



**FACULTAD DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS MÉDICAS**

**“MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS ASOCIADAS  
AL DIAGNÓSTICO PRECOZ, SEGUIMIENTO,  
TRATAMIENTO Y PREVENCIÓN DEL CÁNCER DE  
PRÓSTATA”**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,  
mención en Biología Celular y Molecular**

**PAMELA FERNANDA CUEVAS CATALÁN**

**Director: Eva Madrid Aris MD PhD**

**Fecha: 02 de Marzo de 2016**

***"A ti... mi guía, mi protector, mi ejemplo de vida.  
Gracias infinitas a ti y a tu esfuerzo para que yo cumpliera mis metas.  
Gracias por tu eterno amor ..... Gracias Papito"***

## **Agradecimientos**

*A mi profesora guía Dr. Eva Madrid Aris, por permitirme ser parte de este maravilloso proyecto, por su constante ayuda, por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento y por creer siempre en mí.*

*A los profesores del programa de Magister: Dr. Mario Párraga, Dr. Joan Villena y Dr. Sebastián San Martín, por su gran aporte y enriquecimiento de mi formación profesional, pero en especial por su apoyo y su ayuda cuando más lo necesite.*

*A los profesores de la comisión evaluadora: Dr. Nelson Osses, Dr. Pedro Acuña y Dr. Pablo Muñoz, por sus aportes y recomendaciones para mejorar y enriquecer mi tesis.*

*A mis compañeros y amigos del programa: Daniela Smith, Nieves Navarro, Isabel Gómez, Verónica Gutiérrez, Sebastián Triviño, Carolina Rejas, por el apoyo incondicional, por los consejos, por las largas noches de estudio y por regalarme tan linda amistad.*

*A la familia Valdés Catalán, mis tíos y primos, por estar siempre apoyándome, reconfortándome y cuidándome.*

*A mi madre y a su enorme fuerza, su apoyo, sus infinitas caricias y su abrazo reconfortante.*

*A mis hermanos Nicolás y Pablo, por nuestra unión eterna, nuestras risas y nuestras locuras.*

*A mi amor, mi apoyo, mi compañero, por estar siempre conmigo, apoyándome, alentándome y entregándome su amor de manera incondicional.*

*A mi hijo, mi cholito, mi motor, mi luz, mi todo, gracias por estar aquí...Conmigo.*

## **ABREVIATURAS**

**AA:** AfroAmericano

**ADT-PCa:** Cáncer de Próstata con Terapia de Privación de Andrógenos

**ADN:** Ácido Desoxiribonucleico

**APC:** Proteína poliposis adenomatosa coli

**AR:** Recetor de Andrógeno

**ARN:** Ácido Ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**AS-PCa:** Cáncer de Próstata estimulado por Andrógenos

**AZ:** Zona Anterior de la próstata

**BCR:** Recurrencia Bioquímica

**CA:** Caucásico Americano

**CDKI:** Inhibidor de Quinasa Dependiente de Ciclina

**CRPC:** Cáncer de Próstata Resistente a la Castración

**CZ:** Zona Central de la próstata

**DAPK:** Proteína de la Muerte Asociada a Quinasa

**DCSC-3:** Desmocolina 3

**DNMT:** ADN MetilTransferasa

**DRE:** Examen Digital Rectal

**DUBs:** Enzimas Deubiquitinasas

**EDNRB:** Receptor de Endotelina B

**EFEMP1:** Gen que codifica para la proteína de matriz extracelular Fibulina 3

**ESR:** Receptor de Estrógeno

**GS:** Puntuación de Gleason

**GSTP1:** Glutation-S-Tranferasa pi 1

**HAT:** Acetiltransferasas de Histona

**HBP:** Hiperplasia benigna Prostática

**HDAC:** Desacetilasas de Histona

**HDM:** Desmetilasas de Histona

**HIC1:** Supresor Tumoral Hipermetilado en Cáncer 1

**HGPIN:** Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado

**HMT:** Metiltransferasas de Histona

**HOX:** Factor de Transcripción Homeobox

**HSP-27:** Proteína de Choque Térmico 27

**IHC:** Inmunohistoquímica

**KLKs:** Kalicreinas

**LDHB:** Lactato Deshidrogenasa B1

**LPL:** Lipoprotein Lipasa

**LUTs:** Síntomas del Tracto Urinario Inferior

**MDRI:** Receptor de Multiresistencia a Drogas

**mGSTP1:** Metilación de Glutation-S-Tranferasa pi 1

**miARN:** microARN

**MTG1:** Metaloteína G1

**PCa:** Cáncer de Próstata

**PCDH:** Protocadherina

**PIA:** Atrofia Inflamatoria Proliferativa

**PIN:** Neoplasia Intraepitelial Prostática

**PMEPA1:** Proteína Transmembrana de Próstata Inducida por Andrógeno

**PSA:** Antígeno Prostático Específico

**PR:** Prostatectomía Radical

**PTGS2:** Prostaglandina Endoperoxido Sintasa-2

**PZ:** Zona Periférica de la próstata

**RAR:** Receptor de Ácido Retinoico

**RASSF1A:** Proteína de la Familia Asociada a dominio Ras Isoforma A

**RIZ1:** Metil transferasa específica para residuo lisina 9 en la histona 3

**TIG1:** Gen Inducido por Tarazoteno 1

**TIMP:** Inhibidor Tisular de Metaloproteinasas

**TMSC1:** Objetivo de Silenciamiento Inducido por Metilación

**TNFRSF10C:** Receptor de Factor de Necrosis tumoral 10C

**TSG:** Gen Supresor de Tumores

**TURP:** Rescción Trasnurectal

**TZ:** Zona Transición de la próstata

**UCHL-1:** Ubiquitina C-terminal L1

## Índice de contenido

<b>1.RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.INTRODUCCION</b> .....	<b>2</b>
2.1 Anatomía de la glándula prostática .....	2
2.2 Lesiones preneoplásicas de la próstata .....	4
2.3 Hiperplasia benigna prostática .....	5
2.4 Cáncer de próstata .....	6
2.5 Incidencia y mortalidad del cáncer de próstata .....	7
2.6 Factores de riesgo demográficos del cáncer de próstata.....	9
2.6.1 <i>Edad</i> .....	9
2.6.2 <i>Raza/etnia</i> .....	9
2.6.3 <i>Historia familiar</i> .....	9
2.7 Antígeno específico prostático .....	10
2.8 Examen digital rectal .....	11
2.9 Puntuación de Gleason .....	12
2.10 Estadificación del cáncer de próstata .....	14
2.11 Biomarcadores y cáncer de próstata .....	17
2.12 Epigenética y cáncer de próstata .....	20
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
<b>4. METODOLOGÍA</b> .....	<b>22</b>
<b>5. REVISIÓN DE LA LITERATURA</b> .....	<b>25</b>
5.1 Modificaciones epigenéticas en Cáncer de Próstata .....	25
5.2 MicroARNs .....	27
5.3 MicroARNs en Cáncer de Próstata .....	29
5.4 Modificación de Histona .....	33
5.5 Modificación de Histona en Cáncer de Próstata .....	35
5.6 Metilación del ADN .....	37
5.7 Hipometilación en Cáncer de Próstata .....	39
5.8 Hipermetilación en Cáncer de Próstata .....	42
5.9 Rutas afectadas por hipermetilación en Cáncer de Próstata .....	43
5.9.1 Reparación del daño del ADN .....	43
5.9.1.1 GSTP1.....	44

5.9.1.2 HSPB1 .....	47
5.9.1.3 UCHL-1 .....	47
5.9.1.4 Nrf2.....	48
5.9.2 Control del ciclo celular .....	52
5.9.2.1 RASSF1A .....	52
5.9.2.2 PITX2 .....	53
5.9.2.3 Stratifina (14-3-3 $\sigma$ ) .....	54
5.9.2.4 CDKIs .....	55
5.9.2.5 RIZ1 .....	56
5.9.2.6 PTGS2 ... ..	57
5.9.2.7 HIC1 .....	58
5.9.3 Apoptosis .....	60
5.9.3.1 TMSC1/ASC .....	60
5.9.3.2 HRK .....	61
5.9.3.3 SLC18A2 .....	62
5.9.3.4 TNFRSF10C .....	62
5.9.3.5 DAPK .....	63
5.9.3.6 PTPIP51 ... ..	63
5.9.4 Invasi3n/Met3stasis .....	65
5.9.4.1 APC .....	65
5.9.4.2 HOXD3 ... ..	66
5.9.4.3 EFEMP1 .....	67
5.9.4.4 CD44 .....	68
5.9.4.5 Inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs) .....	68
5.9.4.6 PCDH (protocadherinas) ... ..	69
5.9.4.7 Epha7 ... ..	71
5.9.4.8 FYN .....	72
5.9.4.9 MCAM .....	73
5.9.4.10 DCS-3 .....	73
5.9.4.11 Sprouty ... ..	74
5.9.4.12 PDLIM4 .....	76
5.9.4.13 AKAP12 ... ..	76

5.9.4.14 KLK .....	77
5.9.5 Respuesta hormonal/Metabolismo .....	80
5.9.5.1 AR .....	80
5.9.5.2 ESR ... ..	81
5.9.5.3 ESR-1 .....	81
5.9.5.4 RAR $\beta$ 2 .....	82
5.9.5.5 PMEPA1 ... ..	83
5.9.5.6 EDNRB ... ..	84
5.9.5.7 MDRI .....	84
5.9.5.8 ABHD9 .....	86
5.9.5.9 Chr3-EST ... ..	86
5.9.5.10 Lactato Deshidrogenasa B1 ... ..	86
5.9.5.11 LPL ... ..	87
5.9.5.12 SOCS-3 .....	88
5.9.5.13 TIG1 .....	88
5.9.5.14 MTG1 .....	89
5.10 Relación entre la hipermetilación y el desarrollo del Cáncer de Próstata .....	91
5.11 Marcadores epigenéticos y su potencial utilidad en el diagnóstico de Cáncer de Próstata .....	92
<b>6. CONCLUSIÓN .....</b>	<b>106</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>108</b>

## **1. RESUMEN**

El cáncer de próstata es la segunda causa de muerte en hombres en Chile y el mundo. En Chile el cáncer de próstata es una prioridad de salud pública, debido al franco aumento en la mortalidad a través de los años.

Diversos factores pueden aumentar la probabilidad de padecer esta patología, entre estos factores se encuentra la edad, la raza, la historia familiar, la dieta y la exposición a carcinógenos.

En la actualidad se utilizan distintos métodos para detección temprana del cáncer de próstata, estos son el examen digital rectal, el análisis inmunohistoquímico de la puntuación de Gleason y la medición del antígeno prostático específico (PSA) en sangre. Dadas las limitaciones de especificidad que presentan estos métodos, es que surge la necesidad de crear un set de marcadores moleculares más específicos que permitan la detección temprana, tratamiento, seguimiento y pronóstico de esta patología.

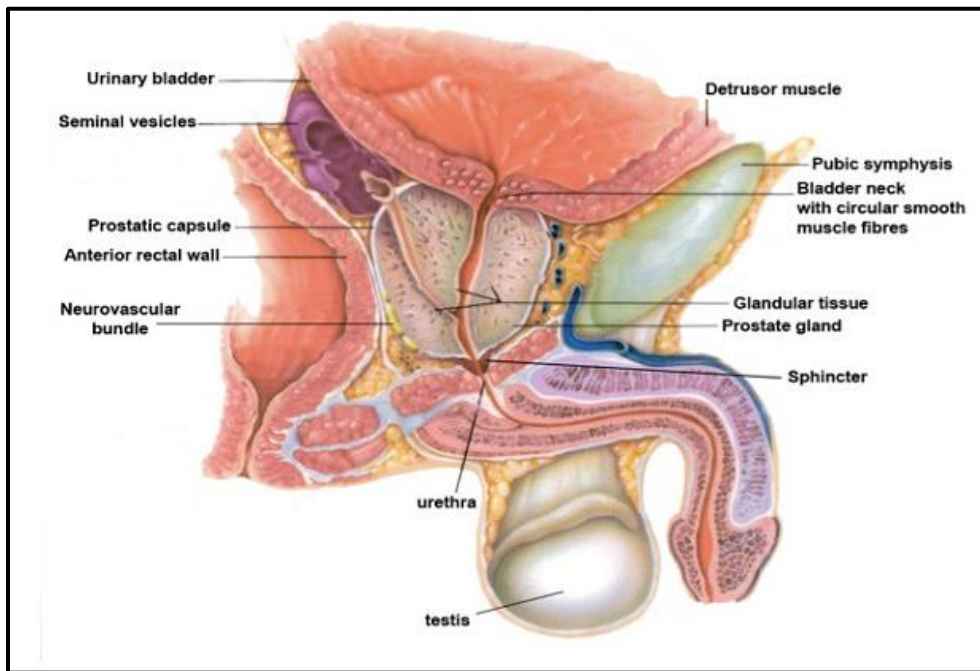
Se ha descrito, mediante estudios recientes, que la hipermetilación del ADN, en la región promotora de los genes supresores de tumores, es un mecanismo de silenciamiento de genes en diversos cánceres, lo cual contribuye al desarrollo de la carcinogénesis.

Dados estos antecedentes la presente revisión bibliográfica tiene como objetivo realizar una revisión de la literatura que permita descubrir los marcadores epigenéticos, asociados a la hipermetilación del ADN, descritos en cáncer de próstata y el potencial uso de estos como marcadores de detección temprana, tratamiento, seguimiento y pronóstico de esta patología.

## **2. INTRODUCCIÓN**

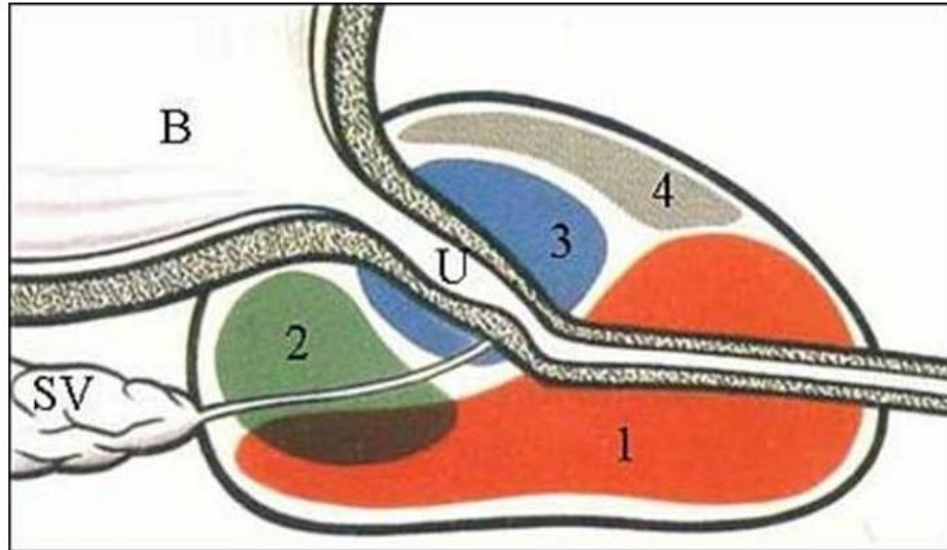
### 2.1 Anatomía de la glándula prostática

La próstata es una estructura glandular accesoria del sistema reproductivo masculino del tamaño de una nuez, cuya principal función es la secreción de fluido ligeramente alcalino que forma parte del fluido seminal para proporcionar apoyo nutricional al semen. Se ubica por detrás de la parte menor de la sínfisis del pubis, anterior al recto e inferior a la vejiga urinaria en el compartimiento subperitoneal entre el diafragma pélvico y la cavidad peritoneal (Ver Figura 1). La próstata se divide en cuatro regiones: la zona céntrica (CZ), zona de transición (TZ), zona periférica (PZ) y zona anterior (estroma fibromuscular anterior (AZ).) La próstata es apoyada por un estroma compuesto por células del músculo liso, fibroblastos, linfocitos y tejido neurovascular en una matriz extracelular de soporte. El epitelio prostático se compone de tres tipos de células principales: células secretoras, basales y neuroendocrinas. Las células secretoras de la glándula son cilíndricas altas, bien diferenciadas y conectadas entre sí por moléculas de adhesión celular y con su base fija a la membrana basal a través de receptores de integrinas. Participan en la extrusión mecánica del líquido eyaculado bajo estimulación nerviosa, son responsables de las secreciones fisiológicas de la glándula prostática. Las células basales más pequeñas que las anteriores, menos abundantes, diferenciadas y se fijan sobre la membrana basal. Se cree que dan origen a las células epiteliales secretoras, su ausencia es un marcador útil de cáncer de próstata. Las células neuroendocrinas se encuentran dispersas en la glándula, se ubican entre el epitelio secretor y en los conductos de todas las porciones de la glándula, así como en la mucosa uretral prostática y se cree están involucradas en la regulación de la actividad secretora prostática y el crecimiento [1-6].



**Figura 1:** Ubicación y relación de la glándula prostática dentro de la estructura pélvica [3].

La zona periférica (PZ) es la mayor de las zonas, comprende aproximadamente 70% del tejido glandular. Se extiende desde la base hasta el ápice a lo largo de la superficie posterior y rodea la uretra distal. En esta zona, carcinomas, prostatitis crónica, atrofia post-inflamatoria son relativamente más comunes que en otras zonas. La zona central (CZ) se encuentra en la base de la próstata entre las zonas periféricas y de transición y representa aproximadamente el 25% del tejido glandular. La zona de transición (TZ) forma solo el 5% del tejido glandular, se compone de dos pequeños lóbulos de tejido glandular que rodean la uretra prostática. Esta es la porción del tejido que se agranda debido a la Hiperplasia benigna prostática (HBP), hasta un 80% de los hombres de entre 70 y 80 años tienen evidencia histológica de HBP. La zona anterior (estroma fibromuscular anterior (AZ)) forma la convexidad de la superficie externa anterior y esta desprovista de tejido glandular, en su lugar se compone de fibras y musculo liso (Ver Figura 2) [1-3,5].



**Figura 2: Modelo anatómico de la próstata** en donde se distinguen cuatro zonas anatómicamente distintas: 1- Zona Periférica (PZ), 2 -Zona Central (CZ), 3- Zona Transición (TZ), 4- Zona Anterior (AZ), U- Uretra, B-Vejiga y SV- Vesícula seminal [5].

## 2.2 Lesiones preneoplásicas de la próstata

Las enfermedades asociadas a la próstata, son enfermedades crónicas que necesitan un largo periodo de desarrollo [7]. En la actualidad la neoplasia intraepitelial prostática de alto grado (HGPIN) se considera como el precursor más probable de cáncer de próstata basándose en evidencias patológicas, epidemiológicas y citogenéticas. Existe evidencia que sugiere que la mayoría de las alteraciones que se producen en la progresión a cáncer de próstata ocurren en la transición del epitelio benigno a HGPIN en lugar de desde HGPIN a cáncer de próstata. Las lesiones HGPIN pueden subdividirse en al menos cuatro diferentes patrones arquitectónicos, que no tienen importancia pronóstica, sin embargo, el volumen de HGPIN tiene una correlación positiva con el estadio del tumor y la puntuación de Gleason, así como el riesgo de un subsecuente cáncer. Varios estudios clínicos sugieren que la neoplasia intraepitelial prostática (PIN) precede el carcinoma por 10 años o más, en donde la PIN de bajo grado emerge en la tercera década de los hombres [2,7].

Una lesión precursora, posiblemente antes de PIN, es la atrofia inflamatoria proliferativa (PIA). PIA se define como focos discretos de epitelio glandular proliferativo con la apariencia morfológica de una atrofia sencilla o una hiperplasia post atrófica que ocurre en asociación con la inflamación. La evidencia que vincula a PIA con el cáncer

de próstata es sugerente, aunque no es tan convincente como las lesiones HGPIN. Se propone que PIA es una respuesta proliferativa común a los daños ambientales, tales como la inflamación y el estrés oxidativo en hombres de edad avanzada, posteriormente lesiones HGPIN y el subsecuente cáncer de próstata, se cree surgen como consecuencia de daños al genoma. Aunque tanto observaciones etiológicas y patológicas sugieren la participación de PIA en la carcinogénesis prostática, pero aún se necesitan más estudios para ratificarlo [2].

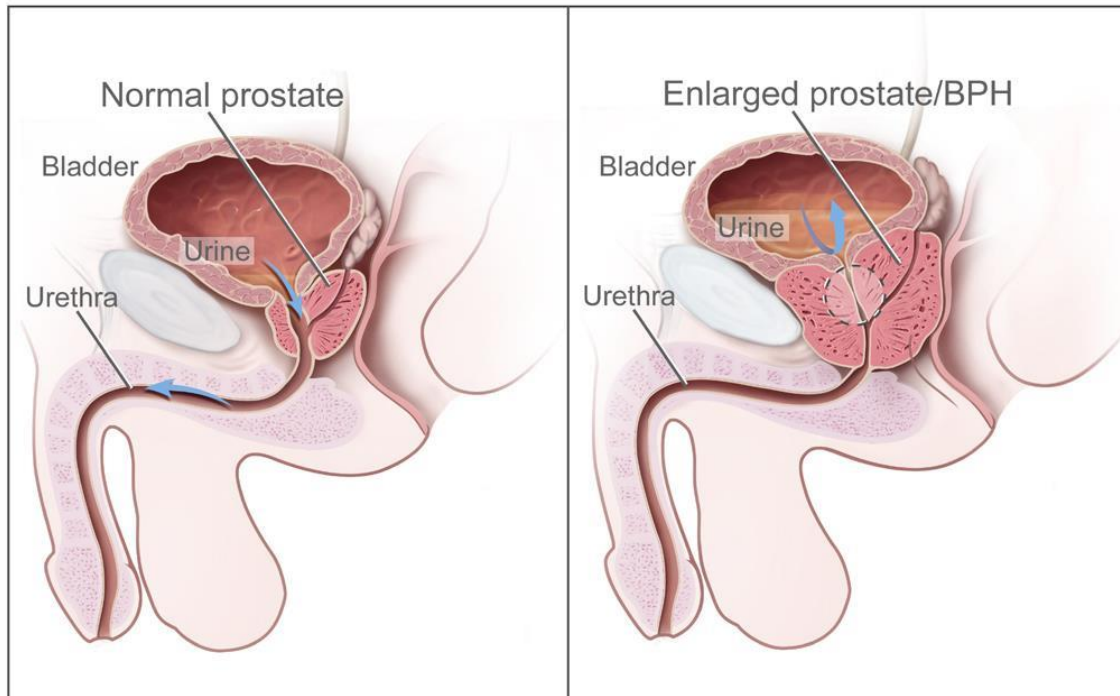
### 2.3 Hiperplasia benigna prostática (HBP)

La hiperplasia benigna prostática es una condición neoplásica de la glándula prostática progresiva relacionada con la edad, clínicamente se caracteriza por síntomas del tracto urinario inferior o *low urinary tract symptoms* (LUTS). HBP representa un considerable problema de salud en hombres de edad avanzada, debido al efecto negativo que tiene sobre la calidad de vida de quienes la padecen [5].

Se caracteriza por un aumento del tamaño de la glándula que ocasiona grados variables de obstrucción durante la micción (Ver Figura 3). Es una de las enfermedades que con mayor frecuencia se presentan en hombres adultos de edad avanzada. Constituye la segunda causa de ingreso para intervención quirúrgica y la primera causa de consulta en los servicios de urología [6].

El desarrollo de la HBP comienza alrededor de la cuarta década de la vida en la mayoría de los hombres, con un fenómeno focal de origen estromal. A partir de la quinta década se produce un incremento global y rápido del volumen debido a un aumento de las células del tejido firomuscular y glandular, tanto en la zona periuretral como transicional [6].

Los mecanismos genéticos, hormonales e inflamatorios han demostrado ser mecanismos fisiopatológicos comunes para el desarrollo de HBP y cáncer de próstata, vinculando de esta manera ambas enfermedades [8].



**Figura 3:** Glándula normal y aumentada de tamaño por hiperplasia benigna prostática [9].

#### 2.4 Cáncer de Próstata (PCa)

El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer más común entre los hombres en la mayoría de las poblaciones occidentales, excluyendo el cáncer de piel. Es la segunda causa de las muertes por cáncer en hombres. No es invariablemente letal, sin embargo, es una enfermedad heterogénea que va desde asintomática a una malignidad sistémica rápidamente fatal. Esta característica causa problemas únicos para el cáncer de próstata, por ejemplo cáncer de bajo grado diagnosticado tarde en la vida puede tener ningún impacto en la calidad o la duración de la vida, en cambio un hombre joven con una lesión de alto grado puede tener la enfermedad avanzada y morir dentro de un periodo muy corto. La distinción biológica de estos pacientes debe tener una alta prioridad en la continuación de la investigación del PCa [3,10-12].

La prevalencia de cáncer de próstata es tan alta que podría ser considerado un fenómeno relacionado con la edad. Estudios previos realizados en hombres del mediterráneo se describió que el 33% de los hombres en su octava década tenían evidencia de cáncer de próstata en necropsia y habían muerto con la enfermedad, pero

no de ésta. Los datos de los estudios post mortem de Estados Unidos mostraron una prevalencia del cáncer de próstata en una razón aún mayor [11].

A pesar de la alta morbilidad del cáncer de próstata, su etiología sigue siendo poco clara, y las únicas asociaciones reportadas han sido con algunos factores que se aumentan con la edad, raza y antecedentes familiares de cáncer de próstata. Muchos factores de riesgo putativos, incluyendo hormonas, factores de la dieta, la obesidad, la inactividad física, la ocupación, la vasectomía, el tabaquismo, factores sexuales, y la susceptibilidad genética, han sido implicados, pero la evidencia epidemiológica no es concluyente [10].

El diagnóstico precoz del cáncer de próstata mediante cribado crea dificultades en la previsibilidad de los resultados de pacientes individuales. La dificultad está en distinguir clínicamente entre los cánceres de próstata indolentes, que serán asintomáticos y cánceres de próstata agresivos con el potencial para matar al paciente. La clasificación de Gleason en base a la examinación histopatológica es hoy considerado un indicador pronóstico hasta la fecha del cáncer de próstata; sin embargo, existe mucha variación inter-observador, y la clasificación de las biopsias puede no correlacionarse con el espécimen de prostatectomía por causa de problemas de muestreo y en casos de cáncer de próstata que siendo morfológicamente idénticos pueden comportarse de manera diferente [11,13].

## 2.5 Incidencia y mortalidad

### Incidencia

El cáncer de próstata parece impactar de manera diferente a las poblaciones del mundo, con diversas incidencias y tasas de mortalidad. La incidencia relacionada a la edad varía considerablemente en todo el mundo. Las razones van desde los afroamericanos que tienen la incidencia más alta (184,5 por 100.000 personas al año), seguidos de los estadounidenses de raza blanca (107,8 por 100.000 personas al año). La razón en el Caribe y Brasil (92-96 por 100.000 personas al año), lugares en donde hay una gran población con ascendencia africana, siendo comparables con las tasas de los caucásicos americanos. Por el contrario en América Central y otras partes del sur las tasas son mucho más bajas (28 a 42 por 100.000 personas). En Europa las tasas varían casi 7 veces (15-100 por 100.000 personas). Asia es el continente con

menor tasa de incidencia, pero al igual que Europa también tiene una variación considerable en incidencia (3,7-47 por 100.000 personas al año). Las diferencias en las incidencias en todo el mundo radican principalmente en las técnicas de cribado para la detección del cáncer de próstata [10,14].

Solo uno de cada seis hombres diagnosticado con cáncer de próstata eventualmente morirá de este. Las tasas de mortalidad a nivel mundial reflejan la de incidencia, siguen siendo más altas en países del oeste que en los países de bajo riesgo, los países asiáticos. Curiosamente las tasas de mortalidad más altas (30,3 a 47,9 por 100.000 personas al año) se observaron en naciones del Caribe de Barbados, Bahamas y Trinidad y Tobago donde hay gran población de hombres con ascendencia africana. Luego sigue la tasas de mortalidad de los países escandinavos y parte del norte de Europa, por sobre los EE.UU. (18,7-23,6 frente al 14 por 100.000 personas al año) y la tasa más baja se encuentra en los países asiáticos (1,6 a 4,4 por 100.000 personas al año) [10].

La mortalidad en Chile ha ido en aumento desde 15,4/100.000 hombres 1997 a 23,7/100.000 hombres en 2012 (DEIS), constituyendo la 3ª causa de muerte por cáncer en los hombres (responsable de 2.045 muertes anuales en el año 2012) (DEIS). La incidencia de la enfermedad es desconocida, pero se ha estimado entre 55 y 57 por 100.000 en los últimos años. Por su parte, se ha reportado una prevalencia de 9,2 por 1.000 en hombres entre 40 y 593 [13].

Los patrones de incidencia y mortalidad en todo el mundo proporcionan interesantes conclusiones. El exceso de riesgo en PCa en las naciones del oeste sugiere que los factores asociados con la occidentalización, tales como la dieta y la obesidad, puede estar asociada a su etiología. El gran impacto del cáncer de próstata sobre los afroamericanos y los hombres del Caribe sugiere que los factores asociados a la ascendencia africana también podrían jugar un papel en la etiología. Si bien no se sabe si los factores de riesgo que explican los patrones observados son el medio ambiente, estilo de vida o la genética, es probable que una compleja interacción de estos factores se asocie con el desarrollo de cáncer de próstata [10].

## 2.6 Factores de riesgo demográficos

### 2.6.1 Edad

Sobre el 80% de los tumores prostáticos son diagnosticados en hombres sobre los 65 años y la incidencia de cáncer de próstata se incrementa exponencialmente con la edad avanzada, un aumento que es más rápido que cualquier otra malignidad. La incidencia de cáncer de próstata, en Estados Unidos, de hombres bajo los 65 años versus hombres sobre los 65 años es de 56,8 y 974,7 por 100.000 personas al año respectivamente [10,12].

El cáncer de próstata afecta a 1 de cada 44 hombres de 40 a 59 años, 1 de cada 7 varones de 60 a 79 años y más de la mitad de los hombres mayores de 80 años de edad. Estas estadísticas demuestran claramente que la susceptibilidad de la próstata al cáncer está muy influenciada por la edad y que el cáncer de próstata es una aflicción común de los ancianos [15].

### 2.6.2 Raza/etnia

En comparación con todos los otros tipos de cáncer, el cáncer de próstata tiene la mayor disparidad racial en la incidencia y la mortalidad. Los afroamericanos tienen las tasas de incidencia más altas dentro de las distintas poblaciones, aproximadamente un 60% más que las de la población asiática, que presentan las tasa de incidencia más bajas del mundo [10, 12]. En general la incidencia es mayor en afroamericanos, seguido de los caucásicos, hispanos y asiáticos. Comparado con los caucásicos, los afroamericanos tienen 1,7 veces más alta incidencia de cáncer de próstata, el doble de riesgo de desarrollar cáncer de próstata en estadio avanzado, y una de dos a tres veces una mayor tasa de mortalidad. Los afroamericanos tienen más probabilidades de tener un historial familiar de cáncer de próstata y son más joven en el momento del diagnóstico [16].

