Shanafelt, D. J. May, K. R. Shroyer, J. B. Bobak, E. D. Crawford, G. J. Miller, N. Markham, and L. M. Glode. 2000. Comparison of telomerase activity and GSTP1 promoter methylation in ejaculate as potential screening tests for prostate cancer. *Mol Cell Probes* 14 (4):211-7.

Syed, N., A. Syed Sameer, A. Hamid, Z. A. Shah, D. Afroze, R. Rasool, and M. A. Siddiqi. 2010. Promoter methylation profile of GSTP1 and RASSF1A in benign hyperplasia and metastatic prostate cancer patients in a Kashmiri population. *Mol Med Rep* 3 (5):883-7.

Taira, A., G. Merrick, K. Wallner, and M. Dattoli. 2007. Reviving the acid phosphatase test for prostate cancer. *Oncology (Williston Park)* 21 (8):1003-10.

- Trock, B. J., M. J. Brotzman, L. A. Mangold, J. W. Bigley, J. I. Epstein, D. McLeod, E. A. Klein, J. S. Jones, S. Wang, T. McAskill, J. Mehrotra, B. Raghavan, and A. W. Partin. 2012. Evaluation of GSTP1 and APC methylation as indicators for repeat biopsy in a high-risk cohort of men with negative initial prostate biopsies. *BJU Int* 110 (1):56-62.
- Tunn S, Nass R, Ekkernkamp A, Schulze H, Krieg M. Evaluation of average life span of epithelial and stromal cells of human prostate by superoxide dismutase activity. *Prostate* 1989; 15:263-71. 26.
- Vallejos, J., Villaronga, a., Álvarez, C., Mariluis, C., Paganini, L., González, C., ... Dieguez, a. (2013). Actualización de la estadificación del cáncer de próstata. *Revista Argentina de Radiología*, 77(4), 301–305.  
<http://doi.org/10.7811/rarv77n4a10>
- Vlassov VV, Laktionov PP, Rykova EY: Extracellular nucleic acids. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 2007, 29(7):654-667.
- Ward, L. S. (2002). Entendendo o processo molecular da Tumorigênese, 46, 351–360.
- Whitesel, J. A., R. E. Donohue, J. H. Mani, S. Mohr, D. J. Scanavino, R. R. Augspurgen, R. J.
- Biber, H. E. Fauver, J. N. Wettlaufer, and R. R. Pfister. 1984. Acid phosphatase: its influence on the management of carcinoma of the prostate. *J Urol* 131 (1):70-2.
- Wu, T., E. Giovannucci, J. Welge, P. Mallick, W. Y. Tang, and S. M. Ho. 2011. Measurement of GSTP1 promoter methylation in body fluids may complement PSA screening: a meta-analysis. *Br J Cancer* 105 (1):65-73.