### 2.6.3 Historia Familiar

La historia familiar es un factor de riesgo bien establecido para cáncer de próstata. Aproximadamente el 5% de los casos de cáncer de próstata se cree tienen un componente familiar. Este número salta a 40% cuando se consideran los pacientes que desarrollan la enfermedad antes de los 55 años, una persona que tiene un padre o

hermano diagnosticado con cáncer de próstata antes de los 60 años de edad tiene un 2,5 veces mayor probabilidad de desarrollar la enfermedad y, en promedio, será diagnosticada 6 años antes de lo que los pacientes sin antecedentes familiares de cáncer de próstata. Desafortunadamente, a diferencia cáncer de mama hereditario y el cáncer colorrectal, no han sido identificados loci que están claramente asociados con cáncer de próstata familiar [16].

El diagnóstico precoz del cáncer de próstata es importante, ya que permite dilucidar un tratamiento temprano para mejorar la supervivencia a largo plazo. En la actualidad los niveles séricos del Antígeno específico prostático (PSA) y el Examen digital rectal (DRE) son los métodos comúnmente utilizados para la detección de PCa. Niveles de PSA alto y alteraciones en el DRE, son indicadores para una biopsia prostática. Una vez realizada la biopsia prostática, el tejido es analizado mediante el examen histopatológico lo que de confirmar la presencia de un Adenocarcinoma, requiere la aplicación de la escala de Gleason. Este es el factor individual mas potente existente para el pronostico del PCa [4].

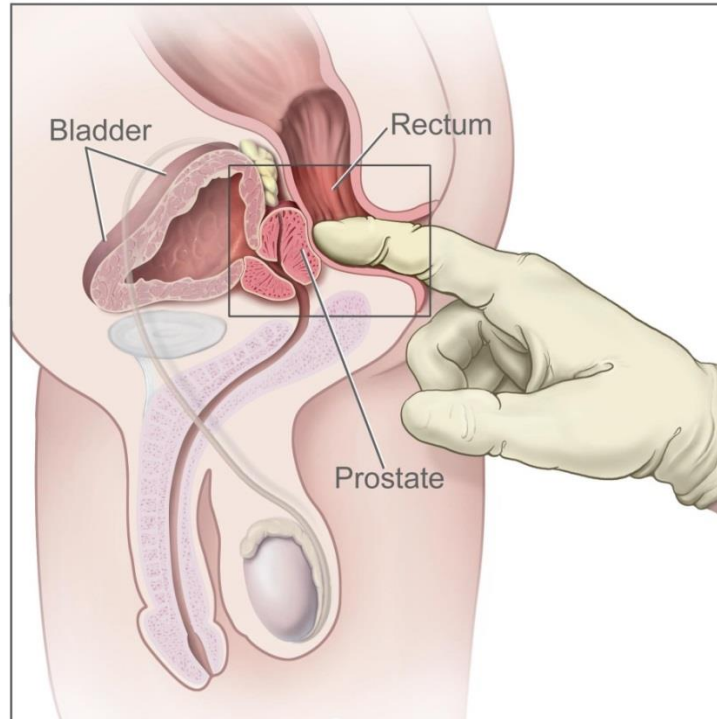
## 2.7. Antígeno específico prostático (PSA)

El nivel de antígeno específico prostático (PSA) es el examen comúnmente utilizado para detectar el PCa. PSA es una glicoproteína secretada por las células epiteliales de la próstata, cuyos niveles se ven aumentados tanto en condiciones benignas como malignas de la próstata y es utilizado tanto para la detección del cáncer de próstata, evaluación del progreso de la enfermedad como para vigilar la respuesta al tratamiento. De las formas moleculares de PSA, especialmente el PSA libre parece ser útil para la detección de cáncer de próstata en los hombres cuya concentración total de PSA cae dentro del rango de 4 a 10 ng/ml [12]. Los niveles de PSA total sérico es considerado de gran utilidad para la detección de cáncer prostático, sin embargo se ha descrito que la prueba de PSA no es útil en la mayoría de los hombres con un nivel sérico por bajo de los 10 ng/ml y a los cuales no se les haya detectado cáncer próstata a través de un biopsia, debido a que el desarrollo de PCa se puede dar incluso a niveles de PSA sérico muy bajos [3]. En el proyecto de Tirol, Pelzer y cols (2005) se encontró que en hombres jóvenes era posible detectar cáncer de próstata con niveles de PSA < 4 ng/ml [3,12,17,18].

Cerca del 25% de hombres con niveles séricos de PSA dentro del rango normal pueden presentar PCa y niveles séricos de PSA menores a 20 ng/ml que no hacen distinción entre la presencia de PCa y patologías benignas de la próstata. Esto conduce a biopsias prostáticas innecesarias y por otro lado, puede que no resulte posible detectar en pacientes con PSA bajo. Es por estas razones existe una falta de marcadores efectivos de pronóstico para predecir el comportamiento de PCa y el resultado después de un tratamiento definitivo [19].

## 2.8 Examen digital rectal (DRE)

Tradicionalmente, la palpación de la próstata mediante un examen digital rectal (DRE) es la manera en la que se sospecha de un diagnóstico de cáncer de próstata (Ver Figura 4). Históricamente hasta un 50% de las masas palpables eran atribuibles al cáncer de próstata. Aunque el DRE por sí mismo es un método que no garantiza la detección de esta patología, aún tiene un papel importante para el diagnóstico, que se refleja por su permanencia en las directrices del cáncer de próstata, ya que se detectan hasta un 25% de los tumores prostáticos en hombres. Desafortunadamente, cuando se diagnostica el PCa, sobre la base de un tumor palpable, el riesgo de que el paciente presente una malignidad metastásica o localmente avanzado es considerable [3].



**Figura 4: Examen digital rectal (DRE).** El médico inserta un dedo enguantado y lubricado en el recto y palpa la próstata para verificar si hay algo anormal [9].

## 2.9 Puntuación de Gleason

Este sistema de clasificación se basa enteramente en el patrón histológico de una biopsia de un adenocarcinoma de próstata, determinado por la diferenciación y la disposición de las células teñidas con hematoxilina-eosina. La clasificación del cáncer usando la puntuación de Gleason es el más utilizado, y es el método histopatológico aceptado para proporcionar información sobre el pronóstico del cáncer de próstata [12].

La puntuación de Gleason se basa en las relaciones arquitectónicas epitelial (carcinoma)-estromal dentro de la próstata [20]. A través del uso de patrones arquitectónicos se le asigna una calificación al grado del tumor entre 1 y 5, números más altos representan tumores menos diferenciados y más agresivos. Una sola próstata puede albergar múltiples focos de diferentes patrones histológicos de adenocarcinoma, y es posible tener graduaciones de Gleason de 3, 4 y 5 dentro del mismo espécimen, debido a que el 85% de los tumores de próstata son multifocales. La puntuación de Gleason se genera mediante la combinación de la primera y la

segunda graduación más frecuente (dominante y subdominante), es decir en un tumor con la mayoría del grado de Gleason 3 y algunos grados de Gleason 4 de la enfermedad, la puntuación de Gleason será  $3 + 4 = 7$ . Esto es evaluado por un uropatólogo utilizando microscopía de luz de baja potencia. La puntuación de Gleason ofrece importante información pronóstica (Ver Tabla 1) [3,12].

<b>Grado</b>	<b>Histología</b>	<b>Comportamiento biológico</b>
1 y 2	Glándulas estrechamente empaquetados que forman un nódulo	Enfermedad indolente, raramente progresiva
3	Pequeñas glándulas infiltrantes, formación completa del lumen	Patrón más común, menos agresivo que el patrón 4
4	Glándulas fusionadas, formación incompleta del lumen	Indica progresión del tumor
5	Células individuales, sin la formación del lumen	Muy agresivo, etapa tardía

**Tabla 1: Sistema puntuación de Gleason.** Se representan las distintas puntuaciones en relación a la histología y el comportamiento biológico (Modificado de [3]).

Una práctica común ha sido traducir la puntuación de Gleason 2-4 como carcinoma bien diferenciado, puntuación de Gleason 5-7 como moderadamente diferenciado, y la puntuación de Gleason de 8-10 como pobremente diferenciado. Sin embargo, un carcinoma con puntuación de Gleason 7 tiene un patrón de alto grado, y es intermedio en agresividad clínica entre las puntuaciones 5-6 y 8-10, y no deben incluirse en una categoría moderadamente diferenciado. La cantidad o porcentaje de carcinoma de alto grado pueden tener un impacto en la probabilidad de curación. Así, los pacientes con un carcinoma con una puntuación de Gleason 7 que tienen una puntuación de  $4 + 3$ , con más patrones de grado 4 que de grado 3, parece tener un peor pronóstico que una puntuación de  $3 + 4$ , donde el patrón de grado 3 es el grado dominante [20].

Los métodos de cribado como los niveles de PSA o el DRE pueden ser un tanto problemáticos, debido a que la interpretación de los niveles de PSA en suero pueden estar influenciado por ciertos factores analíticos (por ejemplo el manejo pre-analítico de las muestras, procesamiento en el laboratorio, rendimiento en el ensayo, test de normalización) o variaciones biológicas (por ejemplo medicamentos, actividad física y sexual y tamaño de la próstata), en cuanto a DRE se ha reconocido ser extremadamente subjetiva, con alta variabilidad inter-observador, por lo que no es una herramienta confiable para la detección del PCa [17]. El puntaje de Gleason

también es un método diagnóstico histopatológico utilizado en PCa principalmente para determinar tratamiento y como modalidad de seguimiento, pero la clasificación de las muestras histopatológicas puede variar ampliamente debido a las evaluaciones subjetivas de los patólogos [4]. La variación inter-observador en la evaluación histopatológica puede tener importantes consecuencias clínicas que afectan a la estratificación de la enfermedad, la vigilancia y las recomendaciones de tratamiento, además existen ciertas complicaciones implicadas con la biopsia guiada por ecografía transrectal, como son el dolor, infección y el sangrado posterior a este examen [4,17].

## 2.10 Estadificación del Cáncer de Próstata.

El proceso utilizado para determinar si el cáncer se ha diseminado dentro de la próstata a otras partes del cuerpo se llama estadificación. La información obtenida en el proceso de estadificación determina el estadio de la enfermedad [9]. Es importante conocer el estadio a fin de planificar el tratamiento. Los resultados de las pruebas utilizadas para diagnosticar el cáncer de próstata a menudo se utilizan también para estadificar la enfermedad [13]. En el cáncer de próstata resulta difícil realizar pruebas de estadificación a menos que el paciente tenga síntomas o signos de que el cáncer se ha extendido, como dolor de huesos, un alto nivel de PSA o un alta puntuación de Gleason [9].

El pronóstico y la modalidad de tratamiento de PCa dependerán de la etapa de extensión del tumor. Se distinguen 4 etapas: las etapas I y II corresponden a tumores localizados; en la etapa III el tumor se ha diseminado fuera de la cápsula prostática y puede haber compromiso de vesículas seminales, y en la etapa IV hay metástasis ganglionares o a distancia [13].

### Etapa I (pT1)

En el estadio I, el cáncer se encuentra sólo en la próstata. El cancer:

- Se encuentra por biopsia con aguja (hecho por un alto nivel de PSA) o en una pequeña cantidad de tejido durante la cirugía por otros motivos (como la hiperplasia prostática benigna). El nivel de PSA es menor que 10 y la puntuación de Gleason es 6 o menos; o
- Se encuentra en la mitad o menos de un lóbulo de la próstata. El nivel de PSA es menor que 10 y la puntuación de Gleason es 6 o menos; o

- No se puede sentir durante un examen rectal digital y no se puede ver en las pruebas de imagen. El cáncer se encuentra en la mitad o menos de un lóbulo de la de próstata. No se conocen el nivel de PSA y la puntuación de Gleason.

## Etapa II (pT2)

En el estadio II, el cáncer es más avanzado que en la etapa I, pero no se ha propagado fuera de la próstata. El estadio II se divide en los estadios IIA y IIB.

En el estadio IIA, el cáncer:

- Se encuentra por biopsia con aguja (hecho por un alto nivel de PSA) o en una pequeña cantidad de tejido durante la cirugía por otros motivos (como la hiperplasia prostática benigna). El nivel de PSA es menor que 20 y la puntuación de Gleason es 7; o
- Se encuentra por biopsia con aguja (hecho por un alto nivel de PSA) o en una pequeña cantidad de tejido durante la cirugía por otros motivos (como la hiperplasia prostática benigna). El nivel de PSA es de al menos 10, pero inferior a 20 y la puntuación de Gleason es 6 o menos; o
- Se encuentra en la mitad o menos de un lóbulo de la próstata. El nivel de PSA es de al menos 10, pero inferior a 20 y la puntuación de Gleason es 6 o menos; o
- Se encuentra en la mitad o menos de un lóbulo de la próstata. El nivel de PSA es menor que 20 y la puntuación de Gleason es 7; o
- Se encuentra en más de la mitad de un lóbulo de la próstata.

En el estadio IIB, el cáncer:

- Se encuentra en lados opuestos de la próstata. El PSA puede ser cualquier nivel y la puntuación de Gleason puede variar de 2 a 10; o
- No se puede sentir durante un examen rectal digital y no se puede ver en las pruebas de imagen. El nivel de PSA es 20 o superior y la puntuación de Gleason puede variar de 2 a 10; o
- No se puede sentir durante un examen rectal digital y no se puede ver en las pruebas de imagen. El PSA puede ser de cualquier nivel y la puntuación de Gleason es de 8 o más.

### Etapa III (pT3)

En el estadio III, el cáncer se ha diseminado más allá de la capa externa de la próstata y se puede haber diseminado a las vesículas seminales. El PSA puede ser cualquier nivel y la puntuación de Gleason puede variar de 2 a 10.

### Etapa IV (pT4)

En el estadio IV, el PSA puede ser cualquier nivel y la puntuación de Gleason puede variar de 2 a 10. Además, el cáncer:

- Se ha extendido más allá de las vesículas seminales a los tejidos cercanos u órganos, como el recto, la vejiga o la pared pélvica; o
- Puede haberse diseminado a las vesículas seminales o tejidos cercanos u órganos, como el recto, la vejiga o la pared pélvica. El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos; o
- Se ha extendido a partes distantes del cuerpo, que pueden incluir los ganglios linfáticos o los huesos. El cáncer de próstata a menudo se disemina a los huesos.

La prostatectomía radical (PR) ofrece la mejor oportunidad para curar el PCa, cuando la enfermedad se encuentra localizada. La predicción exacta del estadio patológico es fundamental para determinar qué pacientes se verán beneficiados con PR y cuales no [21], para esto se utiliza el valor pronóstico de la puntuación de Gleason en combinación con otras variables clínicas, incluyendo DRE y los niveles séricos de PSA. En los últimos años, se han desarrollado nomogramas para predecir el estadio patológico en PR y progresión de la enfermedad después de la cirugía o terapia de radiación. Los Nomogramas suelen incluir variables de pretratamiento incluyendo el estadio clínico, puntuación de Gleason, niveles séricos PSA, etc. En la actualidad el nomograma utilizado para predecir con precisión el estadio patológico es la "Tabla de Partin" [22,23].

Debido a las limitaciones de los tratamientos actuales, uno de los principales problemas clínicos para el cáncer de próstata es decidir qué tratamiento puede ser la mejor opción para los pacientes individuales en el momento del diagnóstico. Dado que la distinción entre la enfermedad agresiva e indolente sigue siendo un gran reto para el diagnóstico clínico de PCa, ya que no hay biomarcadores o herramientas de pronóstico

que pueden predecir con precisión la progresión del tumor en el momento del diagnóstico. Ya que la mayoría de los cánceres de próstata ocurren en hombres de edad avanzada, algunos pacientes con enfermedad indolente morirán con el cáncer de próstata en lugar de morir de la enfermedad. Aunque en la actualidad existen varios nomogramas que ayudan a predecir el estadio patológico de PCa, no existe un estándar aceptado y muchos pacientes recién diagnosticados de PCa están mal clasificados, dando lugar a decisiones de tratamiento poco óptimas [24].

### 2.11 Biomarcadores y Cáncer de Próstata

Como ya se ha descrito, convencionalmente el cáncer de próstata es detectado mediante tres exámenes clínicos: medición de PSA, examen digital rectal (DRE) y examen histopatológico para evaluar la puntuación de Gleason, sin embargo estas técnicas tienen limitaciones, por lo que en la actualidad se están caracterizando nuevos biomarcadores moleculares que potencialmente podrían ayudar en la detección de esta enfermedad, la evaluación de los riesgos, seguimiento del tratamiento y supervivencia [24].

Los biomarcadores son moléculas que sirven como propósito para distinguir procesos biológicos distintivos anormales, como enfermedades o cánceres en desarrollo. Estas moléculas pueden ser proteínas, productos químicos o incluso segmentos de ARN o ADN. Para ser clasificado como un biomarcador, una molécula debe estar relacionada con alguna ocurrencia tal como el diagnóstico de una determinada enfermedad, progresión o la supervivencia de un paciente específico. No todos los biomarcadores son igualmente eficaces, pero sí proporcionan información adicional a lo que ya se ha determinado mediante análisis clínicos y patológicos. Se han descrito varios usos para los biomarcadores entre los cuales encontramos la detección, progresión de una enfermedad, predicción de resultados después de un tratamiento o una intervención clínica, como también evaluación de riesgos, seguimiento y el desarrollo de medicamentos [24].

Idealmente los biomarcadores deberían tener algunas características como ser baratos, fiables, consistentes, medidos con facilidad y su expresión alterarse en condiciones de enfermedad. Deberían además tener una alta especificidad para el diagnóstico y el pronóstico de una enfermedad y reducir la tasa de falsos positivos [24]. Específicamente para el cáncer de próstata, los biomarcadores deberían ser

capaces de determinar la presencia de la enfermedad, suministrar información sobre la progresión, evaluar la efectividad del tratamiento y predecir la probabilidad de recurrencia y la supervivencia [24].

La importancia de los biomarcadores en estudios epidemiológicos se relaciona con su capacidad para distinguir pacientes de alto riesgo de pacientes de bajo riesgo; los pacientes que deben ser tratados agresivamente; y los pacientes que responden al tratamiento en contraposición a los que no responden. Esto significa que los pacientes que entran en la categoría de la enfermedad clínicamente insignificante, en base a su perfiles de biomarcadores, se pueden identificar con una exactitud razonable y que los pacientes que son inicialmente clasificados como de bajo riesgo que se reclasifican a través del tiempo como de mayor riesgo y son tratados radicalmente tiene alta probabilidad de cura en la mayoría de los casos [24].

Los biomarcadores de cáncer de próstata pueden clasificarse según: predicción, diagnóstico y pronóstico (Ver Figura 5). Biomarcadores predictivos sirven para evaluar si una persona desarrollará cáncer de próstata. Biomarcadores de diagnóstico distinguen las células cancerosas de las células no cancerosas. Finalmente, los biomarcadores de pronóstico sirven para predecir la progresión y el desarrollo del cáncer de próstata, así como identificar detalles sobre el tratamiento de ciertos pacientes [24].

Puede hacerse otra clasificación para los biomarcadores de cáncer de próstata en base a el tipo de molécula y mecanismo de acción en cuestión [24]. Estos incluyen genética, epigenética y biomarcadores proteómicos. Biomarcadores genéticos son por lo general basados en el ADN y se asocian con cambios en el propio ADN, tales como las pérdidas cromosómicas, ganancias, y translocaciones [24]. Biomarcadores epigenéticos están asociados con cambios en el ADN que no involucra modificación de la secuencia de ADN en sí. Los biomarcadores epigenéticos comunes a menudo están relacionados con cambios en la metilación del ADN, modificaciones de las histonas, perfiles de microARN y modificaciones de la cromatina [24]. Los biomarcadores proteómicos consisten en proteínas específicas, en el caso de la proteómica para el cáncer de próstata se trata de encontrar proteínas y patrones de proteínas que pueden correlacionarse con cáncer próstata. Cada uno de estos biomarcadores puede tener valor predictivo, diagnóstico y pronóstico [24].

En la actualidad están siendo explorados nuevos biomarcadores basados en perfiles epigenéticos para ayudar en el diagnóstico y manejo de PCa [25]. Las alteraciones epigenéticas somáticas son un fenómeno cada vez más reconocido en el desarrollo de los cánceres humanos, incluyendo el de próstata. Se producen temprano durante la progresión de la enfermedad en todas las etapas del proceso y están estrechamente relacionados con el crecimiento de las células cancerosas y la progresión de la metástasis [26,27].

Estos cambios del genoma, que afectan a la estructura y función de la cromatina, se pueden mantener a través de la mitosis, proporcionando una ventaja selectiva para el crecimiento y supervivencia durante la patogénesis del cáncer [28]. Para el cáncer de próstata humano, surgen cambios epigenéticos reconocibles en las primeras etapas de transformación y persistir a través de la invasión, metástasis y la progresión maligna que amenaza la vida. El creciente conocimiento de las alteraciones epigenéticas en cáncer de próstata ha creado nuevas oportunidades para el descubrimiento de biomarcadores útiles para la detección del PCa, la detección, el diagnóstico, estadificación y estratificación del riesgo [28]. Además, debido a que los procesos epigenéticos no cambian directamente la secuencia del genoma, la modulación terapéutica del epigenoma, el uso de medicamentos que afectan la función dinámica de la cromatina, tiene una gran promesa como un enfoque racional para la prevención y el tratamiento del cáncer de próstata, a diferencia de las mutaciones genéticas transferidos pasivamente, los cambios epigenéticos se deben mantener de forma activa y su "reversibilidad" es una posible diana terapéutica [19,28].

La acumulación de estas alteraciones puede promover campos de susceptibilidad que con el tiempo puedan desarrollar cáncer [26]. Este es un aspecto del "efecto de campo" que se manifiesta en la conocida multifocalidad, que consta de 4 a 5 focos de cáncer, y que se ha observado en las muestras de prostatectomía radical [26]. El concepto de efecto de campo o campo de cancerización, que se ha utilizado para explicar la multifocalidad de algunos tipos de cáncer, sugiere que pueden existir alteraciones moleculares preneoplásicas incluso en tejidos histológicamente normales asociados con tumor y ya ha sido caracterizado en cáncer cabeza y cuello, colorectal, vejiga, cuello uterino y otros cánceres. Dada la multifocalidad del PCa y su asociación con la edad, el interés se ha incrementado en la definición de un efecto de campo en PCa [25]. Un efecto de campo epigenético, en el contexto del cáncer es a menudo considerado como el resultado de la presencia de un tumor. Sin embargo, la reciente

evidencia sugiere que estos cambios pueden ocurrir con la edad y, potencialmente, incluso preceder a la formación de cáncer, por lo que se han identificado recientemente una serie de cambios genéticos y epigenéticos en toda la próstata histológicamente normal [26].

## 2.12 Epigenética y Cáncer de próstata

Hay tres grandes cambios epigenéticos que incluyen la metilación del ADN, modificación de histonas y microARNs (miARNs) [19,26,27,29]. La epigenética es uno de los campos en rápida expansión en la investigación relacionada con el cáncer. Estudios recientes han demostrado que la epigenética juega un papel importante en la biología del cáncer, la terapia génica somática, las infecciones virales, la impronta genómica [19].

La epigenética hace referencia a la información genómica funcional relevante y se refiere a mecanismos que permite transmisión estable de rasgos celulares sin alteración en la secuencia de ADN o la cantidad que modulan la estructura de la cromatina, y alteran la expresión de genes sin el requisito para el cambio [29].

Las modificaciones epigenéticas son cruciales durante el desarrollo embrionario, estos cambios modulan la expresión génica y pueden alterar aspectos de fenotipos tumorales, incluyendo la invasión, la angiogénesis, la motilidad y proliferación [26, 29]. El modelo clásico de la progresión del cáncer, que fue descrita por primera vez en 1971, describe la necesidad de 2 golpes discretos o inactivación de eventos para silenciar a los 2 alelos de un gen supresor de tumores implicados en la progresión. Aunque este modelo originalmente se centró en las alteraciones de la secuencia de bases del ADN como la inactivación de eventos, ahora está claro que los eventos epigenéticos pueden funcionar también en este nivel. También hay pruebas de que el desarrollo de alteraciones epigenéticas tiene un papel en otros trastornos del crecimiento de la próstata, incluyendo HBP [17,29].

La epigenética puede explicar otros aspectos de la fisiología del tumor de próstata. Se sabe que el PCa se produce simultáneamente en múltiples focos en toda la próstata periférica, esto sugiere que es un proceso de efecto de campo o procesos que se producen en toda la próstata periférica que permite el desarrollo del PCa pasivamente [17,29].

### **3. OBJETIVOS**

**Objetivo General:** Elaborar una revisión de la literatura que permita describir los marcadores epigenéticos asociados a la hipermetilación del ADN descritos en Cáncer de Próstata y su potencial rol como marcador de detección temprana, tratamiento, seguimiento y el pronóstico de esta patología.

#### **4. METODOLOGÍA**

Para el desarrollo de la presente tesis bibliográfica se recopilaron artículos relacionados con las siguientes palabras claves:

*Prostate Cancer*

*Epigenomic*

*Methylation*

*Genes Tumor suppressor*

Se utilizó MEDLINE como base de datos y PubMed como buscador, todo ello utilizando el Proxy de la Universidad de Valparaíso.

La estrategia utilizada para identificar los estudios seleccionados fue basada en los siguientes criterios de selección.

##### *Criterio de búsqueda 1*

- Se recopilaron los estudios desde el 01 de Enero de 2004 hasta 31 de Diciembre de 2014.
- Se consideraron revisiones de bibliografía, ensayos clínicos y libros.
- Se incorporaron publicaciones de investigación realizadas principalmente en humanos.
- El idioma de búsqueda fue inglés.
- Se eliminaron publicaciones que no tuvieran como idioma el inglés y aquellas publicaciones a las cuales no se tuviera acceso a través del Proxy de la Universidad de Valparaíso.
- Se utilizó como organizador bibliográfico el programa ENDNOTE

### *Criterio de búsqueda 2*

- Se seleccionaron artículos relacionados con alteraciones moleculares en cáncer de próstata
- Se seleccionaron artículos relacionados con regulación epigenética y modificaciones epigenéticas en cáncer de próstata.
- Se seleccionaron artículos relacionados con modificación de histonas y modificación de la cromatina en cáncer de próstata.
- Se seleccionaron artículos relacionados con microARN en cáncer de próstata.
- Se seleccionaron artículos relacionados con hipometilación del ADN en cáncer de próstata.
- Se seleccionaron artículos relacionados con hipermetilación de promotores e hipermetilación del ADN en cáncer de próstata.

Además se seleccionaron otros artículos relacionados con el tema de interés de esta revisión, con la finalidad de complementar las ideas desarrolladas en esta, de estos artículos uno estaba en español.

Para desarrollar el proceso de búsqueda bibliográfica en MEDLINE se utilizaron combinaciones de las palabras claves, previamente descritas, con su respectivo término MESH de MEDLINE usando "AND" como operador booleano.

Para enfocar la búsqueda hacia el tema de interés se utilizó como palabra clave principal Prostate Cancer cuyo MESH correspondiente es Prostatic Neoplasm, dentro de la búsqueda ambas palabras se relacionaron utilizando "OR" como operador booleano.

Se realizó la búsqueda utilizando la palabra clave principal con su respectivo término MESH en combinación con las otras tres palabras claves también con su respectivo término MESH (en caso de existir). De esta manera se obtuvieron los

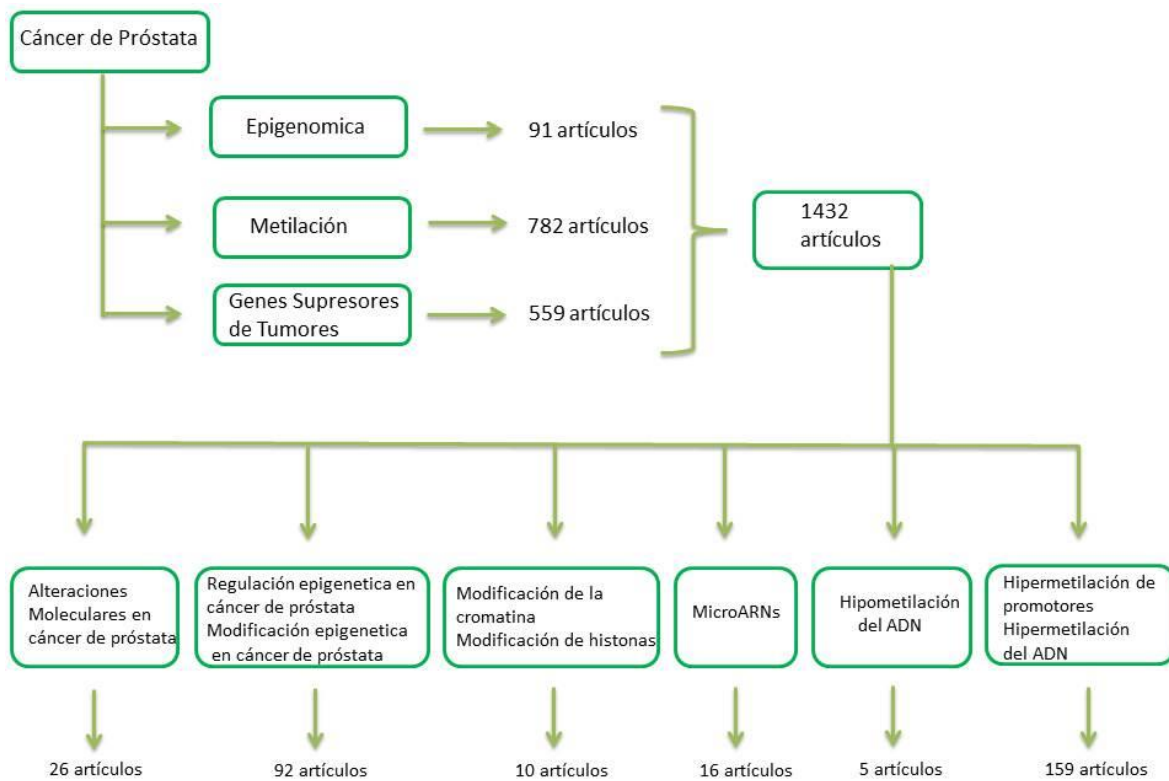
siguientes resultados:

(Prostatic Neoplasm [MESH] OR Prostate Cancer) AND (Epigenesis genetic [MESH] OR Epigenomics) 91 artículos

(Prostatic Neoplasm [MESH] OR Prostate Cancer) AND (DNA Methylation [MESH] OR Methylation) 782 artículos

(Prostatic Neoplasm [MESH] OR Prostate Cancer) AND Genes Tumor Suppressor 559 artículos

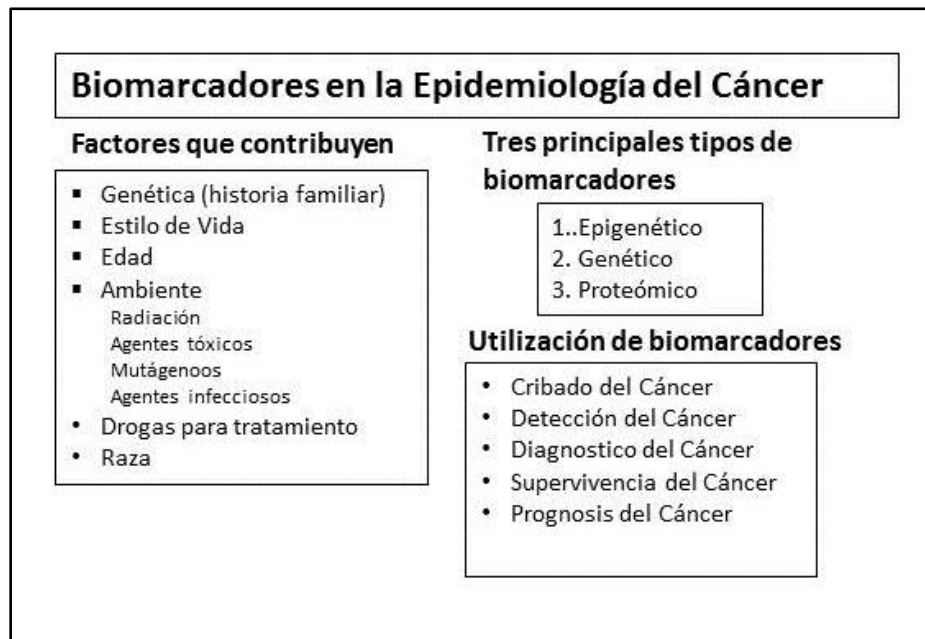
Se recopilaron un total de 1432 artículos. Luego de remover duplicados quedaron 308 artículos (Ver algoritmo) y sobre estos se aplicaron los criterios de búsqueda para la selección de los artículos utilizados en esta revisión. Los artículos seleccionados fueron 165 artículos, además se utilizaron 11 artículos adicionales para complementar el desarrollo de la presente revisión. (Ver algoritmo de búsqueda)



## 5. REVISIÓN DE LA LITERATURA

### 5.1 Modificaciones epigenéticas en Cáncer de Próstata

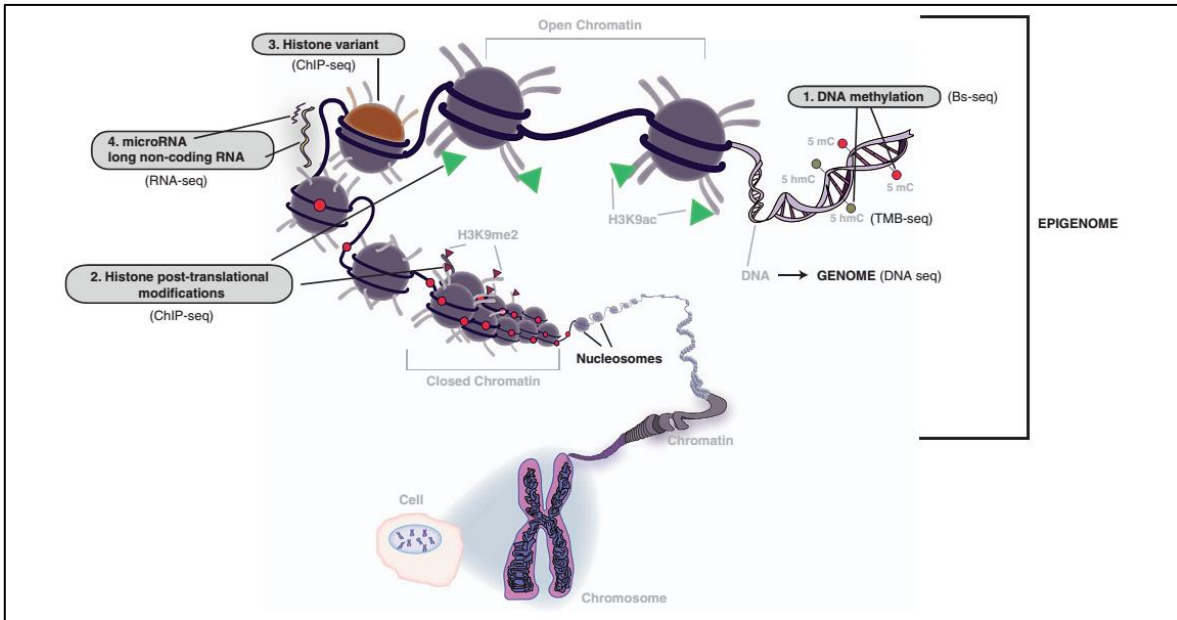
La epigenética hace referencia a la información genómica funcional relevante, sin alterar la secuencia del ADN. La epigenética se refiere a modificaciones del ADN o proteínas asociadas, aparte de la secuencia de ADN en sí, que llevan el contenido de información con respecto a la expresión de genes durante la división celular. En la actualidad, tres principales mecanismos epigenéticos son reconocidos: la metilación del ADN, modificaciones de las histonas y microARNs (miARN) (Ver Figura 6) [26,29,30]. Estos cambios epigenéticos modulan la estructura de la cromatina y a su vez la expresión génica y se han descrito que son cruciales durante el desarrollo embrionario. Más recientemente se ha reconocido que la reactivación aberrante puede conducir a la expresión de un gen alterado asociado con el desarrollo y progresión del cáncer, ya que pueden alterar aspectos de fenotipos tumorales, incluyendo la invasión, la angiogénesis, la motilidad y proliferación [26,29].



**Figura 5:** Principales factores de riesgo de cáncer de próstata y una amplia clasificación de los biomarcadores de cáncer de próstata [24].

El modelo clásico de la progresión del cáncer, que fue descrita por primera vez en 1971, describe la necesidad de 2 eventos de inactivación para silenciar a los 2 alelos de un gen supresor de tumores implicado en la progresión. Aunque este modelo originalmente se centró en las alteraciones de la secuencia de bases del ADN como la inactivación de eventos, ahora está claro que los eventos epigenéticos pueden funcionar también a este nivel. También hay pruebas de que el desarrollo de alteraciones epigenéticas tiene un papel en otros trastornos de la próstata, incluyendo HBP [29].

La epigenética puede explicar otros aspectos de la fisiología del tumor de próstata. Se sabe que el PCa se produce simultáneamente en múltiples focos en toda la periferia de la próstata, lo que podría sugerir se producen procesos de efecto de campo en esta zona y eso podría provocar o permitir pasivamente de manera directa el desarrollo del PCa. Los mecanismos reguladores epigenéticos parecen ser especialmente sensibles a las influencias externas, como la dieta y el estrés oxidativo, y en la próstata, estas influencias podrían modular algún efecto sobre esta. Los cambios globales o específicas en las modificaciones previamente nombradas: microARNs, modificación de histonas y metilación del ADN podrían ser candidatos epigenéticos de este efecto de campo (Ver Figura 6) [29].



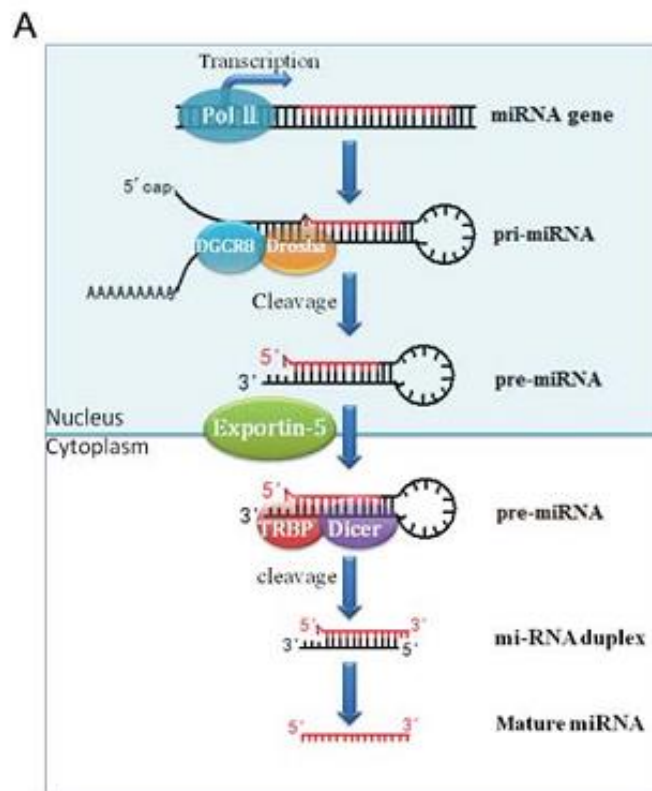
**Figura 6: Mecanismos epigenéticos descritos en PCa:** La integración de la genómica y epigenómica puede aportar datos invaluable para el conocimiento en PCa y conducir al descubrimiento de nuevos marcadores [31].

## 5.2 MicroARNs

Casi el 30% de los genes humanos están regulados por miARNs, esta regulación ocurre de manera temporal y es tejido específica [30]. Los microARNs desempeñan un papel importante en el control de la proliferación celular, diferenciación, apoptosis de células de carcinoma y la tumorigénesis a través de la regulación de genes diana. La expresión de los microARNs se ve alterada con frecuencia en cáncer y pueden actuar ya sea como oncogenes (cuando se sobreexpresan en cáncer) o como supresores tumorales (cuando disminuyen su expresión en cáncer) [30,32].

Los microARNs (miARN) se definen como pequeñas moléculas de ARN (18 a 25 nucleótidos de longitud), no codificantes, endógenos, de una sola hebra que regulan la expresión de múltiples genes, ya sea afectando la estabilidad de su ARNm diana, mediante la inducción de la escisión o, en la mayoría de los casos, mediante la inhibición de su traducción. Se dirigen a los sitios de unión que se encuentran principalmente en regiones no traducidas (3'UTR) del ARNm, y en las regiones codificantes o 5' UTR causando la degradación del ARNm o la represión de la traducción [27,30,32,33].

Los miARNs generalmente están dotados de un promotor para la ARN Polimerasa II que es la encargada de su transcripción. Se sintetizan como pri-miARN que pueden ser de miles de nucleótidos de longitud y pueden contener los precursores de varios miARNs agrupados. La escisión endonucleolítica por la enzima nuclear Drosha produce estructuras de horquilla de 70 nucleótidos llamados pre-miARN. Estas moléculas entonces se transportan al citoplasma a través de la proteína Exportina-5 (Exp-5) y son procesados por la ribonucleasa Dicer en un ARN de doble cadena que contienen los miARNs maduros y su secuencia antisentido (miARN\*). Por último, el miARN maduro es incorporado selectivamente en el complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC), donde se provoca el silenciamiento del ARNm diana específico que es reconocido por la complementariedad parcial con secuencias localizadas en el 3' UTR (Ver Figura 7) [33]. Cada miARN a menudo regula múltiples ARNm, puede unirse e inhibir la transcripción de alrededor de 200 o más ARNm y cada ARNm puede ser el blanco de múltiples miARNs, lo que implica la existencia de una intrincada red de control de la expresión génica [31].



**Figura 7: Procesamiento de microARNs.** Proceso básico para la biosíntesis de microARN (Modificado de [32]).

Los miARNs, también se han descrito estar involucrados en el control de la estructura de la cromatina a través de la regulación post-transcripcional de enzimas clave que modifican la estructura de la cromatina. Además, los genes miARN son comúnmente regulados epigenéticamente a través de la metilación del ADN o por modificaciones de la cromatina de sus promotores, estableciendo así un diálogo transversal entre las principales vías epigenéticas [30].

### 5.3 MicroARNs en Cáncer de Próstata

Se ha descrito que varios miARNs y sus blancos son expresados de forma anormal en el PCa, lo que lleva a la respuesta correspondiente en el desarrollo, la invasión, y la metástasis de esta enfermedad. Las expresiones alteradas de algunos miARNs seleccionados son útiles como biomarcadores para el diagnóstico, el pronóstico y propósitos de clasificación de PCa [27,32].

A pesar que se han informado unos 50 miARNs como expresados de forma anormal en el PCa, sólo unos pocos han demostrado experimentalmente contribuir a la enfermedad. En PCa, la desregulación de miARNs afecta la reprogramación epigenética, el bloqueo de la apoptosis, la promoción del ciclo celular, la migración y la invasión. Las aberraciones en la señalización del receptor de andrógeno (AR) y los miARNs parecen estar estrechamente vinculados con la progresión del PCa, ya sea por la regulación de miARN de la señalización AR o regulación de miARNs independiente de andrógenos [27, 30, 31]. Los miARNs han demostrado estar presentes y son relativamente estables en fluidos clínicamente accesibles tales como suero, plasma, orina y saliva, lo que sugiere que miARNs tienen el potencial como biomarcadores usando un ensayo no invasivo [31].

Como suele ser el caso de expresiones aberrantes de miARNs, los mecanismos comunes incluyen la alteración del número de copias de miARNs, los que a su vez pueden ser silenciados a través de la metilación del ADN. Por el contrario, los miARNs también regulan la expresión de genes diana por mecanismo epigenético. Además, se han encontrado mutaciones de los precursores de miARNs, las que afectan notablemente el procesamiento del miARNs y su abundancia cuando ocurren en regiones que son críticas para la unión DGCR8 (proteína de unión a ARN de doble

cadena) y la escisión endonucleotídica por Drosha [32]. Sin embargo, las mutaciones que ocurren en la región de la horquilla no tienen influencias en el procesamiento de miARNs [32].

Otros factores, como la insuficiencia en el procesamiento de miARN y la desregulación de los promotores de miARNs, afectan también la expresión de miARNs. Estos mecanismos también contribuyen a explicar la desregulación en los niveles de expresión de los miRNAs en PCa. Por ejemplo, Dicer, una enzima necesaria para el procesamiento de los miARNs, la cual es sobre regulada en PCa, conduce a la desregulación de los miARNs y a una correlación con el estadio clínico y la puntuación de Gleason [32].

Para estudiar las funciones de los miARNs se utiliza la estrategia de ganancia y pérdida de miARNs para verificar sus impactos en la biología, lo que lleva a la alteración en la expresión y actividad de sus objetivos en el PCa, sólo algunos miARNs se han determinado experimentalmente estar involucrado en la iniciación, progresión y metástasis de PCa. Estos miARNs expresados diferencialmente funcionan ya sea como oncogenes (onco-miARN) o supresores tumorales (oncosupresor- miARN) (Ver Tabla 2) [27,32].

miARN	Expresión	Muestra	mARN diana	Funciones relacionadas	Rol en PCa	Referencia
<i>mir221/222</i>	↑	Linea celular	p27	Proliferación	Onco-miARN	[32]
		Linea celular	ARHI	Proliferación		[34]
		Linea celular/ Tejido	p27	Proliferación		[33]
<i>mir-21</i>	↑	Linea celular	MARCKs, PDCD4, TPM1	Movilidad, invasión, resistencia a la apoptosis	Onco-miARN	[32]
		Linea celular	MARCKs, PDCD4, TPM1, SPRY-2, TIMP3, RECK	Movilidad, invasión, migración		[33]
<i>mir-125b</i>	↑	Tejido	BAK1, EIF4EBP1	Apoptosis, proliferación	Onco-miARN	[32]
		Linea celular	BAK1	apoptosis		[33]
		Linea celular	p53, PUMA, BAK1	apoptosis		[35]
<i>mir-205</i>	↓	Tejido	IL-24, IL-23	Inflamación, apoptosis	Supresor tumoral	[36]
		Linea celular/ Tejido	MED1 PRKCE, ZEB-2	EMT, progresión, proliferación, resistencia a apoptosis		[37]
						[33]
<i>mir-200b</i>	↓	No disponible	PDGF-D	EMT	Supresor tumoral	[32]
<i>mir-330</i>	↓	No disponible	E2F1	apoptosis	Supresor tumoral	[32]
<i>mir-146<sup>a</sup></i>	↓	Linea celular	ROCK1	Proliferación, invasión, metastasis	Supresor tumoral	[38]
		Linea celular/ tejido	ROCK1	movilidad		[32]
		Linea celular	ROCK1, CXCR4	Invasión, migración , agresividad		[33]
<i>mir-101</i>	↓	tejido	EZH2	metastasis	Supresor tumoral	[32]
		Linea celular	EZH2	Proliferación, invasión		[33]
<i>mir-23b</i>	↓	Linea celular	Src	apoptosis	Supresor tumoral	[39]
		tejido				
<i>mir-23</i>	↓	No disponible	MYC	Alteraciones genéticas, anomalías metabólicas	Supresor tumoral	[33]
<i>mir-126</i>	↓	Linea celular	proteína	Motilidad, invasión	Supresor tumoral	[32]
		Linea celular	EGF	Migración, invasión		[33]
<i>mir 494-3p</i>	↓	No disponible	CXCR4	Metastasis, progresión	Supresor tumoral	[27]

miARN	Expresión	Muestra	mARN diana	Funciones relacionadas	Rol en PCa	Referencia
<i>mir-132</i>	↓	No disponible			Supresor tumoral	[27]
<i>mir-34b</i>	↓	No disponible	AKT	Proliferación, migración	Supresor tumoral	[27]
<i>mir-34</i>	↓	Linea celular	SIRT-1	quimioresistencia	Supresor tumoral	[33]
Familia <i>mir-34</i>	↓	Linea celular		apoptosis		[32]
<i>mir-449</i>	↓	No disponible	HDCA1	apoptosis	Supresor tumoral	[27]
		Linea celular	HDCA1	Apoptosis		[33]
<i>mir 199<sup>a</sup>-3p</i>	↓	Tejido			Supresor tumoral	[27]
<i>mir-145</i>	↓	Tejido			Supresor tumoral	[40]
		Tejido	c-Myc	Ciclo celular, apoptosis		[41]
<i>mir-34c</i>	↓	Linea celular	MET	Movilidad, invasión	Supresor tumoral	[42]
<i>mir-193b</i>	↓	Linea celular/Tejido		Ciclo celular	Supresor tumoral	[43]
<i>mir-452/mir-224</i>	↓	Linea celular	C1orf116, GOLM1, FAM64A	proliferación, migración, invasión	Supresor tumoral	[44]
		Tejido	IGF2BP2, DR1, OAZ2.			
<i>mir-330</i>	↓	No disponible	E2F1	apoptosis	Supresor tumoral	[32]
<i>mir-15a/mir-16</i>	↓	tejido	BCL-2	apoptosis	Supresor tumoral	[33]
		Linea celular	BCL-2, WNT-3, CCND1, VEGF	Progresión, angiogenesis		[33]
<i>mir-32</i>	↓	Linea celular	BIM	apoptosis	Supresor tumoral	[33]
<i>mir-106b</i>	↓		E2F1, p21/WAF1	apoptosis	Supresor tumoral	[33]

**Tabla N°2:** *microARNs* descritos en *cáncer de próstata*. En la tabla se describen los distintos *microARNs* descrito en PCa, con su respectivo rol en PCa (oncomiARN o supresor de tumor), aumento o disminución de su expresión, sus genes blancos y la función en la cual se han descrito estar involucrados.

#### 5.4 Modificación de histonas

Estructuralmente, las histonas poseen una "cola" en la región amino terminal que es susceptible a modificaciones post-traduccionales en aminoácidos específicos que producen diversos cambios estructurales y de traducción en el llamado código de histonas incluyendo acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, sumoylation, ADP ribosilación, deiminación y la isomerización de prolina [30,45].

La cromatina es el orden superior de organización del ADN nuclear, y su unidad básica es el nucleosoma. Esta organización se compone de un núcleo de proteína denominado octámero de histonas (ocho histonas), compuestos de un dímero de la histona H2A, un dímero de la histona H2B, y un tetrámero compuesto de las histonas H3 y H4, alrededor de este octámero se envuelven 147 pb de ADN. Las histonas son biomoléculas dinámicas que proporcionan apoyo físico al ADN y están involucradas en la regulación de su transcripción, la reparación y la replicación. [19,26,30,45].

Entre estas modificaciones, la acetilación de histonas y la metilación están relativamente bien estudiadas. La acumulación de pruebas indica que el estado de acetilación y metilación de residuos de lisina o arginina específicos desempeñan un papel crucial en la regulación de la expresión génica, ya sea mediante la activación o represión transcripcional. La acetilación se asocia generalmente con la eucromatina, en general disminuye la afinidad de las histonas por el ADN y crea una conformación "abierta" de la cromatina para activar la transcripción de genes, y la desacetilación de histonas se asocia con una conformación "cerrada" o represiva de la transcripción. La acetilación y deacetilación de histona es mediada por las acetil transferasas de histona (HAT) y las desacetilasas de histona (HDAC), respectivamente. La metilación de las colas de las histonas presenta una situación más compleja, donde la activación o represión de la transcripción está vinculada a la posición del residuo dentro de la histona. La metilación y demetilación de histonas es mediada por enzimas metiltransferasas (HMT) y desmetilasas de histona (HDM). En general la metilación de lisinas 4, 36, y 79 de la histona 3 (H3K4me3, H3K36me y H3K79me) son marcas de una transcripción activa, mientras que la metilación de lisinas 9 y 27 de la histona 3 (H3K9 y H3K27) y de la lisina 20 de la histona 4 (H4K20) son por lo general encontradas en las regiones de heterocromatina silenciadas y promotores inactivos (Ver Figura 8). Cada una de estas modificaciones de la cromatina afecta de una manera diferente, ya sea por la alteración de las asociaciones moleculares de la cromatina o el reclutamiento de otras proteínas a la cromatina [19,26,29,30,45].

En las células normales, modificaciones de las histonas están implicadas en la impronta genómica, inactivación del cromosoma X, en desarrollo y la diferenciación de células madre embrionarias (ESC). En las células malignas, la modificación de las histonas en todo el genoma es también alterado en concierto con los cambios en la metilación del ADN. Por ejemplo, la reducción de la acetilación de lisina 16 de histona 4 (H4K16ac) y la tri-metilación de lisina 20 de H4 (H4K20me3) se asocian con la hipometilación de secuencias repetitivas de ADN, un sello distintivo del cáncer humano. En contraste, la metilación de lisinas 9 y 27 de la histona 3 (H3K9me y H3K27me) y la pérdida de acetilación de la histona 3 (H3ac), así como mono-metilación de lisina 4 de la histona 3 (H3K4me) están asociados con hipermetilación del ADN de los genes silenciados. En consecuencia, las alteraciones en la expresión de las enzimas clave de histonas (HDACs, HAT, HMTs y HDMs) se han asociado con el desarrollo y progresión del cáncer (Ver Figura 8) [30].

<b>Epigenetically activating<sup>1</sup></b>	<b>Epigenetically Repressive<sup>1</sup></b>
Hyperacetylation of the following: H2a: K5 H2b: K5, K12, K15, K20 H3: K4, K14, K18, K23, K27 H4: K8, K16 Hypermethylation of the following: Histone H3 K4, R17, K79 H4 R3 Ubiquitination of: H2b K120	Hypoacetylation of the following histones: H2a: K5 H2b: K5, K12, K15, K20 H3: K4, K14, K18, K23, K27 H4: K8, K16 Hypermethylation of the following: Histone H3 K9, K27 H4 K20 Ubiquitination of: H2a K119

**Figura 8:** Resumen de las modificaciones de histona y enzimas que afectan la transcripción génica [29].

### 5.5 Modificación de histonas en cáncer de próstata

Las modificaciones de histonas y la remodelación nucleosomal, son mecanismos epigenéticos importantes que regulan la expresión génica en el cáncer de

próstata [45].

La metilación de la histona afecta a la función de la cromatina dependiendo del aminoácido específico que está siendo modificado y el grado de metilación [45]. Ke y cols. (2009) realizaron un estudio basado en la expresión génica global basada en microarrays y perfiles epigenómico de células de cáncer de próstata y sus contrapartes normales y encontraron que las marcas de transcripción activa (ganancia de H3K4me3 (trimetilación de la lisina 4 en la histona 3) o pérdida de H3K27me3 (trimetilación de lisina 7 en histona 3) y marcas de silenciamiento (ganancia de H3K27me3 o pérdida de H3K4me3) fueron fuertemente asociado a los genes sobre-regulados y de baja-regulación en células de cáncer de próstata, respectivamente [46].

La metilación de lisina 4 en histona (H3K4me3) está asociado con la transcripción del gen inactivo PSA en la línea celular LNCaP de cáncer de próstata. Por el contrario, la mono y di-metilación de la histona 3 en lisina 4 (H3K4) (H3K4me1 y H3K4me2) están asociadas con la activación de genes mediada por AR en líneas celulares y tejidos CRPC (cáncer de próstata resistente a la castración). H3K4me1 y H3K4me2 se enriquecen de manera significativa en el promotor para AR del gen proto-oncogén UBE2C en CRPC, lo que conduce a unión a AR y expresión del gen UBE2C [19, 45]. Además la mono-, di- y tri-metilación en el residuo de lisina 9 de H3, H3K9, (H3Kme1, H3K9me2 y H3K9me3) se ha relacionado con la represión de los genes diana de AR en las células LNCaP y la disminución de di y trimetilada en la lisina 4 de H3 se asocia con la transcripción del gen de PSA mediada por AR. Por otra parte, el silenciamiento de la desmetilasa de H3K9; LSD1 (KDM1), JHDM2A (KDM3A) o JMJD2C (KDM4C), aumentará los niveles de las modificaciones represivas en genes dianas reguladas por AR. Por lo tanto, la expresión de los genes diana de AR como son PSA, TMPRSS2 y NKX 3.1 se reducirá [19].

La trimetilación de lisina 27 en histona 3 (H3K27me3) es una modificación represiva y el aumento de la expresión de la metiltransferasa de H3K27me3 (EZH2) conduce al silenciamiento de genes supresores de tumores (por ejemplo, Gas2 y ADRB2) [45] y en el silenciamiento de RAR beta 2, ER alfa, genes PGR y RGMA en cáncer de próstata [47]. También se ha descrito que la trimetilación de lisina 7 en la histona 3 disminuye la expresión de p53 [48] y además se ve incrementada significativamente en pacientes con un estadio avanzado de PCa, con una alta puntuación de Gleason, como también en tejidos peritumorales de pacientes con PCa

al compararlos con tejidos normales [47,49].

La lisina 20 de la histona H4 (H4K20) representa una de las modificaciones nucleosomales de las histonas del núcleo que participa en distintos procesos celulares, dependiendo de su metilación: mono-metilación de H4K20 (H4K20me1) desempeña un papel crucial en la represión transcripcional y la inactivación del cromosoma X, mientras que la di-metilación de H4K20 (H4K20me2) está vinculada a mecanismos celulares de reparación de ADN en base a la capacidad de unión de 53BP1 (proteína 1 de unión a p53) en los sitios de doble cadena de ADN dañados. Fragay cols. demostraron una asociación entre la reducción de la tri-metilación de H4K20 (H4K20me3) y el cáncer, pero no aclara indistintamente si la reducción de H4K20 es causa o consecuencia de la carcinogénesis. Aunque, H4K20me3 no permite diferenciaciones significativas entre las diversas etapas de PCa muestra fuertes niveles de metilación en PCa y CRPC. Vertino y cols. (2011) describieron que la tri-metilación de H4K20 a través SUV420H2 juega un papel crucial en el silenciamiento de genes supresores de tumores, como TMS1 (objetivo de silenciamiento inducido por metilación), que codifica para los dominios de reclutamiento de caspasas, que contribuye a la promoción de la apoptosis en células de PCa y se ha informado es pronóstico de la carcinogénesis de PCa [50].

La adición de grupos acetilo en las histonas, principalmente histonas H2A, H3 y H4, está catalizada por las enzimas HAT. El aumento de la actividad de HAT puede alterar el crecimiento del PCa en formas positivas o negativas. Estas enzimas pueden regular proteínas co-reguladoras transcripcionales que se unen a los receptores de esteroides. Por ejemplo, el p300 HAT, PCAF y TIP60 tienen la capacidad de regular el estado de expresión o activación de AR, lo que lleva a un aumento de la señalización del AR en ausencia de andrógeno. HAT también aumenta la IGFBP-2 y la activación de p21 en el PCa, disminuyendo la progresión del ciclo celular. HAT afecta una serie de procesos celulares y como tales representan un objetivo putativo para terapia por remoción de los grupos acetilo de las lisinas en las histonas realizado por HDAC, una clase de enzimas cuya expresión es con frecuencia reguladas en PCa. El ARNm de HDAC y los niveles de proteína están sobre regulados de 2 a 3 veces en PCa en comparación con los niveles en HPB en tejidos humanos [29].

Estudios en muestras de tejido de prostatectomía primaria revelaron una asociación en el aumento de los niveles de acetilaciones (H3K18Ac, H4K12Ac, y

H3K9ac) y de metilaciones (H3K4me2) con el grado del tumor. Y que solo dos de estas modificaciones (H3K4me2 y H3K18Ac) se relacionan con el riesgo de recurrencia de PCa. En las células normales de la próstata los promotores de genes activos están asociados con la di y tri-metilación de lisina 4 en la histona 3 (H3K4me2 y H3K4me3) y con la acetilación de lisina 9 en la histona 3 (H3K9ac), estas modificaciones son reemplazadas por las marcas represivas (H3K9me2, H3K9me3 y H3K27me3) en genes transcripcionalmente silenciados. Además se ha descrito que la metilación de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20me) se identifica específicamente en CRPC, mientras que la di-metilación de la lisina 20 en la histona 4 (H4K20me2) se distingue en diferentes etapas de PCa [26].

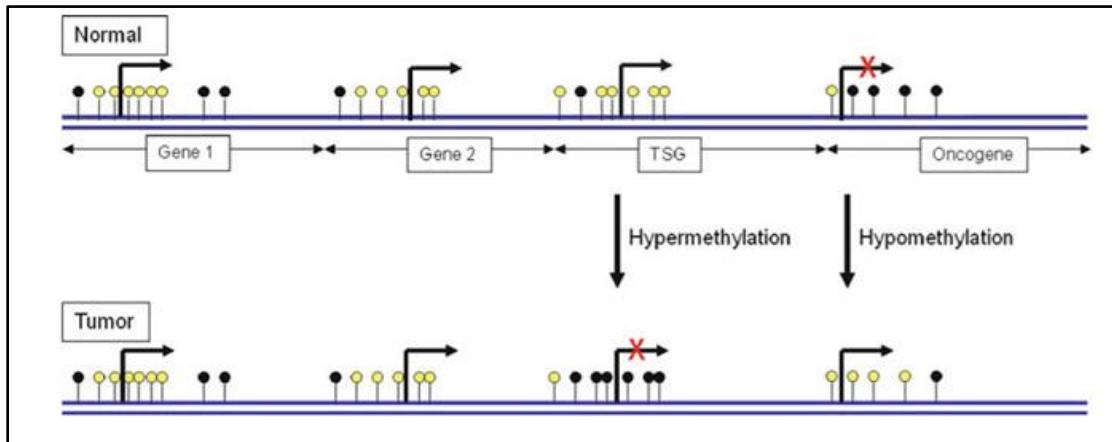
TWIST1 es un factor de transcripción que promueve la invasión y metástasis en una variedad de tipos de cáncer, a través de la inducción de EMT. TWIST1 es altamente expresado hasta en un 90% de PCa, y su regulación resulta en las células de la próstata en un fenotipo invasivo. Una alta expresión de TWIST1 en tumores sólidos confiere resistencia a la apoptosis inducida por una droga de quimioterapia como taxol o cisplatino. La expresión TWIST1 es regulada por la enzima histona metil transferasa MMSET, la cual produce aberrantemente altos niveles globales de H3K36me2 y bajos niveles de H3K27me3, de esta manera MMSET revierte los cambios epigenéticos globales y activa la expresión de TWIST1. Ezpoda y cols. describieron que en PCa, MMSET es sobreexpresado al compararlo con tejido normal de próstata: Este aumento en la expresión de MMSET, aumenta los globales de metilaciones activadoras de la transcripción (H3K36me3), aumentando los niveles de expresión de TWIST1 promoviendo la progresión e invasión tumoral, efectos mediados a través de la expresión de TWIST1 [51].

## 5.6 Metilación del ADN

La metilación del ADN fue la primera marca epigenética cuya implicación se describió en el cáncer humano. Las alteraciones de la metilación del ADN en el cáncer y el envejecimiento se caracterizan como hipometilación global e hipermetilación regional. Tanto la hipermetilación como la hipometilación puede afectar a la expresión génica y el papel de la metilación del ADN en la oncogénesis ha sido estudiado durante varios años. La hipometilación general se produce sobre secuencias ADN repetidas mientras que la hipermetilación implica islas CpG. En mayor parte, se han observado dos tipos principales de alteración de la metilación del ADN en los cánceres humanos, incluyendo la hipometilación y la hipermetilación de las islas CpG, pérdida y/o aumento

de la metilación en las regiones específicas que contribuyen a la carcinogénesis [19, 26].

La metilación del ADN se refiere a una modificación covalente, que resulta de la adición de un grupo metilo ( $\text{CH}_3$ ) en la posición C-5 del anillo de citosina en el ADN, esta ocurre típicamente en dinucleótidos CpG. Los dinucleótidos CpG tienden a agruparse en regiones llamadas islas CpG (CGI), que pueden definir como tramos de ADN (de longitud superior a 200 pares de bases) con un contenido de GC mayor del 50%. Las islas CpG se producen en sólo  $\sim 1\%$  en el genoma de mamíferos, sin embargo 60% de los promotores humanos se asocian con CGI en un estado, en su mayoría no metilado. La hipermetilación del ADN se refiere a la ganancia de metilación en los sitios que están normalmente no metilados y se presenta principalmente en CGI, y se asocia a menudo con el silenciamiento de la expresión génica heredable. Este proceso es responsable de procesos fisiológicos tales como silenciamiento de secuencias repetitivas y centroméricas, la diferenciación celular durante el desarrollo, inactivación del cromosoma X, impronta genómica y la susceptibilidad a enfermedades genéticas. El silenciamiento de genes, se consigue mediante el bloqueo de la unión de proteínas a ADN, tales como reguladores transcripcionales, que resultan en una disminución de la transcripción. La hipermetilación de las islas CpG en el promotor puede silenciar importantes genes supresores de tumores y otros genes de protección (ver Figura 9). La metilación del ADN es catalizada por enzimas llamadas DNA metil transferasas (DNMTs). Hay dos grupos principales de DNMTs, cuyas funciones incluyen el mantenimiento de la metilación mediante DNMT1 y metilación *de novo* a través DNMT3A y DNMT3B. Los estudios han descrito que la actividad DNMT1 está relacionada con la transición de fenotipo no neoplásico a neoplásico mientras que las enzimas de metilación *de novo* estaban principalmente relacionados con la progresión [19,26,27, 52].



**Figura 9: Rol de la metilación en cáncer.** Las islas CpG no metiladas y metiladas son indicadas con círculos *amarillos* y *negros* respectivamente. Esta figura muestra una región representativa del ADN genómico en células normales y tumorales. La región promotora en el gen1, gen2 y gen supresor de tumores (TSG) son raramente metiladas en células normales y por ende son expresados. La metilación en las citosinas de las islas CpG en la región del promotor de TSG son metiladas, resultando en el silenciamiento del gen. A la inversa, la hipometilación en la región promotora de un oncogen en células tumorales reactiva su transcripción [53].

La hipometilación del ADN genómico se ha asociado con mayores tasas de inestabilidad genómica, tal vez debido a la descondensación de la cromatina en conformaciones de recombinación permisiva o debido a la activación de elementos de retrotransposones. Las células tumorales humanas a menudo experimentan una hipometilación global, a pesar de la hipermetilación en sitios específicos. La hipometilación en secuencias repetitivas y retrotransposones, que se encuentran en algunas zonas de los genes, se produce comúnmente en PCa y puede contribuir a la heterogeneidad del tumor metastásico. Se ha descrito que la hipometilación del ADN juega un papel en la carcinogénesis, ya que causa la expresión aberrante de genes, inestabilidad de microsatélites, pérdida de impresión, anormalidad cromosómica y la activación de retrotransposones [26,52].

### 5.7 Hipometilación en Cáncer de Próstata

La hipometilación del ADN es una aberración epigenética presente en una variedad de tumores malignos, incluyendo el cáncer de próstata [19]. La hipometilación se ve facilitada por desmetilasas, un grupo de enzimas que incluye 5-metilcitosina glicosilasa y MBD2b. La metilación de genomas normales actúa como mecanismo de defensa contra el cáncer, por ejemplo, los oncogenes pueden ser

transcripcionalmente silenciados al ser metilados, y la hipometilación provoca la ruptura de este mecanismo de defensa y está implicado en la génesis tumoral. La hipometilación puede ser "global" o "localizada"; la hipometilación global se refiere a la disminución general en el contenido de la metilación en el genoma [19]. Brothman y cols midieron el estado de metilación global en tumores de próstata a partir de secciones de parafina, demostrando que el nivel global de metilación del genoma (hipometilación) se reduce drásticamente en las células tumorales de próstata en comparación con regiones benignas de las secciones del mismo paciente [54], por otra parte Bedford y cols., informaron que la hipometilación global es significativamente menor en pacientes con cáncer de próstata metastásico en comparación con cáncer de próstata no metastásico [54]. La hipometilación localizada o también denominada hipometilación gen-específica hace referencia a una disminución en los niveles de metilación de citosina en las islas CpG, con respecto a los niveles normales. Esto afecta las regiones específicas dentro del genoma, tales como regiones promotoras de los oncogenes, las cuales generalmente son altamente metiladas. Esta hipometilación localizada conlleva a una reactivación de la transcripción del oncogén [19].

La neoplasia intraepitelial prostática (PIN) se reconoce como una lesión precursora del PCa. Estudios basados en hipometilación del ADN han reconocido que esta aberración se encuentra en PIN cuando se compara con la hipometilación del tejido normal de la próstata sugiriendo que podría ser un evento que precede al cáncer [26, 55]. El estudio de Yang y cols., basado en inmunohistoquímica demostró que la metilación global fue baja en lesiones PIN de alto grado (HGPIN) en comparación con lesiones PIN de bajo grado (LGPIN), mientras la tinción de 5-metilcitosina (5-MC) utilizando un anticuerpo anti-5-MC, que es un indicador de hipermetilación, es mucho mayor en tejidos de PCa en comparación con HGPIN. Estos resultados parecen consistentes con la idea de que la hipometilación del ADN global contribuye a la iniciación del tumor y la hipermetilación contribuye a progresión tumoral [56].

Alrededor del 45% del genoma humano está compuesto de elementos repetitivos, que consisten en repeticiones intercaladas y repeticiones en tándem, entre estos encontramos a LINE-1 y Alu. LINE-1 son elementos muy metilados, de nucleótidos largos intercalados y que constituye al menos 18% del genoma humano. Alu es el elemento repetitivo más abundante, son nucleótidos cortos intercalados en el genoma humano y cuenta aproximadamente el 10% del total del genoma. Por otra parte, Alu y LINE-1 son elementos que normalmente contienen gran parte de las

secuencias CpG metiladas encontradas en tejidos humanos normales. Por lo tanto, una pérdida de la metilación del ADN de estos elementos podría representar una parte considerable de la hipometilación genómica característica de los cánceres humanos [57, 58]. Los estudios de hipometilación en PCa se realizan principalmente sobre estos elementos repetitivos. Yegnasubramanian y cols. demostraron que la hipometilación de LINE-1 aparece por primera vez en los cánceres de próstata primarios, y se hace más pronunciado en los cánceres de próstata metastásicos; adicionalmente los cambios de hipometilación del ADN son mucho más variables a través de diferentes metástasis del mismo individuo, lo que sugiere que estos cambios comúnmente surgieron después de la diseminación metastásica. Este hallazgo sugiere que, aunque la hipometilación de LINE1, a veces se produce en los cánceres primarios, este no confieren un mayor riesgo de enfermedad agresiva, ya que ocurre más consistentemente durante o después de la diseminación metastásica, momento en el que incluso puede contribuir al mantenimiento y la propagación de las lesiones metastásicas. El aumento de la hipometilación observado en las lesiones metastásicas de cáncer de próstata puede contribuir al elevado número y la prevalencia de aberraciones cromosómicas reportados previamente en los cánceres de próstata metastásico en comparación con cánceres primarios [52]. Estos datos son consistentes con los resultados de Florl y cols., donde la hipometilación de LINE-1 se asoció con la enfermedad en etapa superior. La explicación más sencilla de este hallazgo es que la hipometilación de LINE-1 en PCa es un evento secundario durante la progresión que precede la hipermetilación del ADN [58]. Similar a lo descrito para LINE-1, fue descrito en Alu por Cho y cols, en donde la metilación de Alu disminuye con la progresión tumoral. Además este mismo estudio reveló que los niveles de metilación de LINE-1 y Alu son marcadamente inferiores en PCa que en la HBP. Cuando los niveles de metilación de Alu o LINE-1 se compararon con los factores clínico-patológicos de PCa, se encontraron asociaciones significativas: (1) entre el nivel de metilación Alu y el nivel de PSA en suero preoperatorio o estadio clínico; y (2) entre el nivel de metilación LINE-1 y el nivel de PSA sérico preoperatorio o la puntuación de Gleason. Los niveles de metilación Alu y LINE-1 fueron significativamente menores en el grupo con PSA elevado que en el grupo de bajo PSA y además, el grupo con alta puntuación de Gleason tenía un menor nivel de metilación LINE-1 que el grupo con baja puntuación de Gleason, y el grupo que tenía una etapa avanzada de PCa tenía menor nivel de metilación de Alu que el grupo en etapas menos avanzadas [57].

El citocromo P450 1B1 (CYP1B1) es un miembro de la familia de genes CYP1, los cuales son una familia multigénica de enzimas inducibles expresadas constitutivamente, que participan en la activación metabólica oxidativa, la desactivación de los carcinógenos [59], en la hidroxilación de los estrógenos y la activación de carcinógenos potenciales. Los metabolitos de CYP1B1 se sabe que inducen cáncer de próstata en un modelo experimental animal [60]. Tokinaze y cols describieron que las regiones promotoras de CYP1B1 fueron relativamente hipometiladas en tejido de PCa en comparación con el tejido de HBP, indicando que el aumento de expresión de CYP1B1 en cáncer de próstata humano se relaciona con hipometilación de CpG en su región promotora, mientras que la desmetilación de la región promotora de CYP1B1 es un evento epigenético que se produce durante el proceso de la iniciación del tumor en cáncer de próstata. Por lo tanto, la hipometilación del gen CYP1B1 puede desempeñar un rol más importante en la iniciación que en la progresión de los tumores de próstata [59].

#### 5.8 Hipermetilación en Cáncer de Próstata

La relación entre la metilación de citosina en la posición C5 en secuencias CpG y el desarrollo cáncer está bien establecida [61]. La generación del cáncer está acompañada por cambios dramáticos en el perfil de metilación, de tal manera que la desmetilación global del genoma se produce en paralelo con la hipermetilación de CpG en genes específicos fuertemente vinculadas a su inactivación transcripcional [61].

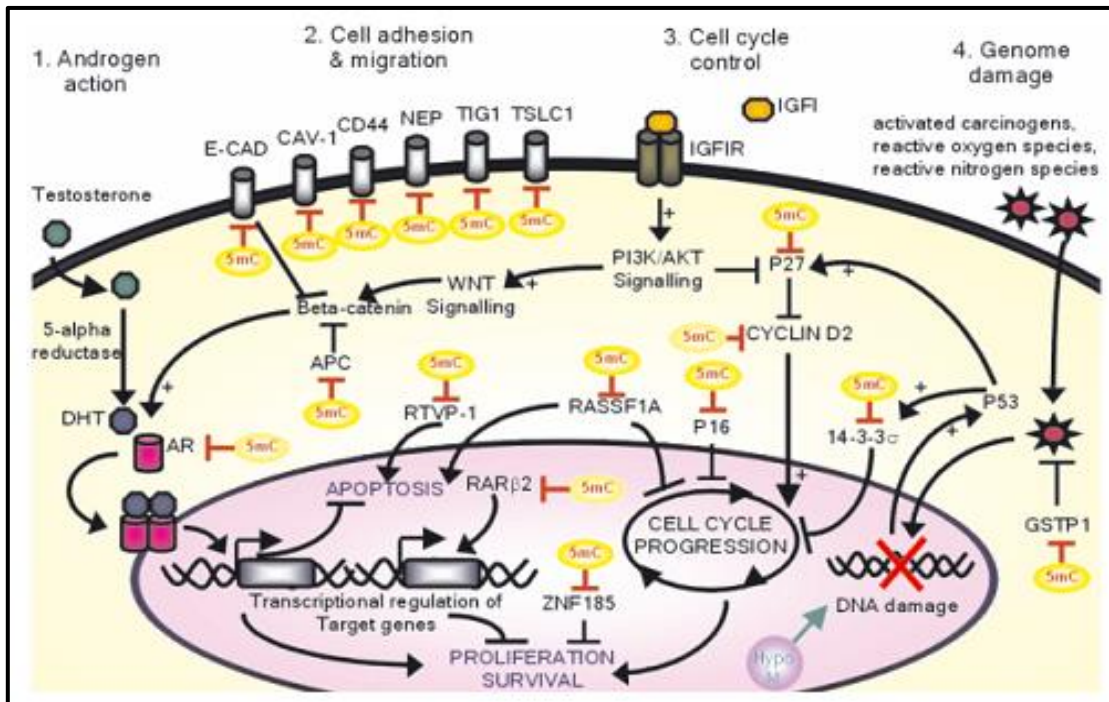
Significativamente, muchos de los genes afectados codifican proteínas que están implicadas en procesos críticos celulares y/o tienen actividad supresora de tumores. Dentro de las vías que generalmente se ven alteradas por la metilación de las islas CpG incluyen la reparación de daños del ADN, respuestas hormonales, la invasión/metástasis de las células del tumor, y el control del ciclo celular. Para muchos de estos genes, la hipermetilación del promotor es a menudo el mecanismo principal o único subyacente a la pérdida de función en el cáncer de próstata. El silenciamiento inapropiado de estos genes puede contribuir a la iniciación del cáncer, la progresión y la metástasis. Algunas de las hipermetilaciones se producen durante la progresión tumoral a lo largo del proceso de múltiples etapas de la carcinogénesis de próstata; algunos se correlacionan con el grado patológico o estadio clínico del cáncer de próstata; algunos contribuyen a la invasión, metástasis y la independencia de andrógenos de cáncer de próstata [16,53].

## 5.9 Rutas afectadas por hipermetilación en Cáncer de Próstata

Diversos procesos celulares son afectados por la hipermetilación del ADN en la carcinogénesis del cáncer de próstata, como son la reparación de daño del ADN, control del ciclo celular, apoptosis, invasión/metástasis, respuesta hormonal y metabolismo celular (Ver Figura 10).

### 5.9.1 Reparación del daño de ADN

Aunque no se conocen las causas específicas de cáncer de próstata, se han implicado diferentes mecanismos, como los andrógenos, estrógenos, la inflamación, y la capacidad de reparación del ADN. El ADN está constantemente dañado por los radicales libres de oxígeno endógenos y productos químicos exógenos, la exposición constante a estas especies puede producir daños en el ADN como mutaciones. Se estima que las mutaciones del ADN se producen de forma espontánea entre 20.000 y 40.000 veces al día, pero existen vías de reparación que están disponibles para revertir los diferentes tipos de daño en el ADN. Más de 150 enzimas implicadas en reparación del ADN participan en este proceso. Los defectos en estas vías de reparación pueden aumentar mutaciones persistentes en generaciones de células hija, inestabilidad genómica, y en última instancia, un riesgo de cáncer de próstata [62]. Por lo tanto la reparación del ADN es un mecanismo de corrección que mantiene la estabilidad del genoma durante la replicación o después de daño en el ADN. Las células defectuosas de los componentes de las vías de reparación del ADN presentan mayores tasas de mutaciones espontáneas de ADN que pueden conducir al cáncer [16]. Existen varias vías de reparación del ADN distintas, y la reversión de la vía de reparación puede ser importante en la carcinogénesis en la próstata (Ver Figura 10) [62].



**Figura 10: Resumen de algunas vías afectadas por la hipermetilación en la patogénesis de cáncer de próstata.** (1) Conversión de testosterona a dihidrotestosterona (DH) que permite la transactivación del receptor de andrógeno (AR). Esto facilita la regulación transcripcional de genes blancos de AR, lo cual conduce a un aumento en la proliferación y reducción de apoptosis. (2) La función de proteínas de adhesión celular inhibida por hipermetilación del promotor durante la invasión y metástasis. (3) Hipermetilación conduce a la pérdida de función de proteínas reguladoras del ciclo celular permitiendo un descontrol de la proliferación. (4) La metilación del promotor de enzimas involucradas en la detoxificación y la global hipometilación promueve daño en el genoma [63].

#### 5.9.1.1 GSTP1

Las Glutathión S-transferasa (GST) son enzimas que desintoxican xenobióticos, carcinógenos ambientales y especies reactivas de oxígeno. Las proteínas GST catalizan la adición de glutathión reducido a sustratos para formar tioléteres, resultando en la formación de productos menos tóxicos y reactivos que se excretan. Las enzimas GST de mamíferos se subdividen en tres grupos principales, incluyendo una familia diversa de genes GST citosólicos que incluyen (Alpha (A) Mu (M), pi (P), Sigma (S), Theta (T), Zeta (Z), y genes Omega (O), el gen GST mitocondrial Kappa (K), y GST microsomal, MAPEG. La actividad de GST es una respuesta asociada a la exposición a compuestos tóxicos y ajenos como medida para reducir la carga mutagénica impuesta por la exposición a estos agentes [64-66].

La hipermetilación del promotor del GSTP1, frecuente en la región promotora ,

es asociado como el biomarcador epigenético ampliamente estudiado en tejido PCa, así como también ha sido ampliamente estudiado en los fluidos corporales, principalmente con motivo para aplicaciones de diagnóstico [67]. Lee y cols. 1996 fueron los primeros en reportar una alta frecuencia de hipermetilación de GSTP1 en los tejidos tumorales de la próstata [68]. Desde entonces, numerosos estudios han confirmado resultados similares. El análisis de la frecuencia de metilación en la región promotora de GSTP1 se ha descrito se produce entre un 36% a 100% en las muestras de tejidos de cáncer de próstata obtenidas por biopsia transrectal [58,65,69-78] y aproximadamente en el 70% de las muestras de neoplasia intraepitelial prostática (PIN) [69,73,78-80], pero rara vez se ve en la próstata histológicamente normal o en hiperplasia benigna prostática [65,72,73,76,78, 81-85]. También es detectado en un 6,4% del subconjunto de las lesiones de atrofia inflamatorias proliferativas (PIA) [61]. La inactivación de GSTP1 por hipermetilación frecuente durante las primeras etapas de la carcinogénesis prostática [80], se produce tempranamente en las neoplasias intraepiteliales prostáticas de alto grado de (HGPIN), lo que sugiere la posibilidad de utilizar GSTP1 para detecta en etapa muy temprana PCa [69,78,79,86].

La metilación de GSTP1 fue también detectada consistentemente con alta frecuencia en muestras distintas de tejido como son muestras de orina, sangre y semen de pacientes con cáncer de próstata, mientras que las muestras de controles sanos muestran niveles de metilación bajos o nulos [84, 85, 87-92]. Las diferencias en las frecuencias de hipermetilación del promotor de GSTP1 entre los tejidos de cáncer de próstata y los tejidos normales lo podrían convertir en un biomarcador de gran utilidad para la incidencia, el progreso, y la recurrencia o la supervivencia del cáncer de próstata [87,91,93].

Los niveles de metilación de GSTP1, además se han asociado de manera positiva con algunos parámetros clínico-patológicos:

- a. Se observó una mayor frecuencia de metilación GSTP1 en la orina en los pacientes con enfermedad en estadio más alto (20% en estadio patológico II vs 100% enfermedad en estadio III).
- b. La frecuencia de metilación de GSTP1 en orina fue alta en hombres con un aumento de los niveles séricos de PSA, incluyendo 20% en aquellos con PSA <4 ng/ml o menos vs 74% en aquellos con PSA mayor de 4 ng/ml [94].

La hipermetilación de GSTP1 también se asoció significativamente con la diferenciación de cáncer en el grupo CRPC. Once de 24 pacientes (46%) con la puntuación de Gleason  $\geq 8$  mostraron altos niveles de hipermetilación, en comparación con dos de los 22 pacientes (9%), con una puntuación de Gleason  $<8$ . Además, se encontró una correlación significativa de hipermetilación de GSTP1 y la presencia de metástasis en el grupo CRPC un 53% de los pacientes (10 de 19) con metástasis en los ganglios linfáticos mostraron hipermetilación de GSTP1, en comparación con el 18% de los pacientes (7 de 38) que no tenían metástasis de los ganglios linfáticos. Por lo tanto, los resultados obtenidos por Reinbenwein y cols. encontraron una correlación significativa de la hipermetilación de GSTP1 con puntuación de Gleason  $\geq 8$  y también una correlación significativa con la enfermedad metastásica [89,95].

La prostatectomía radical (PR) es frecuentemente utilizada en el PCa localizado, pero aproximadamente el 25-40% de los pacientes con el tiempo experimentar recurrencia bioquímica (BCR) con posterioridad. La concentración elevada de PSA en suero en una o dos ocasiones después de la prostatectomía es considerado como BCR y es el primer signo de recurrencia del cáncer. Los pacientes con BCR tienen un muy mal pronóstico y, a menudo desarrollan metástasis y posteriormente morir de la enfermedad. BCR es utilizado como indicador de agresividad, un tratamiento adyuvante inmediatamente después de PR, puede ser beneficioso para los pacientes con alta probabilidad de desarrollar BCR [86].

En base a los resultados obtenidos por Maldonado y cols., se demostró que la hipermetilación de GSTP1 en el tejido PCa se asoció con un mayor riesgo de recurrencia después de considerar los factores pronósticos que se utilizan actualmente. Esta asociación estuvo presente en hombres con enfermedad en estadio temprano y posiblemente en los hombres con una puntuación de Gleason de 7 o más. Por lo cual, la hipermetilación de GSTP1 podría representar un biomarcador prometedor para un mayor estudio de su capacidad predictiva de recidiva, incluso en hombres con PCa en etapa temprana y/o puntuación de Gleason intermedio (GS=7) [96].

El estudio de Mahon y cols., identificó GSTP1 metilado (mGSTP1) en plasma como un potencial marcador epigenético de pronóstico y respuesta terapéutica en CRPC. Los niveles plasmáticos detectables de mGSTP1 en CRPC se asociaron con una peor supervivencia, con independencia del tratamiento citotóxico. Además, el mGSTP1 en plasma es detectable después del primer ciclo de la quimioterapia y se puede asociar

con enfermedad progresiva independientemente de respuesta a la quimioterapia [97].

En base a estos resultados el ADN del cáncer de próstata, evaluada por la hipermetilación de GSTP1, en suero preoperatorio de los hombres con cáncer de próstata localizado, se puede asociar con un mal pronóstico, lo cual puede deberse a las características de los tumores más agresivos (es decir, un mayor acceso a la circulación, aumenta la renovación celular y la presencia de micrometástasis). Por lo tanto niveles elevados de metilación de GSTP1 en suero preoperatorio de pacientes con PCa, es decir pre-prostatectomía radical, pueden ser candidatos apropiados para la terapia adyuvante, debido a que la presencia de mGSTP1 en suero es un indicador de BCR [72].

#### 5.9.1.2 HSPB1

La Proteína de choque térmico 27 (Hsp-27), codificada por el gen HSPB1, es una proteína anti-apoptótica que induce la homeostasis intracelular y permite la reparación y recuperación celular después de noxas físicas y químicas. Durante la carcinogénesis temprana de la próstata, la expresión de Hsp-27 se anula universalmente, pero puede ser re-expresada posteriormente, en cuyo caso el tumor maligno desarrolla un fenotipo agresivo [84, 88]. Aunque Hsp-27 es expresada constitutivamente en la mayoría de las células humanas, la sobreexpresión inducida durante la carcinogénesis puede conducir a aumento de la supervivencia de las células malignas. Anteriormente se, había descrito que la progresión de la neoplasia *in situ* un tumor maligno está invariablemente acompañada por el declive de las proteínas Hsp-27. A partir de entonces, el posterior desarrollo de malignidad invasiva puede estar acompañado por la re-expresión de Hsp-27 en el 30% de los casos que son generalmente agresivos. Un estudio de Vasilej y cols. determinó que el nivel de metilación de HSPB1 y la puntuación de Gleason se correlacionan de manera negativa, lo cual sugiere que el aumento de la metilación de HSPB1 es un marcador de mal pronóstico en los hombres con baja puntuación de Gleason quienes previamente han sido considerados como de bajo riesgo [98].

#### 5.9.1.3 UCHL-1

La hidrolasa ubiquitina C-terminal L1 (UCHL1), es una enzima encargada de deubiquitinar, es miembro de la familia UCH DUBs. Aunque estudios anteriores

demuestran un supuesto papel de UCHL1 en diferentes tipos de tumores, el mecanismo oncogénico exacto aún no está claro. La desregulación de UCHL1 se ha observado en tumores sólidos tales como cáncer de páncreas, cáncer de pulmón de células no pequeñas, el cáncer colorrectal, osteosarcoma, y cáncer de esófago [99]. Además, se ha informado que la sobreexpresión se asocia UCHL1 con la progresión tumoral, el tamaño y la invasividad tumoral [99].

La supresión de la expresión de UCHL1 en los tejidos tumorales primarios de próstata está ligada a la metilación del promotor [99]. Esta hipermetilación está correlacionada con una baja transcripción y los niveles de proteína de UCHL1 en el cáncer en comparación con el epitelio adyacente benigno de la próstata [99]. En líneas celulares de PCa (LNCaP), UCHL1 inhibe el crecimiento celular. En las células cancerosas, el crecimiento y el potencial metastásico se han relacionado con la vía AKT/PI3 quinasa, que es regulada de manera negativa por el supresor tumoral p53. Ummani y cols., encontraron que en líneas celulares de PCa que expresaban UCHL1 había un aumento significativo de p53, lo que establece una asociación entre la expresión de UCHL1 con la actividad supresora tumoral de p53. Basandonos en esto la supresión de UCHL1 inhibe la señalización de p53 aumentando de esta manera el eje de fosforilaciones de AKT, lo cual conlleva a la progresión de PCa. Pero para evaluar a UCHL1 como un potencial marcador molecular para el cáncer de próstata necesita ser evaluado en una cohorte de gran número de pacientes [99].

#### 5.9.1.4 Nrf2

Nrf2 es un factor de transcripción que regula la expresión de muchas enzimas antioxidantes/detoxicantes de fase II, tales como glutatión S-transferasa (GST), UDP-glucuronosiltransferasa (UGT), hemoxygenasa-1 (HO-1), NADP(H): quinona oxidoreductasa (NQO), ligasa cisteína glutamato (GCL) y gamma glutamilcisteína sintetasa ( $\gamma$ GCS), mediante la unión en combinación con proteínas Maf a elementos de respuesta antioxidante (Ares) en regiones promotoras.. Por lo tanto, Nrf2 es un citoprotector, ya que media la reducción de la toxicidad de los productos intermedios reactivos, y protege las células contra la oxidación o electrófilos y mantiene la homeostasis química celular. Usando muestras de HBP obtenidas de pacientes tratados con prostatectomía transuretral para determinar metilación de Nrf2, se ha demostrado que Nrf2 se regula epigenéticamente través de la metilación del ADN en su promotor de manera diferencial en los tejidos de PCa clínicos y células LNCaP humanos y

disminuyeron significativamente en el tejido BPH [100].

Se ha estudiado muestras de cáncer de próstata estimulado por andrógeno (AS-PCa) obtenidas de pacientes tratados por PCa por prostatectomía y muestras de tumores recurrente de cáncer de próstata con terapia de privación de andrógenos (ADT-RPCa). Los resultados de Khor y cols., sugieren que el estado de metilación Nrf2 puede contribuir a la regulación de la actividad de Nrf2 en su función antioxidante/detoxificante citoprotectora [100].

En la Tabla N° 3 se resumen algunos estudios relacionados con genes involucrados en la reparación del ADN, cuya hipermetilación ha sido descrita en muestras de PCa.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
GSTP1	Glutation-S-Transferasa pi 1	Tejido PCa	91,8%	MSP	[65]
		Tejido HBP	3,8%		
		Biopsias inicialmente negativas	43%	QMS	[101]
		Tejido PCa	90,3%	MSP	[82]
		Tejido HBP	0%		
		Líneas celulares PCa	100%	qPCR	[102]
		HBP	0%		
		Plasma PCa	11/36 (30,6%)		
		Plasma HBP	2/27 (7,4%)	MS-HL PCR	[97]
		Tejidos PCa	22/22		
		Plasma	35/172 (20%)		
		Celulas tumorales circulantes (CTC)	74/172 (43%)	qPCR	[72]
		Plasma			
		Tejido PCa localizado	21/21 (100%)		
		Tejido HBP	0/13 (0%)	QMS	[73]
Suero preoperatorio	10/85 (12%)				
Biopsias inicialmente negativas	5/18 (28%)				
Tejido PCa	86,3 %	MSP	[94]		
Tejido PIN	60%				
Tejido HBP	24%				
Orina PCa	75%	qPCR	[83]		
HBP	29%				
Tejido PCa	88%				
HBP	9%	MSP	[89]		
NTAT (Tejido neoplásico adyacente a tumor prostático)	42%				
Tejido PCa	84,1%				
Plasma/suero HRPC	20/62 (32%)	MSP	[84]		
PCa en fase inicial	3/14 (21.4%)				
Controles	0/49 (0%)				
Tejido PCa	88%	MSP	[88]		
Tejido HGPIIN	50%				
Tejido Normal	0%				
Orina post-DRE	24%	MSP	[88]		
Orina post-biopsia	18%				

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
GSTP1	Glutation-S-Transferasa pi 1	Tejido PCa	64,1%	MSP	[74]
		Tejido HBP	8,7%		
		Tejido PCa	21%	MSP	[75]
		Celulas circulantes PCa con BCR	100%	QMSP	[103]
		PCa	91%		
		Tejido PCa	75%	MSP	[76]
		Tejido Normal	0%		
		Orina PCa	48%	QMSP	[91]
		Orina normal	0%		
		Tejido PCa	60%	MSP	[77]
		Tejido PCa	80%	MSP	[78]
		Tejido HGPIN	28,1%		
		Tejido Normal	10%		
		Orina PCa	81%	qPCR	[90]
		Plasma PCa	39%		
Tejido PCa	93%	QMSP	[84]		
Tejido HBP	15%				
Celulas libres PCa después de PR	42,3%	MSP	[92]		
Tejido PCa después de TURP	80%				
Tejido HBP	7,1%				
Tejido Normal	0%				
Tejido PCa	94,9%				
Tejido HGPIN	76,3%	QMSP	[69]		
Tejido HBP	0%				
Tejido PCa	75%				
Tejido HBP	0%	qPCR	[79]		
Tejido PCa	90,3%	RT-PCR	[66]		
Tejido HBP	0%				
HSBP1	Hsp-27	Tejido congelado fresco		PCR/ Pirosecuenciación	[98]
		Tejido PCa	14%		
		Tejido HBP	1%		
		FFEP			
		Tejido PCa	5%		
Tejido HBP	1%				
UCLH-1		Tejido PCa	18/20 (90%)	MSP	[99]
		Tejido prostático normal	3/20 (15%)		
Nrf2		Tejido AS-PCa	25,3%	MAQMA	[100]
		Tejido ADT-RPCa	43,6%		
		Tejido HBP	19,6%		

**Tabla N° 3: Genes asociados a reparación del daño del ADN hipermetilados en PCa.**

## 5.9.2 Control del ciclo celular

Una característica distintiva de las células tumorales es su capacidad de proliferar de manera no controlada. Esto es a menudo causado por una alteración de la regulación de los sistemas que controlan el ciclo celular. El ciclo celular tiene varios puntos de control que son regulados por proteínas que actúan para inhibir la progresión del ciclo celular. Una baja regulación de dichas proteínas pueden conducir al crecimiento acelerado del tumor y la progresión del cáncer [16]. Cuando los genes del ciclo celular están defectuosos o inactivados transcripcionalmente, pueden conducir a la carcinogénesis y la progresión del cáncer de próstata [62].

### 5.9.2.1 RASSF1A

La sobreexpresión de la proteína de la familia asociada al dominio Ras 1 isoforma A (RASSF1A) detiene las células en mitosis temprana. La ausencia de RASSF1A hace que las células hagan la mitosis a un ritmo acelerado. El gen RASSF1A, que ha sido ampliamente investigado, es un gen supresor tumoral putativo (TSG), ubicado en la región cromosómica 3p21.3 y que está funcionalmente asociado con el control del ciclo celular, la estabilización de los microtúbulos, la adhesión celular, la motilidad y la apoptosis [16,104]. Por lo tanto, RASSF1A regula un punto de control del ciclo celular que controla la progresión mitótica, y la pérdida de expresión RASSF1A podría acelerar el crecimiento del tumor y la progresión del cáncer [104]. La proteína RASSF1A se encuentra asociada con proteínas de reparación del ADN que median el efecto apoptótico de Ras. La inactivación de RASSF1A puede resultar en la desregulación del sistema de reparación del ADN y el control del crecimiento dependientes de Ras en células cancerosas [104,105].

El promotor del gen RASSF1A es silenciado por hipermetilación en una variedad de cánceres humanos. En muestras de cáncer de próstata, la metilación del promotor de RASSF1A es un evento, que ocurre entre el 54 al 96% de las muestras, en un 64% de las muestras con neoplasia intraepitelial PIN, mientras que en tejido prostático no maligno, se detecta metilación de RASSF1A entre el 0 al 40% de las muestras [69, 75,79,84,87,106-108].

Se ha descrito también que los niveles de metilación se asocian positivamente con la puntuación de Gleason (GS), el estadio tumoral en muestras de tejido [105-107,

110], los niveles de PSA [104, 106, 110], volumen del tumor [110] y con la edad [109]. Por otro lado, no se observa asociación con GS, mientras que se observa una asociación negativa con los niveles de PSA y el estadio tumoral en muestras de orina [104], lo que sugiere que la inactivación de RASSF1A está asociada a etapas avanzadas de PCa.

Usando un análisis multivariado de la metilación de RASSF1A junto con el estadio patológico y la puntuación de Gleason, en muestras de pacientes con BCR y sin recaída, demostró que el nivel de metilación de RASSF1A fue un predictor significativo de BCR después de la PR en casos de los tumores con puntuación de Gleason  $\geq 6$  cuando se analiza tanto tejido como orina [108,110].

#### 5.9.2.2 PITX2

PITX2 codifica el factor de transcripción de homodominio emparejado-tipo 2, que es inducido por la vía Wnt/beta-catenina, y participa en la regulación de la proliferación específica de células [68,111-113]. Se cree que PITX2 es un regulador de la señalización río arriba del receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 y del AR, vinculándola potencialmente a la iniciación y la progresión del PCa [68].

La prostatectomía radical se usa comúnmente como un tratamiento potencialmente curativo en pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado. Sin embargo, un 15 a 30% de los pacientes tiene recidiva bioquímica con elevación del antígeno prostático específico [111]. En consecuencia, resulta importante estratificar a los individuos basados en la probabilidad de recurrencia de cáncer en los hombres con alto o bajo riesgo de progresión del cáncer, y se ha propuesto que la metilación de PITX2 podría ser utilizada como un buen predictor de la BCR (recidiva bioquímica) después de la prostatectomía radical (PR) [111]. Lo anterior debido a que la hipermetilación de PITX2 se correlaciona de manera positiva con el estadio tumoral, por lo tanto es más pronunciada en las etapas avanzadas del cáncer (pT3 o pT4 vs. pT2) [113,114]. Además se ha descrito que la hipermetilación de PITX2 se correlaciona con el tamaño del tumor, la puntuación de Gleason y el PSA preoperatorio [114].

La estratificación de individuos basado en la probabilidad de recurrencia de cáncer en los hombres con alto riesgo de progresión de cáncer de próstata y los hombres con bajo riesgo es muy importante, debido a que después de la

prostatectomía radical solo entre un 15 a un 30% de los hombres presentan un aumento de los niveles de PSA, que es indicador de recidiva bioquímica (BCR) [108, 111]. Se ha descrito que la metilación de PITX2 puede ser utilizado como un buen predictor de la BCR después de la prostatectomía radical (PR). Esto debido a que la hipermetilación de PITX2 es más pronunciada en las etapas superiores (pT3 o pT4 vs. pT2) y se correlacionan significativamente [113,114]. Además se ha descrito que la hipermetilación de PITX2 se correlaciona con el contenido de las células tumorales, la puntuación de Gleason y PSA preoperatorio [114].

Bañez y cols. demostraron que la tasa de supervivencia libre de recidiva bioquímica 5 años después de la cirugía fue de 85% y 61% en los grupos de bajo y alto grado de metilación respectivamente, lo cual refuerza los resultados de Weiss y cols., que encontraron que la probabilidad estimada de 8 años de ausencia de BCR era de un 94% en el grupo con bajos niveles de metilación y un 79% en el grupo de altos niveles de metilación de PITX2 [115]. El riesgo relativo de recidiva bioquímica fue dos veces mayor para los pacientes con niveles altos de metilación que para los de baja metilación de PITX2, en una cohorte de hombres con cáncer de próstata con Gleason 7 [112].

Estos datos sugieren que la determinación de metilación PITX2 inmediatamente después de la PR permitiría la identificación precoz de los pacientes asignados a la categoría de riesgo intermedio por parámetros clínico-patológicos comunes pero que están en alto riesgo de BCR. EL análisis de metilación PITX2 podría proporcionar un medio valioso para definir mejor los grupos de pacientes de PCa y, por lo tanto, la ayuda en la selección de los pacientes en los que la terapia de rescate adyuvante/temprana puede estar justificada [115]. Y puede ser utilizado como un biomarcador para predecir la enfermedad agresiva en los hombres con baja puntuación de Gleason que son clasificados como grupo de bajo riesgo [116].

#### 5.9.2.3 Stratifina (SFN/14-3-3 $\sigma$ )

El gen 14-3-3 $\sigma$  es un gen supresor tumoral putativo regulado por p53, involucrado en la regulación del ciclo celular y la apoptosis después de daño en el ADN. En respuesta al daño del ADN, 14-3-3 $\sigma$  fuerza un arresto del ciclo celular en G2/M mediante la inhibición de la entrada al núcleo del complejo Cdc2/Ciclina B, secuestrándolo en el citoplasma. Esto permite la reparación del ADN antes de la

progresión del ciclo celular [53, 117].

La pérdida de expresión 14-3-3 $\sigma$  es un evento muy frecuente relacionado con la progresión del epitelio normal a PIN y cáncer de próstata invasivo. La expresión de 14-3-3 $\sigma$  es moderada o fuerte en las muestras de epitelio normal, mientras que 90% de PIN y el 97% de cáncer de próstata invasivo muestran expresión negativa o débil, respectivamente [89, 118]. La pérdida de expresión de la proteína 14-3-3 $\sigma$  en las lesiones PIN, que representan los precursores de PCa indica que la inactivación de 14-3-3 $\sigma$  es un evento temprano durante la progresión del PCa [118].

El gen 14-3-3 $\sigma$  sufre silenciamiento epigenético mediante metilación del ADN en su región promotora y es frecuente en varios tipos de cáncer, incluyendo cáncer de próstata, lo que sugiere que la pérdida de expresión 14-3-3 $\sigma$  puede ser causalmente implicada en la progresión del tumor[119-121]. Esto se fundamenta en estudios que demuestran la hipermetilación de las islas CpG del promotor y el silenciamiento del gen 14-3-3 $\sigma$  en 41 de 41 (100%) de cáncer de próstata primario y en neoplasia intraepitelial prostática (PIN), pero no en tejidos normales de la próstata o tejidos que presentan hiperplasia benigna (HBP) [118,122].

Esto se contradice con los resultados obtenidos por Reinbeinwein y cols., que encontraron que la hipermetilación fue detectable en 99% de cáncer de próstata, 100% de PIN, y 100% de muestras de tejido de HBP, respectivamente [89]. Esto nos podría indicar que la hipermetilación 14-3-3 $\sigma$  no es un evento específico de la carcinogénesis y por lo tanto, la metilación del promotor de 14-3-3 $\sigma$  no puede ser un marcador específico para el cáncer de próstata [89].

#### 5.9.2.4 CDKIs

Los inhibidores de quinasas dependientes de ciclina (CDKIs) inhiben la progresión del ciclo celular y por lo tanto son considerados como supresores de tumores. CDKN2A (*p16<sup>INK4</sup>*), una proteína clave en la vía de señalización, puede ser dañada por una variedad de cambios genéticos y epigenéticos incluyendo hipermetilación en el cáncer de próstata. La expresión aberrante de CDKI se observa en muchos tejidos tumorales incluyendo el de próstata [16,69]. Los experimentos utilizando 5-aza-dC, que es un inhibidor de la actividad de DNMT, indican que la inactivación mediada por metilación del gen CDKN2A (*p16<sup>INK4a</sup>*) se produce en líneas

celulares de cáncer de próstata [58,81,87,91]. Herman y cols. fueron los primeros en informar la inactivación de CDKN2A por metilación del ADN en el cáncer de próstata, desde ahí se ha investigado el papel de CDKN2A hipermetilado en la carcinogénesis y la progresión de cancer de próstata [58,81,91,123]. Sin embargo Las frecuencias reportadas de metilación del promotor de CDKN2A son inconsistentes en los tumores de próstata, que van desde 0 a 77%[58,69,81,87,91,123-124]. Quizás estos resultados inconsistentes se deben a diferentes métodos de detección y/o diferentes objetivos del loci metilado. Los estudios se han centrado principalmente en el exón 2 de CDKN2A, no se ha descrito una asociación significativa entre la baja expresión de CDKN2A y el aumento de metilación en el exón 2 de CDKN2A. Estos resultados fueron confirmados por otros investigadores, Konishi y cols. que observaron que la metilación se produjo en la región promotora en 9% de las muestras y en el exón 2 en 66% de los tumores. Jerónimo y cols. encontraron que el gen CDKN2A fue metilado con frecuencia en el tejido tumoral (77%) y en la hiperplasia prostática benigna (BPH), lo cual se contradice con el estudio de Henrique y cols. que demostraron metilación de CDKN2A ( $p16^{INK4}$ ) en todos los tejidos prostáticos (PCa, HGPIN, HBP, normal), por lo tanto no se podría sugerir el potencial rol de  $p16^{INK4}$  como biomarcador de la progresión de PCa.

Otro CDKI, el CDKN2A/ $p14^{ARF}$ , generado a partir de un proceso de corte y empalme alternativo que sustituye el primer exón de  $p16^{INK4a}$ , ha sido conocido como un supresor de crecimiento. Además, alteraciones epigenéticas de  $p14^{ARF}$  pueden afectar vías  $p16^{INK4a}/RB1$  en la tumorigénesis y la progresión de la próstata cancer.  $p16^{INK4a}$  y  $p14^{ARF}$  son frecuentemente cometiladas, lo que puede desregular la vía RB1 o p53. El promotor de CDKN2A ( $p14^{ARF}$ ), se ha descrito estar metilado en varios tipos de cáncer, incluyendo de cancer de próstata [69,81,87,91,124]. Las frecuencias de metilación descritas para  $p14^{ARF}$  por la mayoría de los estudios publicados reportan bajas tasas de metilación que van desde 0% hasta 6%. Por lo tanto, la  $p14^{ARF}$  tampoco sería un buen candidato como un biomarcador de PCa

#### 5.9.2.5 RIZ1

RIZ1 es una metiltransferasa de histonas (HMT) específica para el residuo de lisina 9 de la histona H3, actividad conocida por estar vinculada con represión transcripcional. RIZ1 es considerado un gen supresor de tumor, ya que puede inducir la detención del ciclo celular en G2/M, apoptosis en varios tipos de células cancerosas [125]. Se ha descrito que en el 31% de los tejidos tumorales la metilación del ADN en

RIZ1, está presente. Hasegawa y cols., describieron que la metilación de RIZ1 ocurre en aproximadamente el 40% de las muestras de pacientes con PCa y que los niveles de metilación son más frecuentes en aquellas muestras que tienen mayor puntuación de Gleason, sugiriendo que la metilación de ADN del gen RIZ1 puede estar asociado con la carcinogénesis de próstata [125]. No se encontró asociación estadística entre el nivel de metilación del ADN del gen RIZ1 con las características clínico-patológicas, debido a que la metilación del ADN de RIZ1 es un evento raro en tejidos de la próstata no malignos [125]. El estudio de Susuki y cols. informaron que la frecuencia de metilación era mayor en PCa que en los tejidos normales de la próstata [126]. Para poder inferir si RIZ1 es un potencial marcador de PCa se necesita el desarrollo de más estudios que comprueben o refuten esta propuesta.

#### 5.9.2.6 PTGS2

PTGS2 codifica la ciclooxigenasa-2 (COX-2) una endoperoxidase sintasa-2, de prostaglandinas, una enzima proinflamatoria necesaria para la biosíntesis de prostaglandinas. Promueve la carcinogénesis por estimular el crecimiento celular, la supervivencia, la invasividad, y neoangiogénesis [68]. Varios estudios han informado la hipermetilación del promotor de PTGS2 en PCa [81,85,92,127]. También se ha detectado hipermetilación de PTGS2 en muestras de fluidos corporales de pacientes de PCa. Los estudios que han estudiado asociaciones entre metilación de PTGS2 post-prostatectomía en cáncer e hiperplasia benigna usando qMSP han arrojado resultados contradictorios, dos estudios realizados en muestras de tejido PCa han encontrado diferencias entre los niveles de metilación al comparar las muestras de pacientes con PCa con los pacientes con HBP, en cambio el estudio de Ellinger y cols., realizado en muestras de suero de pacientes con PCa y HBP no encontraron diferencias en metilación entre las muestras [92,104,127]. Yegnasubramanian y cols. demostraron que la alta metilación de PTGS2 se encontró para indicar cuatro veces más el riesgo de BCR después de ajustarla con la puntuación de Gleason, estadio tumoral, y PSA preoperatorio [81].

Otro estudio [127] encontró que la hipermetilación combinada de PTGS2 y CD44 dieron casi nueve veces mayor riesgo de BCR ajustado para la puntuación de Gleason. Por último, Ellinger y cols no encontraron ninguna correlación significativa entre el estado de metilación PTGS2 y BCR. De acuerdo con ello, una mayor investigación en cohortes más grandes es necesaria para evaluar el valor pronóstico

potencial de PTGS2 metilación en PCa.

#### 5.9.2.7 HIC1

El supresor tumoral hipermetilado en cáncer 1 (HIC1) es un represor transcripcional, que se silencia epigenéticamente en tumores sólidos [68].

Resultados previos sugieren que HIC1 puede estar implicada en la tumorigénesis. Diversos estudios han investigaron la metilación en la región promotora de HIC1 en los tumores de próstata. Los resultados indicaron que las isla CpG en el HIC1 fueron metiladas en 89 a 100% de los tumores de próstata [81,126,128]. Sin embargo, el estado de metilación de HIC1 en los tumores de próstata es similar a los respectivos tejidos normales, aunque una alta proporción de tumores se encuentran metilados. Por lo tanto, la metilación del ADN de HIC1 no es buen candidato como marcador de pronóstico para la progresión o principios detección de cáncer de próstata

En la Tabla N° 4 se resumen algunos estudios relacionados con genes involucrados en el control del ciclo celular, cuya hipermetilación ha sido descrita en muestras de PCa.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>	
RASSF1A	Proteína de la familia asociada a dominio Ras 1 isoforma A	Tejido PIN	4/14 (29%)	PCR/ secuenciación	[107]	
		Tejido normal	5/11 (45%)			
		Tejido HBP	0/12 (0%)			
		Orina		QMSP	[110]	
		PCa	45%			
		HBP	44,7%			
		Tejido PCa		80/148 (54,1%)		
		Tejido HBP				
		Tejido PCa	97/131 (74%)		[105]	
		Tejido HBP	12/65 (18%)			
Tejido PCa	99,2%	QMSP	[69]			
Tejido HGPIN	100%					
Tejido HBP	93,3%					
Tejido PCa	88%	qPCR	[79]			
Tejido HBP	0%					
Orina PCa	73%	MSP	[91]			
Orina normal	11%					

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
RASSF1A	Proteína de la familia asociada a dominio Ras 1 isoforma A	Celulas circulantes		QMSP	[87]
		PCa con BCR	100%		
		PCa	95%		
		Tejido PCa	29%	MSP	[129]
		Tejido PCa	83%	MSP	[84]
		Tejido HGPIN	30%		
		Tejido Normal	0%		
PITX2	Factor de transcripción de homodominio emparejado tipo 2	Tejido PR	23,3%	qPCR	[113]
		Tejido benigno	1- 11,7%		
		Tejido PR (Gleason <7)	201/309 (65%)	qPCR	[115]
		Tejido PR (Gleason >7)	30/121 (25%)		
14-3-3 $\sigma$	Stratifina	Linea celular LNCaP	93%	qPCR	[119]
		Plasma/suero HRPC	33/38 (86,8%)	MSP	[89]
		PCa en fase inicial (RT)	12/14 (85,7%)		
		Controles	27/49(55,1%)		
		Líneas celulares de PCa		QMSP	[78]
		LNCaP	100%		
		DU-145	6,3%		
		PC-3	6,1%		
		22RV-1	14,9%		
<i>p16<sup>INK4</sup></i>		Tejido PCa	117/118	QMSP	[123]
		Tejido HGPIN	38/38		
		Tejido HBP	24/30		
		Tejido Normal	11/11		
		Líneas celulares de PCa	4/4		
		Celulas circulantes		QMSP	[87]
		PCa con BCR	20%		
PCa	9%				
		Orina PCa	37%	MSP	[91]
		Orina normal	0%		
		Tejido PCa	77,1%	QMSP	[69]
		Tejido HGPIN	81,6%		
		Tejido HBP	83,4%		

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
<i>p14<sup>ARF</sup></i>		Celulas circulantes PCa con BCR PCa	20% 9%	QMSP	[87]
		Tejido PCa Tejido HGPIN Tejido HBP	4,2% 2,6% 13,3%	QMSP	[69]
PTGS2	Prostaglandina endoperoxido sintasa 2	Tejido PCa Tejido HBP	68% 15%	QMSP	[85]
		Tejido PCa con BCR Tejido PCa sin BCR	63,6% 28,6%	QMSP	[127]
		Suero PCa HBP	2,4% 0%	MSP	[92]
RIZ1	Metiltransferasa de Histonas	Tejido PCa	20/47 (42,6%)	MSP	[125]
		Tejido PCa Tejido Normal	31% 3%	MSP	[126]

**Tabla N° 4: Genes asociados al ciclo celular hipermetilados en PCa.**

### 5.9.3 Apoptosis

La muerte celular programada (apoptosis) es un proceso crítico para la carcinogénesis en humanos. Características morfológicas típicas de apoptosis son los daños de la membrana plasmática, condensación y fragmentación del núcleo, y la fragmentación del ADN [62].

#### 5.9.3.1 TMSC1/ASC

TMS1 (Objetivo de silenciamiento inducido por metilación), también conocido como ASC, es un gen supresor de tumores que codifica para la proteína CARD que es una proteína reguladora que promueve la apoptosis en una vía dependiente de caspasa 9. Se ha demostrado que TMS1/ASC se une con varias proteínas como Pyrin, Ipaf y copyrin/PYPAF1. Además de su papel en el desarrollo del cáncer existe una amplia evidencia que sugiere está involucrado en la respuesta inmune, NF-κB y la activación de caspasa 1 [130-132].

TMSC1/ASC se encuentra silenciado en PCa, producto de la metilación de su promotor, se ha encontrado que un 63% de los tejidos de PCa se encuentran metilados

contra un 35,3% encontrados para la HBP [130], además se encontró que en pacientes con PCa de raza negra y blanca el porcentaje de metilación era similar (66,7% y 62,2% respectivamente), sin embargo la prevalencia tuvo diferencia significativa entre la raza blanca y los controles con HBP (62,2% y 22,7% respectivamente), no así entre la raza negra y los controles con HBP, en donde la prevalencia no fue distinta entre ambos grupos (66,7% y 58,3% respectivamente). Además la metilación de TMS1/ASC se correlaciona con los tumores cuya puntuación de Gleason era sobre 7. Esto indica que las diferencias en el patrón de metilación de TMS1/ASC en HPB entre los grupos étnicos podrían explicar las diferencias entre los diferentes grupos raciales en la susceptibilidad a cáncer de próstata [130].

La metilación de TMS1/ASC en cáncer de próstata descrito por Collard y cols. (PCa > HGPIN > normal), sugiere que la metilación de TMS1/ASC representa un evento temprano en el desarrollo del cáncer la próstata y puede servir como un marcador temprano de la enfermedad, pero es necesario más estudios que confirmen los resultados de este estudio [132].

#### 5.9.3.2 HRK

La apoptosis es conocida por ser activada o inactivada por una variedad de genes, tales como miembros de la familia de genes Bcl-2 y Bcl-XL, kunas, Bak y Bax. HRK fue descubierto originalmente identificado como un gen proapoptótico. HRK pertenece a la familia de las proteínas BH3 que interactúan selectivamente con proteínas promotoras de la supervivencia, Bcl-2 y Bcl-XL; el dominio BH3 inactiva la apoptosis, pero parece no interactuar con las proteínas proapoptóticas como Bax o Bak. Por lo tanto HRK parece ser un componente importante en la regulación de la apoptosis [133].

El estudio de Higuchi y cols. encontró que la hipermetilación del promotor de HRK se asoció significativamente con la pérdida de expresión de la proteína y del ARNm, lo cual indica que la metilación del ADN juega un papel clave en la inactivación de HRK en el cáncer de próstata. Se detectó la metilación del promotor HRK en 14% (3/22) de los tumores GS=6, en 38% (9/24) de los tumores GS=7, en el 100% (2/2) de GS=8 tumores, y en el 25% (cuarto) de cánceres clasificado como GS=9. Utilizando el ensayo TUNEL se detectó una diferencia significativa en la incidencia de apoptosis de células epiteliales entre los tumores con un GS de 5-6 y aquellos con un

GS de 7 o superior (GS 5-6 vs GS 7,  $p < 0,001$ ; GS 5-6 vs GS 8-9;  $P = 0,007$ ). También se detectó una fuerte correlación inversa entre la pérdida de expresión de HRK por IHC y una disminución del índice apoptótico en cánceres GS 5-6 y en cánceres GS 7 ( $P = 0,008$ ,  $p < 0,001$ , respectivamente). Este estudio demostró la asociación entre la apoptosis y la inactivación de HRK sugiriendo que la hipermetilación de genes-apoptóticos asociados puede contribuir a la aberración de la regulación de apoptosis en el cáncer de próstata [133].

#### 5.9.3.3 SLC18A2

SLC18A2 codifica para un transportador vesicular de monoamina, que es una proteína integral de membrana en vesículas secretoras con expresión predominantemente en neuronas, células neuroendocrinas y algunos tipos de células hematopoyéticas. Transportan monoaminas como dopamina, serotonina, epinefrina, norepinefrina, y la histamina, desde el citosol en vesículas para el almacenamiento y/o liberación por exocitosis, por ejemplo, durante la neurotransmisión o la liberación del factor autocrino/paracrino. SLC18A2 también se expresa en ciertos tumores endocrinos, incluyendo los tumores de próstata neuroendocrino, pero rara vez en los cánceres no endocrinos de los mismos tejidos. Sin embargo, varias de las monoaminas que son sustratos para el transporte mediado por SLC18A2 han demostrado influir en el crecimiento, la proliferación, la migración o apoptosis de las células de cáncer de próstata *in vitro* e *in vivo* [134].

Se demostró una inversa correlación entre la expresión de SLC18A2 y los niveles de metilación, lo que sugiere que la baja expresión es debida al silenciamiento por metilación del promotor. Los niveles de metilación fueron mayores en tejido derivados de adenocarcinomas prostáticas y líneas celulares de PCa en comparación con tejido de HBP, tejido normal prostático y en línea celular HBP. Se cree que la pérdida de SLC18A2 podría sensibilizar a las células de cáncer de próstata a los efectos promigratorios de la norepinefrina liberadas por los nervios simpáticos y/o estímulos antiapoptóticos de epinefrina [134].

#### 5.9.3.4 TNFRSF10C

TNFRSF10C (miembro de la superfamilia de receptores de factor de necrosis tumoral 10C), es una proteína de membrana que carece de una región citoplasmática vinculada a glicosilfosfatidilinositol (GPI) [135]. La hipermetilación del promotor de

TNFRSF10C ha sido reportada en neuroblastoma (21%), cáncer de mama primario (33%), cáncer de pulmón primario (16%), mesotelomas malignos (63%), cáncer de próstata (50%) y papilomas del plexo coroideo (50%). En el estudio de Chen y cols. se detectó que, 48 de las 59 muestras de cáncer de próstata primario (81,4%) mostraron evidencia de hipermetilación del promotor TNFRSF10C. La baja regulación de TNFRSF10C, por lo tanto, elimina el efecto antiapoptótico, que representa una respuesta protectora contra la progresión del tumor. En este caso, las células cancerosas obtienen una ventaja para la proliferación y la progresión mediante la inactivación de TNFRSF10C a través de la modificación epigenética de su promotor [135].

#### 5.9.3.5 Proteína de muerte asociada a quinasa (DAPK)

DAPK es una serina/treonina quinasa implicada en vía de la apoptosis. La sobreexpresión de DAPK induce la apoptosis, mientras que la pérdida de su función conduce a la protección contra la apoptosis. Por lo tanto, DAPK puede funcionar como un supresor de la metástasis. Una expresión reprimida de DAPK por hipermetilación en la región promotora se ha demostrado para diversos cánceres humanos [68]. Las frecuencias de metilación en cáncer de próstata van desde 0% a 36% en estudios independientes [81,87]. Además, Mishra y cols. observaron que el nivel de metilación de DAPK en una línea celular de cáncer de próstata (LNCaP) es significativamente mayor que en una línea celular normal (RWPE1) [138]. Sin embargo, la sobreexpresión de DAPK y la función reprimida en los tumores de próstata [137], sugieren que la actividad de DAPK se puede dañar a un nivel postraducciona l en las células cancerosas [79]. Basándose en su función poco clara y persistentemente baja frecuencia de metilación en tejidos tumores y tejidos normales, para discernir si DAPK es un potencial biomarcador para el cáncer de próstata se necesitan más estudios.

#### 5.9.3.6 PTPIP51

La proteína PTPIP51 juega un papel en el desarrollo de los mamíferos. Como se ha demostrado previamente, la sobreexpresión de PTPIP51 induce apoptosis en células HEK293. PTPIP51 interactúa con Raf-1 a través de 14-3-3 $\sigma$  modulando así la motilidad celular y la morfología a través de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK). Los datos disponibles hasta ahora implican que PTPIP51 está involucrado en la

diferenciación celular, la motilidad, la formación del citoesqueleto, y en la apoptosis. Estas alteraciones celulares en el epitelio y el estroma están implicados en la patogénesis de la hiperplasia benigna de la próstata y la patogénesis del carcinoma de próstata y resultan esencialmente de una regulación aberrante de la proliferación y la diferenciación [138].

El estado de metilación del promotor de PTPIP51 es aberrante en el cáncer de próstata en comparación con la HPB, mostrando mayores niveles de metilación en HBP cuando se comparan con PCa, lo cual explica la sobreexpresión de los niveles de mRNA de PTPIP51 en el grupo de PCa. Este hallazgo demuestra que la hipermetilación de PTPIP51 ocurre tarde en la progresión del cáncer de próstata, y que aparece sólo en la etapa de la enfermedad metastásica [138].

En la Tabla N° 5 se resumen algunos estudios relacionados con genes involucrados en la muerte celular mediante apoptosis, cuya hipermetilación ha sido descrita en muestras de PCa.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
TMSC1/ASC	Objetivo de silenciamiento inducido por metilación	Tejido PCa	63%	MSP	[130]
		Tejido HBP	35,3%		
		Tejido PCa	47%	MSP	[126]
		Tejido Normal	3%		
Tejido PCa	38/58 (65%)	MSP	[132]		
Tejido HGPIIN	7/11 (64%)				
Tejido Normal	0/14 (0%)				
		Líneas celulares PCa	11/40 (28%)		
		Tejido PCa	37%	MSP	[77]
HRK		Tejido PCa		MSP	[133]
		GS=6	3/22 (14%)		
		GS=7	9/24 (38%)		
		GS=8	2/2 (100%)		
		GS=9	1/4 (25%)		
SLC18A2	Transportador de monoaminas	Líneas celulares PCa		RT-PCR	[134]
		HBP	52-88%		
		Tejido PCa	17%		
		Tejido HBP	15/17 ((%)		
		Tejido normal	2/5 (40%)		
			0/4 (0%)		
TNFRSF10C	Receptor de factor de necrosis tumoral 10C	Tejido PCa	48/59 (81,4%)	RT-PCR	[135]

**Tabla N° 5: Genes asociados a muerte celular por apoptosis hipermetilados en PCa.**

#### 5.9.4 Invasión/Metástasis

La metástasis es un proceso extremadamente complejo que se produce a través de una serie de pasos secuenciales que implican invasión, el transporte, la adhesión en un sitio distante, y el crecimiento en un órgano secundario. Aunque las metástasis son la causa del 90% de las muertes de cáncer humano, se sabe poco sobre los determinantes genéticos y bioquímicos de la metástasis [62].

##### 5.9.4.1 Proteína poliposis adenomatosa coli (APC)

El gen que codifica APC, está bien caracterizado como supresor de tumores por regulación de la señalización Wnt canónica, que es esencial para la tumorigénesis [68]. La región promotora de APC se ha encontrado hipermetilada con frecuencia en PCa [86].

Diversos estudios han descrito que la hipermetilación de APC se correlaciona con la progresión de PCa, debido a las diferencias en las frecuencias de metilación encontradas entre tejidos de PCa, HGPIN, HBP y normal [69,74,76,78,84,139], así como también encontrado en muestras de orina proveniente de pacientes con PCa, HBP y controles sanos [88,91]. Demostrando que la metilación de APC es un buen predictor de la progresión de PCa.

El estudio de Richiardi y cols. informó que APC está hipermetilado en tejido histológicamente no neoplásico próstático adyacente al tejido tumoral PCa, que fue predictivo de mortalidad específica de la PCa en una cohorte de 157 pacientes con más de 14 años de seguimiento. El conjunto de las muestras de tejido consistieron tanto prostatectomía radical (PR), la resección transuretral de la próstata (TURP) y ejemplares de aguja de biopsia. Los autores no sólo encontraron que la hipermetilación de APC fue predictivo de mortalidad específica de la PCa en un análisis univariado y multivariado, sino que también se encontró que la combinación de la alta metilación de APC y GSTP1 en el tejido normal adyacente se asoció con un aumento significativo riesgo de muerte específica PCa. Estos resultados sugieren un posible papel de la hipermetilación de tejido no maligno adyacente en la progresión del PCa. Sin embargo, una limitación de este estudio fue que se realizó un análisis multivariado ajustado solo para la puntuación de Gleason [83]. En un estudio anterior por el mismo grupo, la metilación de APC fue investigado (utilizando MSP) en muestras de tejido PCa malignas a partir de dos grandes conjuntos de pacientes, contando 216 y 243 ejemplares de PCa, que consiste en PR, TURP y las muestras de biopsia de aguja. La metilación de APC resultó ser un predictor significativo de muerte específica de PCa cuando ambas cohortes se combinan [140]. Así, en estos estudios [83,140], la hipermetilación de APC en tejido adyacente no neoplásico próstata y PCa fue predictivo de muerte específica de PCa. Aunque esto indica que APC puede tener valor pronóstico independiente, ambos estudios fueron limitados por falta las variables clinicopatológicas distintas de Gleason.

Otro estudio [34] investigó la correlación entre la hipermetilación de APC en el tejido tumoral PCa y BCR utilizando análisis qMSP de 219 pieza de PR. En el análisis multivariado, la hipermetilación de APC fue un predictor significativo de BCR sólo en el subgrupo que consiste en 141 pacientes con estadio tumoral pT2 [34]. En concordancia con los tres estudios descritos anteriormente, dos estudios más pequeños [83,141] reportaron que la hipermetilación de APC que se asoció

significativamente con BCR, metástasis y/o muerte en análisis multivariante. Uno de estos estudios se llevó a cabo en muestras PR exclusivamente de pacientes con tumores con puntuación de Gleason 7 [83], el otro en muestras de aguja de biopsia de pacientes tratados PCa por PR, TURP y/o terapia de privación de andrógenos (ADT) [141]. En tres estudios [77,81,85], no se encontró ninguna asociación significativa entre la hipermetilación de APC y la progresión de PCa, que para dos de los estudios [81,85], podría ser debido al pequeño tamaño de la muestra (<85 pacientes). El último de los tres estudios negativos [77], se llevó a cabo utilizando el MSP con 151 piezas de PR, pero no se encontró correlación significativa entre la APC metilación y BCR en análisis univariado.

En resumen, varios estudios han demostrado una correlación significativa entre la hipermetilación APC y un mayor riesgo de progresión del PCa, lo que sugiere que la metilación de APC podría tener utilidad pronóstica para PCa. De acuerdo con ello, nuevas investigaciones se están realizando para validar este marcador, especialmente estudios a gran escala utilizando cohortes bien definidas de pacientes de PCa, así como criterios de valoración clínicos claramente definidos.

#### 5.9.4.2 HOXD3

HOX de la familia de factores de transcripción homeobox se ha demostrado que desempeñan un papel clave en la regulación del desarrollo embrionario, la proliferación celular y la diferenciación, y la angiogénesis [142]

Chen y cols. describieron que la metilación de HOXD3 fue significativamente mayor en los tipos de cáncer con GS=7 vs GS ≤6, así como los cánceres con estadio pT3 / pT4 vs pT2. La proporción de casos con alta metilación en GS=7 vs GS ≤6 y pT3 /pT4 vs pT2 eran también significativamente diferentes. También hubo un aumento significativo en la metilación en tumores con puntuación de Gleason de 2 a 3 y en el avance de 3 a 4-5 [137, 143]. Estos resultados sugieren que la metilación de HOXD3 distingue los cánceres de próstata de bajo grado de los intermedios y de alto grado, por lo cual podría ser utilizado como un marcador pronóstico del estadio patológico del PCa [142].

#### 5.9.4.3 EFEMP1

EFEMP1 codifica para la proteína de matriz extracelular, Fibulina 3. En los tejidos normales, Fibulina-3 es por lo general altamente expresada por las células epiteliales y endoteliales, interactuando con varias otras proteínas de la ECM, no sólo contribuye a la integridad de la membrana basal sino también para el conjunto de las fibras elásticas durante el desarrollo embrionario. Media la comunicación célula a célula y la comunicación célula-matriz, proporciona organización y estabilidad de las estructuras de la matriz extracelular [144,145]. Por otra parte, Fibulina-3 inhibe la actividad de varias metaloproteinasas de la matriz, participando así en la organización de las estructuras estables de ECM, así como en la reducción de su proteólisis y remodelación. Debido a que Fibulina-3 es importante para mantener la homeostasis celular y tisular, su desregulación puede conducir a un crecimiento celular desregulado, la invasión y modificación de ECM, que son características de las células cancerosas [145].

Se ha descrito que los niveles de metilación del promotor aumentan desde tejidos de la próstata no cancerosos a HGPIN y desde HGPIN a PCa, y además la metilación está inversamente correlacionado con los niveles de transcripción, lo que indica que la metilación de EFEMP1 reduce los niveles del transcrito [145]. Esto se confirma con los resultados del estudio de Kim y cols. en el cual se encontró que el nivel de expresión de EFEMP1 fue significativamente mayor en la HBP que en las muestras de PCa, EFEMP1 fue metilado en 95,3% (101 de 106) y el 13,4% (13 de 97) de las muestras de PCa y HPB, respectivamente[146]. Estos resultados indican un posible rol para la perturbación en la expresión de EFEMP1 en la carcinogénesis de próstata [145].

#### 5.9.4.4 CD44

CD44 codifica para una glicoproteína transmembrana de la superficie celular implicada en la señal y transducción de las interacciones célula-célula, célula-matriz, la migración celular y la adhesión [68].

Se ha descrito que la hipermetilación del promotor de CD44 ha sido observada en PCa y la pérdida de la expresión de CD44 ha sido asociada con agresividad de PCa [127].

La hipermetilación de la región promotora CD44 resultó ser un valor predictivo de BCR en un análisis univariado en un solo estudio [127], utilizando un pequeño conjunto de muestras de 60 piezas de PR, mientras que un estudio más grande [77], de 151 piezas de PR no pudo confirmar esto.

La expresión de CD44 en tejidos tumorales de próstata es más bajo que en los de tejidos normales adyacentes. Esta baja expresión se correlaciona con la metilación del promotor de CD44 [127]. Estudios previos han informado que la expresión de CD44 disminuye de manera asociada con la puntuación Gleason y la progresión metastásica distante del cáncer de próstata y que además, la expresión de CD44 y la metilación de su promotor se puede correlacionar no solo con la tumorigénesis, sino también con la progresión del cáncer de próstata y con la BCR [68,79].

#### 5.9.4.5 Inhibidor tisular de la metaloproteinasa-2 y -3 (TIMP-2 y TIMP-3).

Las MMPs son enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular y la membrana basal. Altas expresiones de esta enzima se han asociado con el crecimiento tumoral, la invasión y la angiogénesis inducida por tumor. Estas vías son controladas por el equilibrio entre los niveles de las MMPs e inhibidores tisulares de las metaloproteinasas (TIMPs). Las TIMPs están implicadas en diversos procesos biológicos, incluyendo el crecimiento celular, la progresión del tumor, la apoptosis, la invasión, metástasis y la angiogénesis. En general, TIMPs son conocidas como inhibidores de la angiogénesis [146].

TIMP-2 es uno de los miembros de esta familia que ha sido investigado, debido a su participación en la progresión del cáncer y la metástasis en una variedad de cánceres humanos [146]. Pulukuri y cols. observaron que 25 de los 42 tumores de próstata (60%) es metilado en comparación con 5 de las 32 (16%) muestras normales de la próstata. Estos hallazgos apoyan el hecho que la mayoría de los tejidos de cáncer de próstata tienen débil o ninguna expresión de TIMP-2 en comparación con la HPB o tejidos normales de la próstata. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados por estudios previos [122]. Los roles de TIMP-3 en la progresión del cáncer han sido investigados por varios grupos.

La alta expresión de TIMP-3 reduce la metástasis, induce la apoptosis, aumenta la sensibilidad a los fármacos, e inhibe el crecimiento tumoral. Se ha descrito que la baja expresión es debido a la metilación del promotor de TIMP-3 [146]. Un análisis

cuantitativo reveló la expresión diferencial de TIMP-3 en muestras de PCa, con niveles significativamente inferiores en tumores de alto grado (Gleason  $\geq 8$ ) en relación con las glándulas epiteliales normales adyacentes. En general, estos resultados establecen a TIMP3 como un gen con baja expresión con frecuencia en muestras clínicas de PCa, especialmente en las formas agresivas de la enfermedad [147]. Un estudio demostró que la región del promotor de TIMP-3 es metilado en 97% de los tumores de próstata [69]. Sin embargo, otro estudio reveló una baja frecuencias en la metilación de TIMP-3 (0- 6%) [81], mientras que otros dos estudios encontraron metilación del promotor de TIMP-3 en el 37 y el 41% de los sedimentos de orina de pacientes con cáncer de próstata [87,91].

Las incongruencias en las frecuencias de metilación en los tumores de PCa entre estudios quedaron resueltas mediante el estudio realizado por Shinojima y cols., en donde se determinó que la regulación de la expresión de TIMP-3 no se debe solamente a la metilación de su promotor, sino que también es debido a modificaciones represivas de histonas (H3K4me y H3K9ac) que también están involucradas en la disminución en la expresión de TIMP-3 en PCa [147].

#### 5.9.4.6 Protocadherinas

Las Protocadherinas pertenecen a la superfamilia de las cadherinas, y algunos de las cuales actúan como supresores de tumores, tales como PCDH8, PCDH10, PCDH17, y PCDH20.

Estudios recientes han demostrado que PCDH10 es un gen supresor de tumor putativo en varios tipos de cáncer humano, incluyendo malignidades linfoides, cáncer colorrectal, cáncer de pulmón, cáncer de vejiga y cáncer de próstata. Una baja en la expresión de PCDH10 promueve la proliferación de células tumorales, la migración y la invasión. Por otra parte, un estudio reciente demostró que PCDH10 es regulado en cáncer de próstata debido principalmente a la metilación del promotor, y que se encuentra metilado en 505 de las muestras de PCa y en ninguna de las muestras de HBP [148].

Además la metilación de PCDH10 se asocia significativamente con mayor nivel de PSA preoperatorio, mayor puntuación de Gleason, con el estadio clínico avanzado, metástasis ganglionar, invasión angiolímfática, y la recidiva bioquímica. Por otra parte, la metilación de PCDH10 se asocia a peor supervivencia libre de BCR y podría ser

utilizado como un predictor independiente de la supervivencia libre de BCR. Sin embargo, la metilación de PCDH10 no se asoció con la edad, estado de los márgenes quirúrgicos, o invasión de la vesícula seminal [148].

No se puede incluir a PCDH10 como marcador predictivo de PCa, ya que solo existe un estudio basado en la metilación del promotor de PCDH10 y los parámetros clínico-patológicos.

Al igual que PCDH10, PCDH17 se encuentra con frecuencia inactivada por metilación del promotor en los cánceres humanos, incluyendo el cáncer de próstata. Sin embargo, el estado de metilación de PCDH17 en el cáncer de próstata y su significancia clínica siguen siendo en gran medida desconocido [149]. Al igual que PCDH10, los niveles de metilación de PCDH17 en PCa se asocian positivamente con parámetros clínicos-patológicos como puntuación de Gleason, estadio patológico avanzado, mayor nivel de PSA preoperatorio, la invasión angiolímfática positivo, metástasis en los ganglios linfáticos positivos y BCR. Sin embargo la metilación de PCDH17 no se correlacionó con la edad o el estado de los márgenes quirúrgicos [149].

De la misma manera que para PCDH10 y PCDH7, la protocadherina 8 (PCDH8) juega un papel crucial en la adhesión celular, la transducción de señales, la proliferación, la migración y la invasión. Un creciente número de estudios han demostrado que las funciones PCDH8 como un supresor tumoral en cánceres humanos, y es con frecuencia inactivada por metilación en el promotor en cáncer de vejiga, carcinoma de células renales, el carcinoma nasofaríngeo, cáncer gástrico y cáncer de mama. El estudio de Niu y cols. demostró que la metilación de PCDH8 es más frecuente en tejidos de cáncer de próstata que en los tejidos normales de la próstata. Además, cuando se analizó la asociación entre la metilación PCDH8 y las características clínico-patológicas tradicionales en el cáncer de próstata, se encontró que su metilación se correlacionó significativamente con la etapa patológica avanzada, mayor nivel de PSA preoperatorio, puntuación de Gleason superior, metástasis en los ganglios, y la aparición de la recurrencia bioquímica. Estos resultados sugieren que la metilación de PCDH8 tiene un papel de importación en la progresión del cáncer de próstata y puede asociarse con un mal pronóstico. El análisis de supervivencia demostró que el tiempo de supervivencia libre de recidiva bioquímica de los pacientes con PCDH8 metilado fue significativamente más corto que los pacientes sin metilación. Por lo tanto la metilación de PCDH8 puede ser utilizado como marcador predictivo de la BCR, pero es necesario validar estos resultados mediante la realización de más

estudios [150].

En conjunto, estos hallazgos indican que la metilación de PCDH10, PCDH8 y PCDH17 puede desempeñar un papel crucial en la patogénesis y agresividad del cáncer de próstata, y se correlacionan con un peor resultado en el cáncer de próstata [148, 149]

#### 5.9.4.7 Epha7

Epha7 es miembro de la familia de Efrinas y juega diversos roles en la carcinogénesis. Los receptores Eph representan la mayor familia de receptores tirosina quinasa. Receptores Eph y sus ligandos Efrinas se dividen en 2 subclases, A y B, con base en la homología de la secuencia extracelular, estructura de la proteína y la afinidad de unión al ligando. Efrinas y Ephs están involucrados en el desarrollo embrionario y desempeñan un papel clave para la diferenciación de los sistemas nervioso y vascular. Además de tales funciones fisiológicas, estudios recientes han revelado desregulación de algunos de los genes Eph/Efrinas en tumores malignos humanos [151].

Epha7 tiene las mismas grandes características estructurales como los demás miembros de la familia Eph, incluyendo una región rica en cisteína y un dominio tipo tándem de fibronectina III en su porción extracelular [151]. Una baja o pérdida de la expresión del ARNm de Epha7 se detectó en 23 de 48 (47,9%) carcinomas de próstata, y 2 de 31 (6,5%) hiperplasias. La metilación de la región promotora Epha7 estaba presente en 20 de 48 (41,7%) de los carcinomas y 6 de 31 (19,3%) hiperplasias, respectivamente, demostrando que la baja o nula expresión de Epha7 es debido a la hipermetilación. Análisis de inmunohistoquímica mostró que en 10 de las 30 (33,3%) muestras de carcinoma, la proteína Epha7 estaba ausente y 8 de ellos (80,0%) mostraron hipermetilación. La frecuencia de metilación de Epha7 fue mayor en los pacientes con cáncer con puntuación de Gleason superior, lo que sugiere un posible papel de Epha7 en la progresión del cáncer de próstata, ya que la puntuación de Gleason es considerada uno de los indicadores pronósticos más importantes para el cáncer de próstata [151], aunque es necesario seguir estudiando el posible rol de los niveles de metilación de Epha7 como indicador pronóstico de PCa

#### 5.9.4.8 FYN

FYN es una proteína de la familia Src, la cual contiene una miristoilación y una palmitoilación en el dominio N-terminal (SH4), que dirige a la proteína a la membrana plasmática interna. Esta es seguida por una secuencia única, distinguiendo FYN de otros miembros de la familia Src, contiene dos dominios de interacción proteína-proteína (SH3 y SH2), un dominio quinasa (SH1) y un dominio C-terminal. Las funciones biológicas reportadas para FYN son diversos, incluyendo los efectos tanto estimulantes como inhibitoras sobre la diferenciación celular, la proliferación y la supervivencia. La señalización es necesaria para la activación de FYN de las células T a través del receptor de células T (TCR) y para FAS y apoptosis mediada por TCR en estas células. Por otra parte, un papel supresor de tumores ha sido sugerido para FYN en neuroblastomas, posiblemente a través de la inducción de la diferenciación y la detención del ciclo celular [152].

Por inmunohistoquímica, se detectó la proteína FYN en epitelio prostático no maligno, pero no en las glándulas cancerosas. Por otra parte, la secuenciación de ADN genómico modificado con bisulfito, reveló metilación aberrante frecuente de una isla CpG grande en la región promotora de FYN en líneas celulares de adenocarcinoma (3 de 5 líneas celulares ensayadas) y en cáncer de próstata primario (12 de 18 tumores). No se encontró metilación en las células HPB-1 o muestras de tejido de la próstata no malignas (0 de 7). Estos resultados indican que la baja expresión de la proteína FYN en cáncer de próstata ocurre por hipermetilación del promotor, y por lo tanto es un candidato supresor tumoral de próstata [152]. Pero para poder discernir si FYN puede ser utilizado como un gen supresor tumoral es necesario continuar los estudios que determine su rol en la patogénesis del PCa.

#### 5.9.4.9 MCAM

MCAM, también conocido como MUC18, Mel-CAM, CD 146, antígeno A32 o S-endo-1, es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Desempeña un papel importante en el crecimiento tumoral y la metástasis de melanoma humano [153].

Liu y cols. describieron que la frecuencia de metilación en PCa primario fue del 80% (70 de 88 casos) en comparación con el 12,5% (3 de 24 casos) en la HBP. PIN mostró una frecuencia de metilación intermedia (23%, 7 de 30 casos). Estos resultados indican que MCAM es un gen metilado específico en el cáncer de próstata. Los niveles de metilación de MCAM se correlacionaron positivamente con la etapa del tumor de próstata, en particular, en pacientes con un estadio tumoral de pT3 y pT4, 93% (41 de 44), así como también se correlacionó significativamente con el nivel de puntuación de Gleason. Estos datos sugieren que la hipermetilación de MCAM es más común en el cáncer de próstata en etapa tardía, debido a que la frecuencia de metilación del promotor de MCAM en PIN (23%, 7/30) fue mucho menor que en el PCa (80%), lo que podría permitir diferenciar el cáncer de próstata a partir de su forma pre-invasiva [153].

#### 5.9.4.10 Desmocolina 3 (DSC3)

DCS3, es un miembro de la superfamilia cadherina que contribuye a la formación de los desmosomas mediada por adhesión célula-célula [106]. Estudios recientes han observado pérdida de DSC3 en varios tipos de cáncer, tales como metástasis ganglionares de carcinoma oral de células escamosas, cáncer de mama y el cáncer colorrectal, en donde los niveles disminuidos asociados con la progresión del cáncer fueron regulados por la modificación epigenética. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos a través de los cuales actúa DSC3 en el cáncer de próstata. El estudio realizado por Pan y cols. demostró que la expresión de DCS3 es regulada por metilación en su promotor, disminuyendo fuertemente la expresión de la proteína en PCa comparada con HBP. El análisis de la función de DCS3 en líneas celulares demostró que la línea celular que no expresaba DCS3 incrementa la expresión de vimentina, sugiriendo un rol en la invasión y migración celular por inducción de EMT [106].

#### 5.9.4.11 Sprouty

Las proteínas Sprouty inhiben el crecimiento de células en respuesta a factores inducidos en mamíferos por medio de la inhibición de la vía de señalización RTK/Ras/MAP quinasa. Distintos mecanismos para la inhibición de Sprouty de la vía de RTK/Ras/MAP quinasa, incluyen el bloqueo de la interacción del complejo Grb2/SOS con la proteína de acoplamiento FRS2 o la inhibición de Raf. Otra característica de los

inhibidores Sprouty es su regulación negativa por factores de crecimiento. Específicamente, los factores de crecimiento regulan tanto el nivel de transcrito como el reclutamiento de Sprouty a la membrana plasmática, en algunos sistemas. Dado que Sprouty puede inhibir la señalización de FGF, potencialmente pueden disminuir las actividades biológicas de los FGFs en las células de cáncer de próstata e inhibir su capacidad para promover la progresión del cáncer [154].

Estudios previos han demostrado que Sprouty 1 y 4 tienen una baja expresión en tejidos de cáncer de próstata en comparación con los tejidos normales de la próstata. También se ha observado que la expresión Sprouty 2 está disminuída en los tejidos de cáncer de próstata cuando se compara con la HBP. Además, una disminución de los transcritos de Sprouty se asoció con recurrencia bioquímica después de la prostatectomía radical, indicativo de una enfermedad más agresiva. La disminución en la expresión Sprouty en el cáncer de próstata humano, a pesar de los niveles elevados de ligandos FGF y receptores de FGF, implica una pérdida del mecanismo de regulación de crecimiento en los cánceres de próstata que pueden potenciar los efectos del aumento en la expresión de FGF y FGFR en tejidos de cáncer de próstata y puede representar un nuevo mecanismo que facilita la señalización RTK aberrante en la carcinogénesis de próstata [154,155].

Los estudios realizados en distintas Sprouty (1, 2 y 4) han obtenido resultados muy similares. Las Sprouty presentan significativamente un mayor porcentaje de metilación del promotor en los tejidos de PCa en comparación con los tejidos normales, lo mismo ocurre al comparar los niveles de metilación de Sprouty en líneas celulares de PCa con las células epiteliales de próstata normales. Además el aumento de la metilación se asoció con una reducción de la expresión del mRNA Sprouty en los tejidos y líneas celulares de PCa. [154,156].

Es probable que la inactivación de Sprouty mediante la metilación de sus promotores tenga como efecto un aumento del crecimiento celular, ya que se pierde el punto de control de este mecanismo, pero para corroborar esto es necesaria la realización de más estudios acerca de la metilación de Sprouty y su importancia en la patogénesis del cáncer de próstata.

#### 5.9.4.12 PDLIM4

PDLIM4, ha sido identificado como un potencial gen supresor tumoral que está involucrado en el mantenimiento del crecimiento celular normal. Se ha demostrado que PDLIM4 modula la dinámica de las fibras de estrés de actina a través de su asociación con  $\alpha$ -actina. Los resultados de Vanaja y cols. mostraron que una alta tasa de metilación del promotor de PDLIM4 podría ser un principal mecanismo para suprimir su expresión en los tejidos de cáncer de próstata, lo cual es consistente con lo descrito en otros estudios. Sorprendentemente, analizando de manera combinada el estado de metilación de PDLIM4, GSTP1, y PTGS2 mejoraron la tasa teórica de detección de adenocarcinoma de próstata a 95% a 100% en comparación con la de cada gen probado individualmente [157].

#### 5.9.4.13 AKAP12

La proteína quinasa de anclaje A (AKAP) pertenece a una familia de proteínas de andamiaje que organiza la proteína quinasa A y C. También es un importante regulador del complejo del receptor  $\beta$ -adrenérgico, el cual controla la señalización celular, la adhesión celular, la mitogénesis, y la diferenciación. La supresión del crecimiento del tumor y la colonización metastásica mediada por AKAP12, puede lograrse a través de interacciones directas o indirectas con múltiples proteínas implicadas en la apoptosis, la angiogénesis, y se asocian con vías de señalización en las células cancerosas [159].

El estudio de metilación de AKAP12 y su relación con parámetros clínico-patológicos realizado por Liu y cols demostró una relación significativamente mayor en los tumores con valores de GS 8-10, lo que indica que la metilación de AKAP12 podría ser un marcador útil para el seguimiento de la progresión de la carcinogénesis en aquellos pacientes con PCa y su potencial biomarcador molecular para predecir la malignidad de PCa [159], pero como en la actualidad sólo existe un estudio que correlaciona la metilación de AKAP12 y la progresión de la carcinogénesis es necesario validar estos resultados con más estudios.

#### 5.9.4.14 KLK10/KLK6

Las peptidasas humanas relacionadas con Kalicreína, anteriormente conocidas como Kalicreínas (KLKs), son una familia de serina proteasas secretadas, codificadas por 15 genes que han surgido como una importante familia de biomarcadores de cáncer, con PSA siendo el más reconocido. Muchas KLKs han sido implicadas en la invasión tumoral, la metástasis, y promoción de la angiogénesis tumoral. Numerosos estudios han demostrado que los genes KLK muestran una expresión aberrante en un número de cánceres, tales como tumores de próstata, ovario y de mama.

El antígeno específico prostático (PSA), el cual es una proteína codificada por el gen de la Kalicreína 3 (KLK3), es el marcador sérico más comúnmente utilizado para el diagnóstico de PCa. PSA es un biomarcador bien establecido pero su utilidad está limitada por baja sensibilidad diagnóstica (75% -85%) y especificidad (25-35%), y no se puede distinguir de forma fiable entre el PCa indolente y el PCa con riesgo vital [159].

Olkhov-Mitsel y cols. demostraron que los niveles de metilación del ADN y la prevalencia de KLK6 y KLK10 eran significativamente superiores en el tejido PCa en comparación con tejido de la próstata normal, aunque sólo para KLK10 esta diferencia fue significativa y se asoció con la anatomía zonal de la próstata, siendo significativamente menor en la zona de transición. Además se observó un aumento significativo en la metilación de KLK10 para las etapas patológicas pT3 + pT4 frente a pT2, observación que puede tener implicaciones importantes para la detección de PCa y podrían incorporarse en los modelos predictivos para la estadificación preoperatoria del cáncer de próstata. Además, estos resultados sugieren que KLK10 está ligada a la invasión del tumor en lugar de la diferenciación de la glándula. Este estudio también reveló que la metilación de KLK10 se asoció con menor tiempo de recidiva bioquímica. Dado que estudios previos no han demostrado diferencias estadísticamente significativas en la tasa de recidiva bioquímica entre los pacientes con tumores con KLK10 positivo y negativo, es posible que la metilación de KLK10 sea sólo un epifenómeno asociado con estos procesos [159].

Es necesario trabajos futuros para aclarar la utilidad clínica y la relevancia funcional de la metilación del ADN de KLK10 como un biomarcador de progresión.

En la Tabla N° 6 se resume algunos estudios relacionados con genes involucrados en la

involucrados en la invasión celular y metástasis, cuya hipermetilación ha sido descrita en muestras de PCa

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
APC	Proteína polyposis adenomatosa coli	Orina post-DRE	12%	MSP	[88]
		Orina post-biopsia	18%		
		Tejido PCa	54%	MSP	[74]
		Tejido HBP	5,8%		
		Celulas circulantes		QMSP	[87]
		PCa con BCR	95%		
		PCa	23%		
		Tejido PCa	79%	MSP	[76]
		Tejido normal	0%		
		Orina PCa	48%	MSP	[91]
Orina normal	4%				
Tejido PCa	71%	MSP	[77]		
Tejido PCa	93,3%	MSP	[78]		
Tejido HGPIN	80,5%				
Tejido Normal	53,3%				
Tejido PCa	80%	QMSP	[85]		
Tejido HBP	50%				
Tejido PCa	100%	QMSP	[69]		
Tejido HGPIN	100%				
Tejido HBP	86,6%				
HOXD3	Factor de transcripción homeobox D3	Tejido PCa	11/66	MSP	[139]
		Tejido PIN	0/11		
		Tejido PCa	26,4%	RT-PCR	[160]
		Tejido normal	0,4%		
PCa GS $\geq$ 7	63,7%	MSP	[137]		
PCa GS<7	47,5%				
EFEMP1	Fibulina 3	Tejido PCa primario	96%	QMSP	[145]
		Tejido HGPIN	51%		
		Tejido prostático no canceroso (NPT)	7%		
		HBP	3%		
Tejido PCa	95,3%	RT-PCR	[144]		
Tejido HBP	13,4%				

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
CD44		Tejido PCa	41%	MSP	[127]
		Tejido HGPIN	0%		
		Tejido Normal	0%		
		Tejido PCa	20%	qPCR	[79]
		Tejido HBP	0%		
		Tejido PCa	19,9%	MSP	[77]
TIMP-2	Inhibidor de metaloproteinasas 2	Tejido PCa Tejido normal prostático	25/42 (60%) 5/32 (16%)	MSP	[117]
TIMP-3	Inhibidor de metaloproteinasas 3	Tejido PCa primario	44/131 (34%)	MSP	[147]
		Tejido PCa metastásico	19/19 (100%)		
		Tejido PCa	96,6%	QMSP	[69]
		Tejido HGPIN	92,1%		
		Tejido HBP	90%		
		Celulas circulantes PCa con BCR	30%	QMSP	[87]
		PCa	32%		
		Orina PCa	37%	MSP	[91]
		Orina normal	9%		
		Tejido PCa	4%	MSP	[81]
PCDH10	Protocadherina 10	Tejido PCa Tejido HBP	79/151 (52,3%) 0/34 (0%)	MSP	[148]
PCDH17	Protocadherina 17	Tejido PCa Tejido próstata no tumoral	67,1% 0%	MSP	[149]
PCDH8	Protocadherina 8	Tejido PCa Tejido normal	46,9% 0%	MSP	[79, 150]
EPHA7		Tejido PCa Tejido HBP	20/48 (41,7%) 6/31 (19,3%)	RT-PCR	[151]
FYN		Tejido PCa Tejido HBP	12/18 (67%) 0/7 (0%)	RT-PCR	[152]
MCAM		Tejido PCa Tejido PIN Tejido HBP	70/88 (80%) 7/30 (23%) 3/24 (12,5%)	RT-PCR	[153]

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
PDLIM4		Tejido PCa Tejido HBP	98% 11,1%	QMSP	[161]
AKAP12		Tejido PCa Tejido HBP Tejido adyacente	47/78 (60,2%) 5/22 (22,7%) 2/22 (9,1%)	MS-HRM	[158]
KLK10	Kallicreína 10	Líneas celulares PC-3 22RV-1 Tejido PCa Tejido normal	57% 49% 71% 18%	qPCR	[159]
KLK6	Kallicreína 6	Líneas celulares PC-3 Tejido PCa Tejido normal	29% 72% 48%	qPCR	[159]

**Tabla N° 6: Genes asociados a los procesos de invasión celular y metástasis hipermetilados en PCa.**

#### 5.9.5. Respuesta hormonal/Metabolismo

La próstata es una glándula endocrina sensible a las moléculas de señalización externas tales como hormonas y factores de crecimiento. Estos agentes se unen a receptores celulares específicos para mediar sus efectos fisiológicos. La desregulación de estas proteínas de señalización puede conducir a la interrupción de importantes vías celulares implicadas en la homeostasis y el control del crecimiento, posiblemente contribuyendo a la iniciación o avance del cáncer [16].

##### 5.9.5.1 AR

Se sabe que los andrógenos estimulan el crecimiento de células de la próstata a través de los AR. Hay dos conocidos genes diana de los AR, PSA y el gen de fusión TMPRSS2-ETS. Las funciones exactas de PSA y TMPRSS2-ETS en el cáncer de próstata aún no se definen por completo. Mientras el silenciamiento de la expresión AR conduce a disminuir el crecimiento e inducir la apoptosis *in vitro* [16,146,162], la sobreexpresión de AR también induce la inhibición del crecimiento y la apoptosis. Además de la prostatectomía y la radiación, la terapia de privación de andrógenos es

uno de los tratamientos más eficaces para el cáncer de próstata. Sin embargo, en etapas avanzadas, muchos tumores de próstata se vuelven andrógeno-independiente y crecer agresivamente en ausencia de andrógenos y son resistentes a la castración. Los tumores andrógeno-independiente se caracterizan por la expresión aberrante del receptor de andrógenos [57,143].

El estudio de Jarrard y cols. reportó una asociación significativa entre la metilación del promotor de AR y su expresión *in vitro* utilizando líneas celulares de cáncer de próstata. Varios grupos encontraron metilación del promotor de AR en 8-39% de los tejidos tumorales de próstata [57,143]. Las frecuencias de metilación del promotor AR son más altas en los casos de castración resistente que en las de los tejidos tumorales de próstata primario.

La metilación del promotor de AR ocurre como un evento crítico, que define la progresión de las células epiteliales de cáncer de próstata a partir de una etapa benigna a una etapa metastásica avanzada. Específicamente, se detectó la metilación de promotor de AR en las líneas celulares metastásicas M12 y DU145, mientras que en las células benignas (P69) y en las tumorigénicas no metastásicas (M2205 y M2218), no se demostró metilación del promotor de AR. Estos resultados descritos por Schayek y cols. demostraron que la progresión del cáncer de próstata a partir de una etapa benigna (P69 células) a uno metastásico (células M12) está asociada con la hipermetilación del gen AR [143].

#### 5.9.5.2 ESR

Los estrógenos se han utilizado para el tratamiento de cáncer de próstata durante décadas y requieren receptores de estrógeno (ESR) para mediar su actividad, expresándose en la próstata dos tipos de ESRs, ESR1 y ESR2. La expresión de ESR1 se suprime en los tumores de próstata y se asocia con un mal pronóstico para la terapia endocrina. La metilación del promotor es el principal mecanismo responsable de la inactivación de ESR1. La incidencia de la metilación del gen ESR1 varía desde 80% en los tumores de próstata de bajo grado a 95% en los tumores de próstata de alto grado. El gen ESR1 está también aberrantemente metilado en diversos cánceres humanos, además del PCa [54].

### 5.9.5.3 ESR-1

ESR1 tiene propiedades supresoras metastásicas en las células de cáncer de mama y suprime el crecimiento de muchos tipos diferentes de células *in vitro*. La pérdida o baja expresión de ESR1 en el cáncer de próstata ha sido documentada con frecuencia [84].

Li y cols. revelaron por primera vez que la metilación de ESR1 en la próstata aumenta significativamente con la edad, lo cual sugiere que ESR1 puede estar implicado en el aumento, dependiente de la edad, en la incidencia del cáncer de próstata. Demostraron que la metilación de ESR1 se correlaciona fuertemente con la edad y con la puntuación de Gleason [125].

### 5.9.5.4 RAR $\beta$ 2

El ácido retinoico inhibe el crecimiento del cáncer mediante la interacción con el receptor de ácido retinoico  $\beta$  (RAR $\beta$ ). El receptor de ácido retinoico  $\beta$  (RAR $\beta$ ) es conocido como un gen supresor de tumores mediante la interacción con el ácido retinoico, un regulador transcripcional nuclear que media la señalización celular en el crecimiento y la diferenciación celular [64].

Muchos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de próstata, son resistentes a los efectos inhibidores del crecimiento de ácido retinoico debido a la pérdida de expresión de RAR $\beta$ . El gen RAR $\beta$  cuenta con dos diferentes promotores y expresa transcritos de ARN que se someten a corte y empalme alternativo. La mayoría de las células humanas expresan RAR $\beta$ 2 como la principal isoforma. El promotor RAR $\beta$ 2 contiene una isla CpG que está metilada de forma aberrante en el cáncer de mama, cáncer cervical, cáncer de vejiga y en el cáncer de próstata [58,59,163]. Varios grupos han informado que las frecuencias de metilación del promotor RAR $\beta$ 2 van desde 40% a 84% en los cánceres de próstata primarios, pero raramente informado en tejidos de la próstata normal o muestras de HBP [50, 53, 65, 75, 80,161]. Frecuencias de metilación del promotor de RAR $\beta$ , moderadas o altas también se han observaron en 35% de las muestras de orina o de sangre [81, 90,169]. Además, el promotor de RAR $\beta$ 2 es metilado en el 20% de las muestras de neoplasia intraepitelial prostática (PIN), Por lo tanto, la metilación del gen RAR $\beta$ 2 parece ocurrir temprano en la etiología del cáncer de próstata, y está implicado en la iniciación del cáncer [57].

Moritz y cols. informaron una asociación significativa entre la metilación de RAR $\beta$ 2 y BCR en un conjunto de 84 piezas de PR de tumores con puntuación de Gleason  $\leq 7$ , donde la hipermetilación de RAR $\beta$ 2 podría considerarse como un predictor significativo de la BCR.

RAR $\beta$ 2 representa un prometedor biomarcador molecular que puede utilizarse para discriminar entre enfermedades prostáticas malignas y benignas por métodos no invasivos [22]. RAR $\beta$ 2 se considera un gen supresor de tumores basado en la disminución de sus niveles de expresión en las primeras etapas de la carcinogénesis en una variedad de los tejidos epiteliales. Por lo tanto, la metilación de RAR $\beta$ 2 puede ser un biomarcador ideal para la detección temprana de cáncer de próstata [65].

#### 5.9.5.5 PMEPA1

Los andrógenos y el AR desempeñan un papel central en el crecimiento normal, la diferenciación y la función fisiológica de la glándula prostática. Se ha establecido que la desregulación de AR conduce a la progresión del PCa. El AR se une a elementos de respuesta-AR (Ares) y regula la transcripción de genes sensibles a los andrógenos que controlan la diferenciación y el crecimiento. La disfunción del eje de andrógenos contribuye al PCa a través de numerosos mecanismos, incluyendo el aumento de expresión de AR, la síntesis de andrógenos intra-tumoral, variantes de empalme AR, las mutaciones del AR y las enzimas que metabolizan los andrógenos. En un subgrupo de PCa avanzado, la señalización AR se pasa por alto en favor de vías independientes de AR [162].

El gen de la proteína de transmembrana de próstata inducida por andrógeno 1 (PMEPA1) es altamente expresado en las células epiteliales de la próstata y es un objetivo transcripcional directo para el receptor de andrógenos (AR). Los niveles de AR son controlados por el AR-PMEPA1, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa a través de la ligasa NEDD4-E3. PMEPA1 recluta el AR a la ubiquitina ligasa NEDD4-1 para degradación. Así PMEPA1 modula los niveles de AR [164].

La expresión PMEPA1 está reducida en dos tercios de los casos de PCa, tanto en el grupo caucásico americano (CA) (65%) como el grupo afroamericanos (AA) (62,9%), esta reducción se correlaciona significativamente con la metilación del gen

PMEPA1 y a su vez la disminución de expresión es menor en los tumores de PCa que en el epitelio prostático normal. En líneas celulares PMEPA1 se encuentra metilado sólo en las líneas celulares AR positivas (VCAP, LNCaP y LAPC4) y no en las AR negativos (DU145 y PC-3), sugiriendo la relación entre la metilación de PMEPA1 y AR [162].

El silenciamiento de PMEPA1 asociado al cáncer puede resultar en niveles elevados de señalización AR y un aumento de AR. También se ven afectados los genes inducibles por andrógeno como son Nkx3.1 y KLK3 (PSA). Nkx3.1 es un supresor de tumor y KLK3 /PSA es un marcador para el epitelio de la próstata diferenciada [162]

Estos datos proporcionan información sobre el papel de la metilación en el silenciamiento de PMEPA1 asociado a PCa con impacto potencial en el eje de AR en la próstata maligna [162]. La represión del gen PMEPA1 por metilación puede resultar en una disminución de la inhibición del crecimiento celular mediada por PMEPA1 en el cáncer de próstata conduciendo a la pérdida de una respuesta defensiva. La disminución de la expresión de PMEPA1 en el contexto de la señalización de andrógenos sugiere que la metilación del ADN puede interferir con el eje de diferenciación de sistema androgénica que resulta en la "catástrofe epigenética" del cáncer de próstata [162].

Otro genes Respuesta hormonal/Metabolismo

#### 5.9.5.6 EDNRB

El receptor de endotelina B interactúa con endotelinas para regular varios procesos biológicos críticos y pueden inducir la muerte celular por la progresión del tumor e inhibir la apoptosis [58]. Varios estudios han informado que el promotor de EDNRB se encuentra hipermetilado, en una alta proporción en los tumores de próstata y en mucho menos proporción en los tejidos normales [73,80, 84,100]. Sin embargo, otros estudios encontraron que las frecuencias de metilación de EDNRB en los tumores de próstata y tejidos normales eran iguales, aunque una alta proporción de tumores se encuentran metilados [100]. Debido a que existe una alta frecuencia de metilación tanto en tejidos normales como en los tumorales, la metilación en EDNRB no puede ser considerado como un biomarcador específico para el cáncer de próstata.

#### 5.9.5.7 MDRI

El gen de multirresistencia 1 (MDR1) codifica para la P-glicoproteína (P-gp), una bomba de eflujo transmembrana dependiente de calcio, que se expresa en diversos tejidos [165]. La P-glicoproteína (P-gp), participa activamente en el flujo de salida de agentes antineoplásicos de las células cancerosas. El transporte de sustratos específicos a través de membranas de lípidos, juega un papel importante en el metabolismo de esteroides y en la exportación de metabolitos, carcinógenos y fármacos citotóxicos, tales como antraciclinas, taxanos, y epipodofilotoxinas, junto con los otros miembros de los transportadores de la familia ABC, que proporciona protección contra xenobióticos y ciertas moléculas endógenas, la producción de la resistencia a múltiples fármacos (MDR), por el cual las células cancerosas se vuelven insensibles o no responde a un amplio espectro de medicamentos [74].

Ekonida y cols. determinaron que la frecuencia de metilación de MDR1 fue significativamente mayor en las muestras de cáncer de próstata en comparación con las muestras de HBP y que esta es independiente de la edad, pero si se correlaciona de manera positiva con el estadio patológico, la alta puntuación de Gleason y elevados niveles de PSA preoperatorio. Estos resultados sugieren que la hipermetilación del promotor de MDR1 es un evento frecuente en el cáncer de próstata y se relaciona con progresión de la enfermedad a través de un aumento de la proliferación celular en las células PCa [170].

Por otra parte Henrique y cols. demostraron que la metilación de MDR1 se encontró en 67,8% de los tumores de PCa, y en 37,8% de las lesiones PIN de alto grado (HGPIIN) y los tejidos de la próstata no cancerosas, incluyendo TNP (tejido normal prostático) y la HBP, presentaron bajos niveles de metilación, estos datos sugieren que la metilación de MDRI parece ocurrir temprano en la carcinogénesis de la próstata. Aunque la metilación del promotor se correlaciona inversamente con la expresión génica, el silenciamiento de MDR1, es en su mayoría probablemente debido a las modificaciones de histonas, lo cual fue sugerido con el dramático aumento de la expresión de MDR1 al tratar líneas celulares de PCa con un inhibidor de HDAC. Estos resultados sugieren fuertemente que las modificaciones de histonas son la principal causa del silenciamiento de MDR1 en PCa [74].

En base a estos estudios la hipermetilación del promotor de MDR1 no podría ser utilizado como un potencial marcador pronóstico para PCa, debido a que el evento epigenético que rige el silenciamiento está asociado a la modificación de histonas

#### 5.9.5.8 ABHD9

ABHD9, o EPHX3, codifica la epóxido hidrolasa 3. Poco se sabe sobre esta proteína, excepto que está involucrada en la desintoxicación y tratamiento de los epóxidos. La región promotora de ABHD9 se encontró hipermetilada significativamente en PCa de alto grado [77]. En otro estudio se encontró que la hipermetilación de ABHD9 era predictivo de BCR, así como se correlacionó con la puntuación de Gleason y el estadio tumoral [163]. El estudio de Weiss y cols. informó una asociación significativa entre la hipermetilación de ABHD9 y la progresión de PCa (BCR o recurrencia clínica) [108]. Y por último, un estudio más reciente [133], investigó el estado de metilación después de PR en pacientes de PCa. Aquí, la hipermetilación de ABDH9 no se encontró ser significativamente asociado con el tiempo de progresión. En base a los datos obtenidos por estos estudios, que incluye muestras de gran tamaño, hay algo de evidencia de apoyo que la hipermetilación de ABHD9 es un posible marcador pronóstico independiente para PCa.

#### 5.9.5.9 Chr3-EST

Chr3-EST es expresada en el cromosoma 3 y está hipermetilado en tumores de alto grado [166]. Cotrell y cols., demostraron en su estudio que la hipermetilación de Chr3-EST fue un predictor significativo de la BCR ajustado para la puntuación de Gleason, estadio tumoral y el estado quirúrgica margen [163], lo cual fue confirmado por el estudio de Weiss y cols [108] que la metilación de Chr3-EST es un predictor significativo de recurrencia bioquímica o clínica. Los resultados de estos dos estudios que utilizan grandes cohortes de pacientes, proporcionan evidencia preliminar de un potencial pronóstico de la metilación de Chr3-EST en la PCa y así justificar nuevas investigaciones.

#### 5.9.5.10 Lactato deshidrogenasa B1 (LDHB)

Leiblich y cols. estudiaron la relación existente entre el silenciamiento de LDHB por metilación en su promotor y la relación con la carcinogénesis de PCa. En sus resultados demostraron que la hipermetilación de LDHB ocurre en alta frecuencia en PCa (45%)

comparada con tejido prostático benigno (11%). Estudios de inmunohistoquímica demostraron que la expresión de LDHB era mucho menor en PCa (6%) que en el tejido benigno (81%), mostrando de esta manera que la pérdida de expresión de LDHB era producto del silenciamiento por metilación del ADN. Este hallazgo podría explicar una serie de observaciones claves relacionadas con el comportamiento y el metabolismo celular tumoral alterado visto en la próstata y otros cánceres. Por ejemplo, estudios previos han demostrado que la transformación maligna es asociada con un aumento en la excreción del flujo glucolítico y un incremento celular de lactato [171].

#### 5.9.5.11 LPL

La Lipoprotein Lipasa (LPL) es una enzima clave implicada en la homeostasis de los lípidos y el transporte. Además de catalizar la hidrólisis de los triglicéridos plasmáticos en quilomicrones y lipoproteínas de muy baja densidad, LPL también media una función de puente entre la lipoproteína remanente aterogénico y el receptor. Los defectos en LPL son la causa de hiperlipoproteinemia tipo I (hiperquilomicronemia familiar) [162].

El estudio desarrollado por Kim y cols. demostró que la hipermetilación del promotor de LPL ocurre en un 38% de las muestras de carcinomas prostáticos, mientras que no se detectó metilación en ninguna de las muestras normales. Dentro de varias características clínicas-patológicas probadas, se encontró que los niveles de PSA preoperatorio son significativamente mayores en los sujetos con la metilación del promotor de LPL en comparación con los sujetos sin metilación en el promotor de LPL. Adicionalmente, la desmetilación del promotor LPL fue acompañado por la reactivación de la transcripción de la LPL en las líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3. Es interesante observar que los niveles de expresión de LPL se ven disminuidos en tumores primarios en comparación con los tejidos normales de la próstata, pero previamente se ha descrito que los niveles de expresión de LPL fueron mayores en los tumores metastásicos en comparación con los tumores primarios. Es posible que la negativa regulación de la LPL en tumores primarios a través de la hipermetilación del promotor puede estar implicado en la iniciación del tumor, y que la reactivación de la LPL a través de la desmetilación del promotor puede promover la progresión tumoral y la metástasis, pero no hay evidencia que sugiera la desmetilación en tumores metastásicos [167]

#### 5.9.5.12 SOCS-3

Las proteínas de la familia SOCS, caracterizado por una región variable en el amino-terminal, una homología del dominio Src en la parte central (SH2), y un dominio carboxilo-terminal conservado (SOC S-box). No sólo son los principales inhibidores de la vía JAK/STAT sino que también tienen una función reguladora de la señalización de ERK/MAPK, PI3K/AKT, y del factor nuclear kB (NF-kB). El silenciamiento o la función alterada de las proteínas SOCS, debido a mutaciones o por la hipermetilación del promotor, con frecuencia se han encontrado en varios tipos de tumores, incluyendo Hodgkin y linfomas no Hodgkin, pulmón, ovario y carcinoma hepatocelular [168].

En el estudio de Pierconti y cols. se encontró que SOCS-3 se encuentra metilado en 20 de los 51 casos con PCa (39,2%), y solo se encontró metilación en aquellas muestras con puntuación de Gleason sobre 7, no se encontró metilación en puntuaciones de Gleason bajas (5 y 6) ni en tejidos HBP y normales. Además demostraron que la metilación del promotor de SOCS-3 es responsable de la disminución de los niveles de ARNm y de la proteína. Estos datos sugieren que la inactivación de SOCS-3 en PCa, en especial los casos con puntuación de Gleason desde 7 puede asociarse con un comportamiento más agresivo de PCa [168].

#### 5.9.5.13 Gen inducido por Tazaroteno 1 (TIG1)

Este gen, también conocido como gen de respuesta al receptor del ácido retinoico 1 se ha descrito con frecuencia silenciado en los tumores de próstata [171]. Varios investigadores informaron que TIG1 es metilado con frecuencia en los tumores de próstata, pero se encuentra bajos niveles de metilación o no se encuentran en tejidos normales o HBP [55, 92, 169]. Zhang y cols. encontraron que la metilación de TIG1 y RAR $\beta$  se correlacionó positivamente. El estudio de Ellinger y cols. analizó las posibilidades de diagnóstico y pronóstico del análisis de metilación de ADN en suero de pacientes con cáncer de próstata. Ellos encontraron que la hipermetilación de TIG1 era más frecuente en pacientes con cáncer de próstata (10%) que en la HBP (0%) y que en los individuos sanos (0%) [81]. Aunque la frecuencia de metilación de genes específicos son generalmente más bajos en el ADN del suero u orina, que aquellos en tejidos de la próstata, el uso de muestras biológicas no invasiva pueden ser significativo para el diagnóstico específico de cáncer de próstata [170], aunque en

este caso la frecuencia de metilación de TIG1 en suero no tiene diferencia significativa con la frecuencia de metilación encontrada en HBP y los controles sanos, por lo tanto no podría ser utilizado como marcador pronóstico de PCa.

#### 5.9.5.14 MTG1

El zinc participa en varios procesos fisiológicos, incluyendo el crecimiento y la proliferación celular. Aunque en condiciones normales los niveles de zinc en el tejido de la próstata son altos, hay una marcada disminución en el cáncer de próstata. Las metalotioneínas controlan el biodisponibilidad de zinc, y ha sido descrito que en varios cánceres humanos, la expresión de metalotioneína correlaciona con la proliferación celular, la progresión del tumor, y la resistencia a los medicamentos. Además, la isoforma MT1G se encuentra disminuida en el cáncer de próstata [171].

Henrique y cols. encontraron hipermetilación en 24% de los tejidos PCa y con menor frecuencia en HGPIN e HBP. El tejido normal proveniente de la zona periférica de la próstata no presento metilación, pero estos datos no mostraron diferencias significativas, por lo tanto a partir de los datos obtenidos de este estudio no se puede hacer inferencia acerca del rol de la metilación de MGT1 en PCa [171].

En la tabla N° 7 se resume algunos estudios relacionados con genes involucrados en procesos de respuesta hormonal y metabolismos, cuya hipermetilación ha sido descrita en muestras de Pca.

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
ESR1	Receptor de estrógeno	Tejido PCa PCa (60-70 años)	54/83 (65,1%) 89,6%	qPCR/secuenciación por bisulfito	[16]
		PCa	11%	MSP	[129]
RARβ2	Receptor de ácido retinoico	Suero PCa HBP	97,8% 10,6%	QMSP	[26]
		Tejido PCa Tejido HGPIIN Tejido HBP	97,5% 94,7% 23,3%	QMSP	[172]
		Tejido PCa Tejido HGPIIN Tejido Normal	75% 30% 0%	MSP	[84]
		Tejido PCa Tejido HBP	63% 0%	qPCR	[84]
		Tejido PCa Tejido HBP	95% 35%	QMSP	[85]
		Celulas circulantes PCa con BCR PCa	90% 68%	QMSP	[87]
		Tejido PCa	36%	MSP	[129]
		Orina PCa Orina normal	73% 11%	MSP	[91]
		Tejido PCa Tejido HGPIIN Tejido Normal	96,7% 88,3% 66,7%	MSP	[78]
		Tejido PCa Tejido Normal	89% 0%	MSP	[76]
EDNRB	Receptor de endotelina B	Orina post-DRE Orina post-biopsia	66% 77%	MSP	[88]
		Tejido PCa Tejido HBP	38% 15%	qPCR	[84]
		Tejido PCa Tejido HBP	100% 80%	QMSP	[104]
		Tejido PCa	15%	MSP	[77]
MDR1	Receptor de multirresistencia a drogas	Tejido PCa Tejido HBP	54,8% 11,6%	MSP	[173]
		Tejido PCa Tejido HGPIIN	67,8% 37,85	qPCR	[78]

<b>Gen</b>	<b>Nombre</b>	<b>Muestra/tipo de tejido</b>	<b>Porcentaje de Metilación promotor/ Número de casos positivos a metilación</b>	<b>Técnica</b>	<b>Referencia</b>
ABHD9		PCa GS $\geq$ 7	66,7%	MSP	[137]
		GS<7	46,6%		
		PCa con BCR	38,8%	qPCR	[170]
		PCa sin BCR	15,5%		
LDHB	Lactato Deshidrogenasa B1	Tejido Pca Tejido HBP Tejido benigno prostatico	14/31 (45%) 0/5 (0%) 2/19 (11%)	qPCR	[174]
LPL		Tejido PCa	21/56 (38%)	qPCR	[167]
SOCS-3		Tejido PCa Gleason= 7 Gleason=8 Gleason=9	11/23 (47,8%) 5/10 (50%) 4/5 (80%)	MSP	[168]
TIG1	Gen inducido por tarazoteno 1	Tejido PCa	96%	QMSP	[85]
		Tejido HBP	12%		
		Tejido PCa	70%	MSP	[76]
		Tejido Normal	0%		
MTG1	Metaloneína G1	Tejido PCa Tejido HGPIN Tejido HBP Tejido normal	29/121 (24%) 5/39 (13%) 3/29 (10%) 0/13 (0)	QMSP	[175]

**Tabla N° 7: Genes asociados a los procesos de respuesta hormonal y metabolismo hipermetilados en PCa.**

#### 5.10 Relación entre hipermetilación y el desarrollo del cáncer de próstata

La transformación de las glándulas epiteliales benignas a lesiones premalignas y su relación con el carcinoma invasivo representa un proceso de diversos pasos hasta el posterior desarrollo del cáncer de próstata [2]. La transformación de las células benignas prostáticas a lesiones preneoplásicas como PIN se ve influenciada por diversos factores tales como defectos genéticos, el envejecimiento, la dieta y los factores ambientales, todos ellos conocidos por contribuir a la carcinogénesis del cáncer de próstata [16].

Se han descrito varias lesiones morfológicas potencialmente precursoras de PCa, como HGPIN y PIA. La lesión PIN de alto grado (HGPIN) se compone de acinos y conductos prostáticos que son arquitectónicamente benignos, los cuales están revestidos por células citológicamente atípicas, y esta descrito es la lesión precursora

más probable para el desarrollo de cáncer de próstata, debido a las similitudes morfológicas y genéticas entre HGPIN y el cáncer de próstata invasivo [2,15,176].

El examen histopatológico y la inmunotinción de citoqueratina específica de células basales se utilizan comúnmente para distinguir diversas formas de lesiones precursoras de la de próstata a partir de glándulas benignas y cáncer de próstata. Ahora bien, ninguno de estos tiene un valor pronóstico para predecir qué lesión premaligna será estable y que progresará a cáncer invasivo; por lo tanto, la metilación puede ser un marcador sustituto de PIN y PIA. Además, se conoce que las lesiones PIN son anteriores a la aparición de cáncer por lo menos 5 años. Por lo tanto, la identificación de lesiones PIN a través de la metilación del ADN puede mejorar el diagnóstico precoz del cáncer de próstata [16]

En la actualidad diversos grupos se han centrado en el estudio de las frecuencias de metilación en las lesiones HGPIN, ya que esta descrito que la metilación del promotor ocurre en etapas tempranas de malignidades humanas [63], como las neoplasias humanas, incluyendo el cáncer de próstata [61]

En la presente revisión bibliografía se recolecto información de diversos estudios basados en la frecuencia de metilación en genes asociados a los procesos que se conoce están involucrados en la carcinogénesis del cáncer de próstata, diferenciando aquellas frecuencias alteradas en las distintas etapas del desarrollo del cáncer de próstata, para así encontrar un set de marcadores moleculares epigenéticos más específicos y sensibles, que permitan mejorar sustancialmente la detección temprana, tratamiento, seguimiento y el pronóstico de esta patología.

#### 5.11 Marcadores epigenéticos y su potencial utilidad en el diagnóstico de cáncer de próstata

Los marcadores basados en la metilación del ADN tienen un enorme potencial en: (1) la evaluación del riesgo de cáncer, (2) la detección temprana, y (3) el seguimiento a la terapia. Debido a que se ha informado de cambios tempranos en la metilación del ADN en la carcinogénesis, la identificación de la metilación del ADN aberrante ofrece la posibilidad de desarrollar pruebas de diagnóstico. Con un panel de genes metilados relacionados con el cáncer de próstata, urólogos y patólogos pueden disponer de una herramienta de diagnóstico molecular y una prueba no invasiva

altamente sensible y específica, no sólo para el diagnóstico, sino también para las estrategias de vigilancia [61]. Esto también permitirá realizar la prueba de una manera rentable. Las discusiones en curso sobre la utilidad de PSA como marcador de la presencia de cáncer de próstata pueden ser superados mediante la adición de un conjunto de marcadores de metilación en la orina o suero. Presencia de PSA elevado y la hipermetilación del promotor de ciertos genes en los fluidos corporales (orina, suero, fluidos de masaje prostático) puede aumentar la especificidad del ensayo. Como se mencionó antes, otra ventaja de la prueba de detección basado en el ADN (como prueba de metilación) es la estabilidad del ADN, los fluidos corporales pueden ser recogidos por los trabajadores de salud y los marcadores de metilación pueden ser probados en un laboratorio central. El análisis de los marcadores de metilación en el suero se puede utilizar incluso para la vigilancia de la enfermedad después de la prostatectomía completa [61].

Los resultados obtenidos en la presente revisión bibliográfica indican que efectivamente existen marcadores epigenéticos asociados a la metilación del ADN que tiene un potencial para ser usado en la detección temprana, pronóstico, seguimiento y tratamiento del cáncer de Próstata. Estos se resumen en la Tabla N° 8.

Gen	Tipo de muestra	N° de estudios	Rango del porcentaje de metilación y número de muestras analizadas				Referencias
			Normal	HBP	HGPIN	PCa	
<b>GSTP1</b>	Tejido	13	0-10% (n=11-91)	0-24% (n=3-69)	7-60% (n=8-128)	64-100% (n=8-170)	[60,67,68,89,66,79,69,71,73,99,64,80,74]
	Orina	3	0-13% (n=38-91)	29% (n=69)	13% (n=8)	48-83,2% (n=24-95)	[89,86,82]
	Plasma	2	0% (n=49)	7,4% (n=27)	-	21,4-30,6% (n=14-36)	[97,84]
<b>RASSF1A</b>	Tejido	5	0-45% (n=11)	0-93,3% (n=7-30)	29-100 (n=10-14)	53-99,2% (n=8-131)	[103,101,64,74,79]
	Orina	3	7-11% (n=38-91)	44,7% (n=253)	-	73-77,9% (n=52-95)	[105,86,82]
<b>APC</b>	Tejido	6	0-53% (n=11-91)	5,8-86,6% (n=8-69)	80,5-100% (n=38-128)	54-100% (n=30-170)	[69,71,73,80,64,99]
	Orina	2	4-5,3% (n=38-91)	-	-	48-50,5% (n=52-95)	[86,82]
<b>RARβ2</b>	Tejido	6	0-66% (n=11-30)	23,3-35% (n=9-30)	30-94,7% (n=10-128)	75-97,5% (n=24-118)	[170,79,80,73,71,99]
	Orina	3	2,6-11% (n=38-91)	29,2% (n=253)	-	62,1-73% (n=52-95)	[86,82,105]
<b>CD44</b>	Tejido	2	0% (n=11)	0% (n=7)	0% (n=10)	20-41% (n=8-24)	[74,79]
<b>PTGS2</b>	Tejido	2	-	15% (n=4-24)	-	68% (n=54-80)	[80,99]
	Suero	1	-	0% (n=42)	-	2,4% (n=168)	[87]

**Tabla N° 8: Genes con rol potencial como marcadores de diagnóstico y pronóstico en PCa**

La metilación de GSTP1, APC, RASSF1A, RARβ2, PTGS2, PITX2 y CD44 fue descrita por diversos estudios, a partir de distintos tipos de muestras: tejido, orina, suero y plasma. Los resultados de estos estudios arrojaron suficiente evidencia de la existencia de diferencias en las frecuencias de metilación de estos genes en las distintas etapas del desarrollo de cáncer de próstata.

La metilación de GSTP1, APC, RASSF1A y RARβ2 se encontró estar asociada a la progresión de PCa, ya que se encontraron diferencias significativas entre las

frecuencias de metilación entre el tejido prostático normal, HBP, HGPIN, y PCa, en la mayoría de los estudios revisados. Estos candidatos mostraron un potencial diagnóstico y pronóstico significativo en algunos estudios, pero en otros no. Los hallazgos contradictorios pueden explicarse por las variaciones en los diseños de instalación y estudios experimentales, como las diferencias en cohortes de pacientes, los métodos para el análisis de metilación, tipo de muestra y procesamiento, ya que debido a la naturaleza heterogénea y multifocal de PCa, las muestras de biopsias tomadas de la próstata pueden no representar la lesión más clínicamente relevante y no siempre ser representativa de la heterogeneidad intratumoral.

El potencial rol de estos genes como marcador de diagnóstico y pronóstico ha sido descrito por otras revisiones de la bibliografía:

- GSTP1 ha sido descrito en el estudio de Perry y cols 2006, Li y cols. 2004, Park y cols. 2010, Strand y cols. 2014, Park y cols. 2014, Bastian y cols. 2004 [63, 16, 62, 68, 146, 82].
- APC en el estudio de Perry y cols. 2006, Strand y cols. 2014, Park y cols. 2014, Hoque y cols. 2009, Li y cols. 2004 [63, 68, 146, 61, 16].
- RAR $\beta$ 2 en el estudio Perry y cols. 2006, Park y col. 2010, Strand y cols. 2014, Park y cols. 2014 [63, 62, 68, 146].
- RASSF1A en el estudio de Li y cols. 2004, Park y cols. 2010, Strand y cols 2014, Park y cols. 2014 [16, 62, 68, 146].

Tomando en cuenta los estudios revisados y los antecedentes obtenidos de otras revisiones bibliográficas, acerca del potencial rol de diagnóstico y pronóstico, podríamos proponer como marcadores de progresión para el diagnóstico y pronóstico de PCa la metilación de los genes GSTP1, RASSF1A, APC y RAR $\beta$ 2.

Para que un marcador sea clínicamente aplicable, debe ser específico, sensible y detectable en muestras obtenidas mediante procedimientos mínimamente invasivos como muestras de orina y plasma/suero. En cuanto a los marcadores propuestos para diagnóstico y pronóstico se analizaron diversos estudios en los cuales se determinó la metilación en diversas muestras como tejido (biopsia), orina, suero/plasma. Basándonos en los estudios analizados, no todos los genes tienen metilación diferencial que permita determinar la progresión de PCa (Ver Tabla 8). En el caso de GSTP1 los estudios que utilizaron el tejido proveniente de biopsias, determinaron de manera significativa, diferencias de metilación entre tejido prostático normal, HBP, HGPIN y PCa. Resultados similares se obtuvieron para APC y RAR $\beta$ 2. Para RASSF1A no se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de metilación entre los tejidos provenientes de HBP, HGPIN y PCa.

Cuando se analizo la metilación de estos genes a partir de muestras de orina, se encontraron diferencias significativas de metilación entre pacientes sanos, con HBP y PCa, para RASSF1A y RAR $\beta$ 2, para ambos genes no hay datos de pacientes con HGPIN. En el caso de APC solo se encontraron diferencias significativas en muestras de orina de pacientes sanos y pacientes con PCa. Para GSTP1 no se encontraron diferencias significativas al comparar las muestras de orina de pacientes sanos, con HBP, con HGPIN Y con PCa, por lo tanto en el caso de GSTP1 el valor diagnostico y pronóstico solo se determina a partir de muestras de biopsia (Ver Tabla 8).

En cuanto al análisis a partir de plasma/suero de los marcadores descritos, solo se encontraron estudios que analizaron la metilación de GSTP1, en los cuales se analizaron las muestras a partir de pacientes sanos, con HBP y con PCa, no se analizaron muestras de pacientes con HGPIN. Para GSTP1 existe una metilación con diferencia significativa entre los pacientes sanos, HBP y PCa, pero los porcentajes de metilación fueron bastante menor que los obtenidos a partir de muestras de biopsia, esto puede deberse principalmente a las diferencias de sensibilidad y especificidad de los métodos utilizados para la medición de los porcentajes de metilación (Ver Tabla 8).

Por otra parte la metilación de PTGS2 y PITX2 se encontró estar presente principalmente en el avance desde HGPIN a PCa y desde PCa a un estado más agresivo (PCa metastásico). Ambos genes se han descrito asociados a la recidiva bioquímica post prostatectomía, por lo que pueden ser utilizados como marcadores de seguimiento al tratamiento.

En el caso de PITX2 diversos estudios analizados indican que la metilación de este gen entrega información pronóstica independiente para BCR, cuando se analizan las muestras obtenidas de PR [106-107,110], además se ha descrito que la metilación de PITX2 permite subestratificar los tumores GS=7, entre tumores GS=3+4 y GS=4+3, y por lo tanto permite predecir BCR en PCa de alto riesgo [108-111]. Resultados similares fueron descritos por la revisión bibliográfica de Strand y cols 2014, Park y cols. 2012 en donde también se describe la metilación de PITX2 como valor pronóstico de BCR en muestras de PCa de alto riesgo [68, 53].

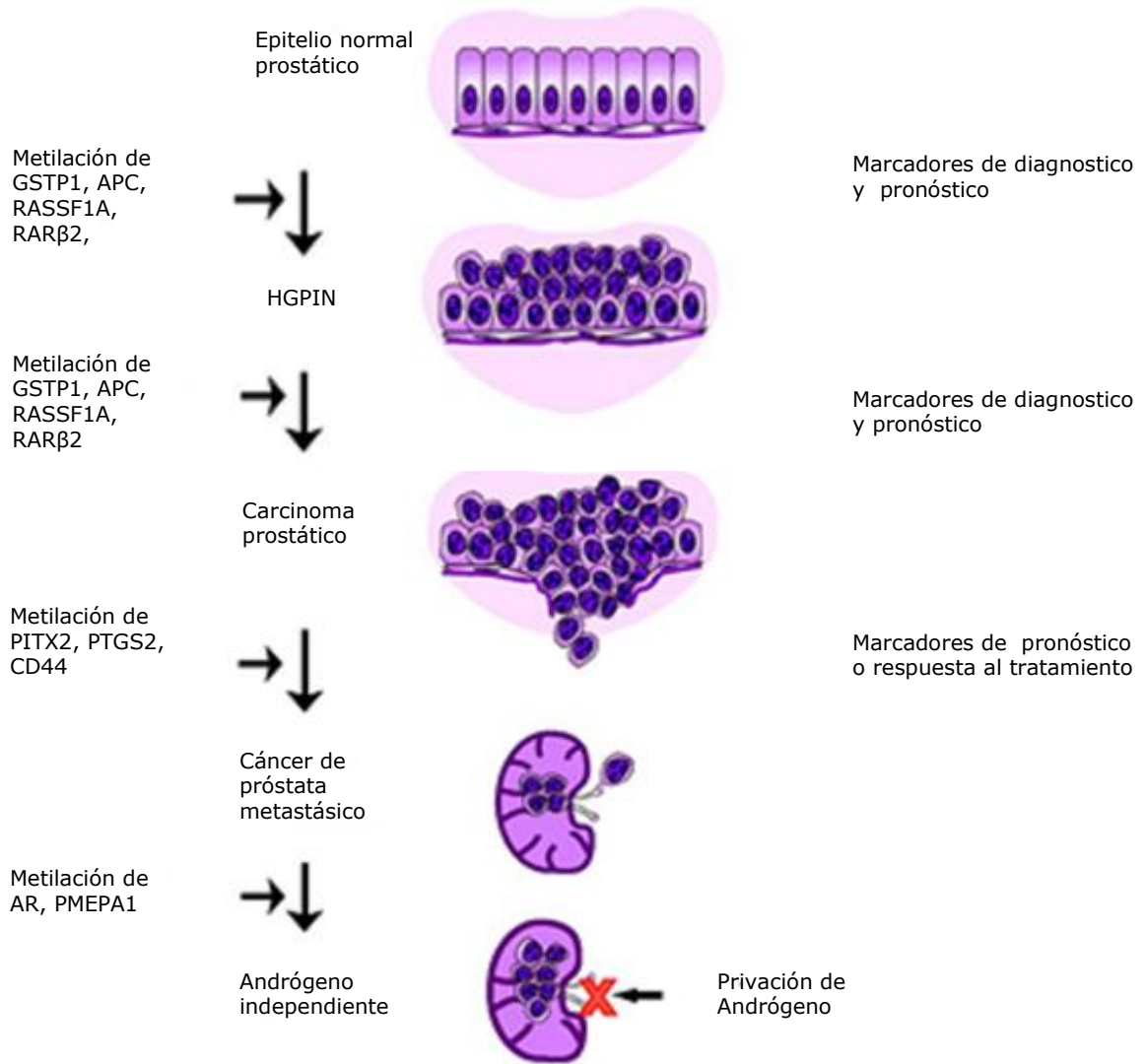
Para PTGS2 estudios sugieren que la metilación se relaciona con un incremento de la severidad de la enfermedad [76] y con BCR [76,80,99], independiente de GS y estadio tumoral. Además se ha descrito que la combinación de la metilación de PTGS2

con la metilación de CD44 parece ser un predictor independiente y significativo de BCR [99]. Resultados similares fueron descritos también en los estudios de Strand y cols 2014, Park y cols. 2010, Bastian y cols. 2004 y Perry y cols. 2006 [68,62 82,63]. Estos hallazgos sugieren que la metilación de PTGS2 tiene un rol pronóstico de agresividad de PCa y de BCR.

La metilación de CD44 ha sido descrita únicamente con la agresividad de PCa, como un marcador selectivo del avance de PCa a la forma metastásica. En diversas revisiones bibliográficas realizadas por distintos grupos, como por ejemplo Li y cols 2004, Park y cols 2014, Park y cols. 2010, Strand y cols. 2014 [16, 146, 62, 68] . Han descrito que la metilación de CD44 es un marcador pronóstico de agresividad de PCa. En la presente revisión solo se encontraron dos estudios que confirman el valor pronóstico de CD44 [72,76], pero teniendo en cuenta el número de estudios que han descritos el rol pronóstico de la metilación de CD44, es necesario incluirlo dentro los posibles marcadores con un rol pronóstico potencial que podría ser utilizado para determinar la agresividad de PCa.

En el caso de la metilación de PMEPA1 y AR, son indicativos de cáncer resistentes a la castración, en general son los indicadores del peor pronóstico en Pca. Para AR se ha descrito que la metilación es mayor en HRPC que en tumores primarios [57,159], resultados que también han sido descritos por las revisiones de Park y cols. 2010, Park y cols. 2012, Li y cols. 2004 y Park y cols. 2014 [62,53,16,146] . En el caso de PMEPA1 la metilación ha sido descrita únicamente en HRPC [161,162], por lo que en conjunto con la metilación de AR, podrían ser utilizados como marcadores para PCa independiente de andrógeno.

En la Figura 11 se esquematizan los genes que tienen un rol potencial para ser utilizados como marcadores de diagnóstico y pronóstico PCa



**Figura 11:** Esquema representativo de los diferentes genes hipermetilados en distintas etapas de progresión del PCa

Para poder determinar efectivamente si estos genes pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico y pronóstico de PCa, los métodos utilizados para medir los niveles de metilación deben tener una alta sensibilidad y especificidad en distintos tipos de muestras, por ejemplo: tejido, orina, suero, plasma y semen.

La sensibilidad (S) de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene un enfermo de dar un resultado positivo en dicha prueba.

$$S = \frac{\text{Verdaderos positivos (vp)}}{\text{Verdaderos positivos (vp)} + \text{Falsos negativos (fn)}}$$

La especificidad (E) de una prueba diagnóstica es la probabilidad que tiene una persona sin la enfermedad de interés de dar un resultado negativo en dicha prueba.

$$E = \frac{\text{Verdaderos negativos (vn)}}{\text{Verdaderos negativos (vn)} + \text{Falsos positivos (fp)}}$$

En la Tabla N° 9 se resumen los valores de sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo (PPV) y negativo (NPV) obtenidos de los estudios analizados en esta revisión.

Gen	Tipo de muestra	Método	Sensibilidad (95% IC)	Especificidad (95% IC)	PPV (95% IC)	NPV (95% IC)	Ref.
		<b>PSA</b>	82,8	38,6	28,2	88,6	[67]
		<b>Histología</b>	70,4	100	100	92,1	[67]
<b>GSTP1</b>	Tejido PR	MSP	91,8	96,2	97,8	86,2	[60]
	Tejido	QMSP	71,8	96	95,8	72,7	[68]
	Tejido PR	QMSP	92,5	84,6	94,9	78,6	[80]
	Suero	MSP	42,3	92,9	95,9	28,7	[87]
	Orina	MSP	33	95	-	-	[88]
	Tejido	MSP	92	86	82	94	[90]
	Tejido	MSP	93,2	100	100	83,3	[76]
<b>APC</b>	Tejido PR	MSP	88,7	96,2	97,7	82	[60]
	Tejido PR	QMSP	80	50	87,7	44,8	[80]
	Orina	MSP	36	91	-	-	[88]
	Tejido	MSP	90,4	96	98,5	77,4	[76]
<b>RASSF1A</b>	Tejido	MSP	87,7	92	97	71,9	[76]
	Tejido PR	QMSP	81	98	-	-	[106]
<b>RARβ2</b>	Tejido PR	QMSP	95	65,4	89,4	81	[80]
	Orina	MSP	40	84	-	-	[88]
<b>PTGS2</b>	Tejido PR	QMSP	67,5	84,6	93,1	45,8	[80]
	Tejido	MSP	87,7	92	97	73,5	[76]
<b>PITX2</b>	Tejido PR	MSP	36	98	-	-	[107]
<b>GSTP1 y RARβ2</b>	Tejido PR	QMSP	88,8	92,3	97,3	77,4	[80]
<b>GSTP1 y APC</b>	Orina	MSP	51	89	-	-	[88]
<b>GSTP1, APC y RARβ2</b>	Orina	MSP	55	80	-	-	[88]

**Tabla N° 9:** Valores de sensibilidad, especificidad, valor pronóstico positivo (PPV) y negativo (NPV) obtenidos desde algunos de los estudios analizados.

Como ya hemos descrito anteriormente, en la actualidad el único método pronóstico utilizado en PCa, es el método histológico de la puntuación de Gleason, éste presenta una alta especificidad y sensibilidad (100% y 70,4% respectivamente), al compararlo con el método utilizado para determinar los niveles de PSA, el cual, si bien presenta una alta sensibilidad (82,8%), presenta muy baja especificidad (38,6%). En el caso del método histológico al tener alta sensibilidad y especificidad, el resultado positivo mediante este método efectivamente será en pacientes que padecen PCa y un resultado negativo confirmara la no presencia de PCa, en el caso del método utilizado para la medición de PSA, al presentar baja especificidad pero alta sensibilidad traerá como inconveniente una alta probabilidad de falsos positivos.

Por lo tanto para poder determinar si los niveles de metilación de los genes descritos, pueden ser utilizados como marcadores de diagnóstico y pronóstico, los métodos utilizados para esta medición, principalmente QMSP y MSP, deben tener valores altos de sensibilidad y especificidad, para que sean efectivamente un buen método de diagnóstico de PCa. A partir de la tabla podemos inferir que estos métodos tienen valores de sensibilidad que varían entre 67,5-95% para QMSP y 87,7-93,2% para MSP, y en cuanto a la especificidad los valores fluctúan entre 50-96% para QMSP y 86-100% para MSP, estos valores de sensibilidad y especificidad para ambos métodos se obtienen cuando la muestra analizada es tejido ya sea proveniente de una biopsia o tejido obtenido de PR, si bien para ambos métodos los valores de sensibilidad y especificidad son en general altos, el hecho de realizar las mediciones en muestras de tejido traen consigo el problema de realizar el análisis a través de métodos invasivos.

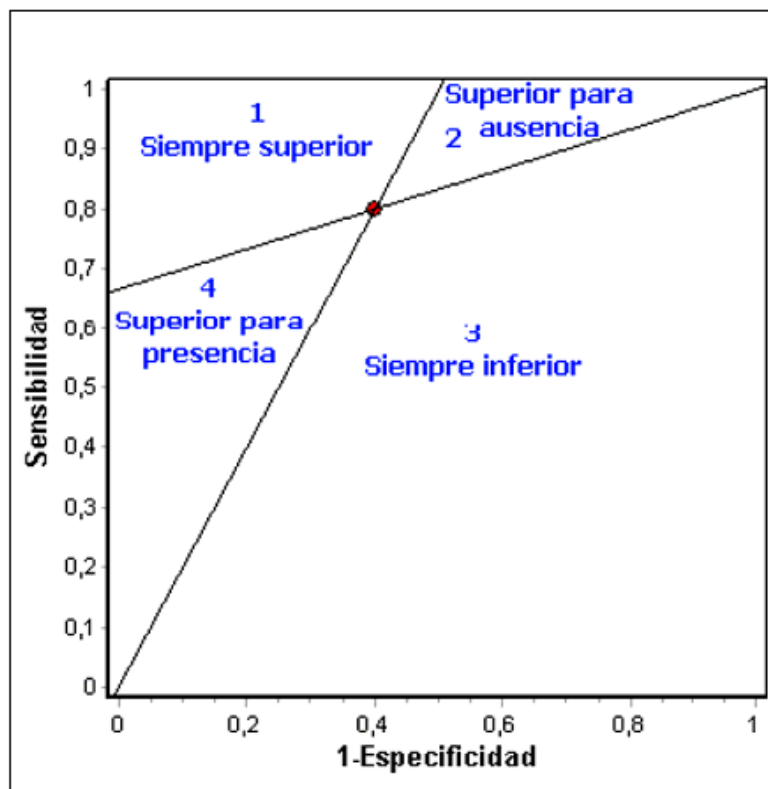
Por otra parte, al utilizar estos mismos métodos en muestras obtenidas mediante métodos no invasivos, como son las muestras de orina y suero, tenemos el problema que la sensibilidad disminuye notablemente, en el caso de suero sólo un estudio entrega los valores de sensibilidad (42,3%) y especificidad (92,9%) utilizando como método de análisis MSP y en el caso de orina los valores varían entre 33-40% para sensibilidad y 84-95% para especificidad, para MSP (no hay datos para QMSP) en este caso se pierde sensibilidad al utilizar como muestras orina o suero para determinar los niveles de metilación de un gen con potencial uso como marcador de diagnóstico y pronóstico.

Al tener estos métodos alta especificidad pero baja sensibilidad conlleva a tener un alto porcentaje de falsos negativos, es decir pacientes que efectivamente presenten PCa no sean diagnosticados con esta patología, lo que claramente lleva a no realizar el tratamiento necesario que podría curar al paciente que padece PCa.

Ahora si la medición de los niveles de metilación se realizan en combinación de dos o más genes con potencial uso como marcadores, en el caso del tejido la sensibilidad se mantiene dentro del rango (88,8%) y la especificidad aumenta a un 92,3% (sólo un estudio entrega datos) y en el caso que la muestra utilizada sea orina la sensibilidad aumenta a un 51% cuando se analizan dos genes y a un 55% cuando se analizan tres genes, en el caso de la especificidad, se obtiene un 80% cuando se analizan dos genes y 89% cuando se analizan tres genes, en ambos casos utilizando la

técnica MSP, en cuanto a la utilización de suero como muestra no hay datos de sensibilidad y especificidad al combinar dos o más genes.

Para poder evaluar si efectivamente la medición de los niveles de metilación podría ser utilizada como método diagnóstico realizamos la comparación con los actuales métodos utilizados para diagnóstico (PSA sérico) y el método pronóstico del examen histológico de la puntuación de Gleason. Para realizar esta comparación basándonos en los valores de sensibilidad y especificidad de cada uno lo podemos realizar a través de la siguiente grafica.

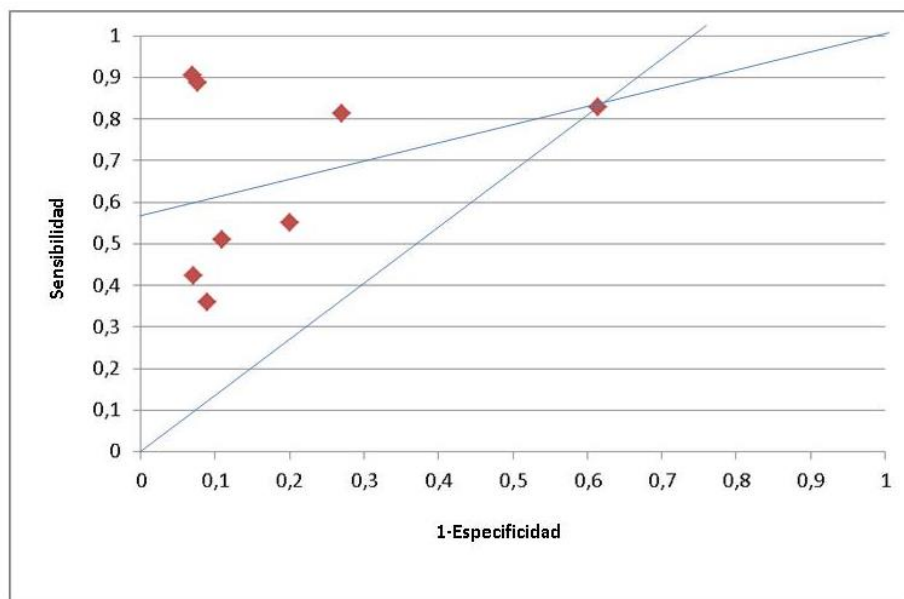


**Figura 12:** Las zonas corresponden a las siguientes situaciones: 1: en esta región la prueba B es siempre superior a la A, tanto para confirmar presencia como ausencia de la enfermedad; 2: aquí la prueba B sólo es superior a la A para confirmar ausencia de enfermedad; 3: en esta zona B es inferior a A; 4: si el resultado de B está en esta área, será superior a A para confirmar presencia de enfermedad.

Esta grafica se realiza para comparar los cocientes de probabilidad de dos pruebas diagnósticas en donde existen cuatro posibles resultados, que podemos reflejar en una gráfica. En el eje de las Y representamos la sensibilidad,

en el eje de las X se representa (1-especificidad). El punto representa los valores observados de sensibilidad y (1-especificidad) para la prueba con la cual queremos comparar. Se traza una línea desde el origen (0,0) que pase por el punto que corresponde a las coordenadas ((1-especificidad); sensibilidad) de la prueba con la que vamos a comparar, y luego se traza otra línea desde el punto (1,1) que también pase por el punto ((1-especificidad); sensibilidad) de la prueba con la que vamos a comparar. De esta manera el grafico queda dividido en cuatro zonas como se representa en la figura 11, de tal manera que cualquier otra prueba quedará representada en una de las cuatro zonas.

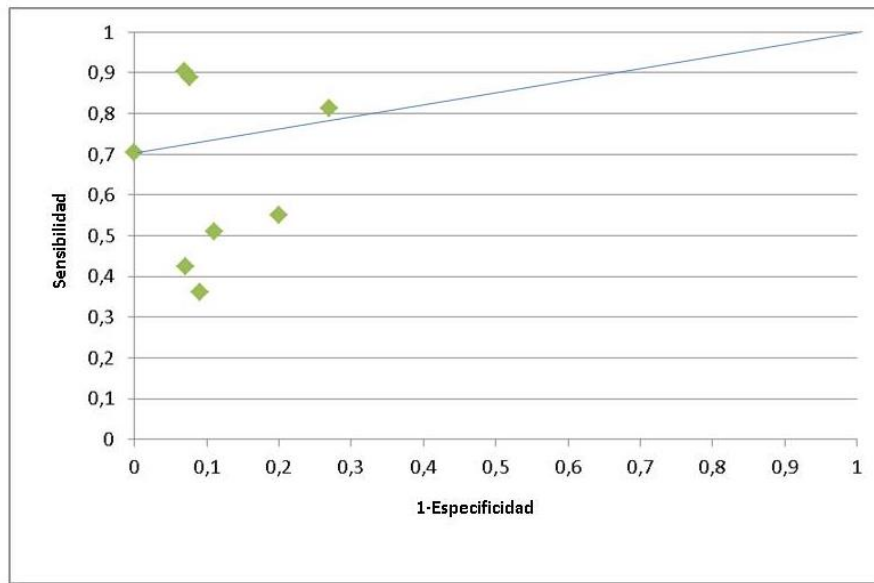
Si hacemos la comparación de la medición de los niveles de metilación utilizando como técnica QMSP o MSP en muestra de tejido, orina o suero con la medición de PSA sérico se obtiene la siguiente grafica:



En este caso podemos ver que la medición de los niveles de metilación en tejido utilizando como técnica QMSP (0,27; 0,8125) o MSP (0,07; 0,9045) y la medición de dos genes en tejido usando QMSP (0,077; 0,888) caen dentro de la zona 1, es decir la medición de los niveles de metilación ya sea de uno o dos genes usando QMSP o MSP son siempre mejores métodos diagnóstico en comparación con la medición de los niveles séricos de PSA para confirmar presencia o ausencia de PCa. En tanto la

medición de los niveles de metilación de uno (0,09; 0,36), dos (0,11; 0,51) o tres genes (0,20; 0,55) en orina utilizando MSP al igual que la medición en suero utilizando MSP (0,071; 0,423) caen dentro de la zona 4, es decir la medición de los niveles de metilación ya sea de uno, dos o tres genes en orina y la medición de un gen en suero usando MSP son métodos diagnóstico superior a PSA para confirmar presencia de PCa.

Si hacemos la comparación de la medición de los niveles de metilación utilizando como técnica QMSP o MSP en muestra de tejido, orina o suero con el examen histológico se obtiene la siguiente grafica:



En esta grafica al tener el examen histologico una especificidad de 100% y una sensibilidad de 70,4% el punto para realizar las diferentes zonas, en la grafica se pierde la zona 1 y 4 y sólo tendremos la zona 2 y 3. En este caso podemos ver que la medición de los niveles de metilación en tejido utilizando como técnica QMSP (0,27; 0,8125) o MSP (0,07; 0,9045) y la medición de dos genes en tejido usando QMSP (0,077; 0,888) caen dentro de la zona 2, es decir la medición de los niveles de metilación ya sea de uno o dos genes usando QMSP o MSP son mejores métodos diagnóstico en comparación con el examen histologico para confirmar ausencia de PCa. En tanto la medición de los niveles de metilación de uno (0,09; 0,36), dos (0,11; 0,51) o tres genes (0,20; 0,55) en orina utilizando MSP al igual que la medición en suero utilizando MSP (0,071; 0,423) caen dentro de la zona 3, es decir la medición de los niveles de metilación ya sea de uno, dos o tres genes en orina y la medición de un gen

en suero usando MSP son siempre métodos diagnóstico inferiores para confirmar presencia o ausencia de PCa.

Por lo tanto basándonos en la comparación realizada, la medición de los niveles de metilación utilizando como muestra tejido parece ser un método diagnóstico superior al método utilizando en la actualidad (PSA sérico), en cambio no es un método superior al método del examen histológico de la puntuación de Gleason. Si analizamos ahora la medición de los niveles de metilación utilizando como muestra orina o suero vemos que este es un buen método sólo para confirmar presencia de PSA al compararlo con PSA sérico, pero no es un buen método al compararlo con el examen histológico.

## **6. CONCLUSIÓN**

El PCa es la segunda causa de muerte en hombres en Chile y en el mundo y en las últimas décadas, a pesar de los métodos de tamizaje y diagnóstico, se ha caracterizado por un aumento sostenido en la incidencia y la mortalidad. PCa se puede presentar de forma indolente en que el paciente morirá con PCa, pero no de este, y también se presenta como una forma agresiva, en donde la posibilidad de supervivencia disminuye si no es detectado de manera temprana.

En la actualidad los métodos utilizados para el diagnóstico de PCa, carecen de sensibilidad y especificidad (Para PSA; especificidad 25-35%, sensibilidad 75-85%), por lo tanto no son capaces de discernir entre un PCa indolente de uno agresivo o entre PCa y otras patologías asociadas a la próstata, como lesiones pre neoplásicas e HBP.

Es por este motivo que surge la necesidad de crear un set de marcadores moleculares, principalmente marcadores epigenéticos asociados a la metilación del ADN, que permitan tanto el diagnóstico precoz, como la distinción entre un PCa indolente de uno agresivo. La gran ventaja que presentan los marcadores epigenéticos es que presentan una mayor sensibilidad y especificidad, al compararlo con PSA, cuando la muestra analizada es tejido. Aunque se ha descrito que la metilación del ADN puede ser detectada en distintos tipos de muestras, incluyendo orina, suero y plasma, por lo tanto estos pueden ser medidos mediante métodos no invasivos, al compararlo con PSA y examen histológico, este método no es mejor método diagnóstico o pronóstico

En la presente revisión se encontró un set de marcadores que pueden ser utilizados para el diagnóstico, pronóstico y como medida de respuesta al tratamiento, que permiten estar alertas de una posible recidiva bioquímica después de la prostatectomía radical, como también pueden ser utilizados para la determinación de la presencia de un cáncer resistente a la castración, pero solo cuando la medición de los niveles de metilación sea realizada en muestras de tejido.

A partir de los análisis realizados podemos concluir que existen diversos set de marcadores que nos permitirán hacer la evaluación del PCa y poder estadificarlo para determinar su posible tratamiento.

Para poder distinguir el PCa en etapa muy temprana (transición epitelio normal a HGPIN), se podrían utilizar como marcadores de diagnóstico los niveles de metilación de GSTP1, RASSF1A, APC y RAR $\beta$ 2

Para poder distinguir el desarrollo de PCa primario (Transición HGPIN a PCa), se podrían utilizar como marcadores de diagnóstico y pronóstico los niveles de metilación de GSTP1, RASSF1A, APC y RAR $\beta$ 2.

Para distinguir un PCa agresivo (transición PCa a PCa metastásico), se podrían utilizar como marcadores de pronóstico o de respuesta al tratamiento los niveles de metilación de PSTG2, PITX2 y CD44. Cabe destacar también que los niveles de metilación de PITX2 y CD44 también tienen un potencial uso en la detección de la recidiva bioquímica después de la prostatectomía radical.

Para distinguir un PCa resistente a castración se podrían utilizar los niveles de metilación de AR y PMEPA1, la detección de este tipo de PCa, es el peor pronóstico, ya que disminuyen dramáticamente la posibilidad de supervivencia del paciente.

Estos marcadores en conjunto aumentan aún más los valores de especificidad y sensibilidad, que al utilizarlos por separado, por eso se recomienda que la utilización de estos se realice como un set de marcadores para PCa. Con un panel de genes metilados específicos en cáncer de próstata, urólogos y patólogos podrían disponer de una herramienta de diagnóstico molecular y una prueba no invasiva altamente sensible y específica, no sólo para el diagnóstico, sino también para las estrategias de vigilancia. Una ventaja es la denominada estrategia de múltiples marcado, en donde un marcador molecular puede no detectar un grupo heterogéneo de cánceres de próstata de una manera altamente específica y sensible, la prueba de metilación (consistente en el panel de genes altamente específicos) examina el panel de genes que incluye todos los genes de las rutas importantes que alteran en el cáncer de próstata. Para poder validar estos set de marcadores epigenéticos es necesario que futuros estudios se enfoquen en la aplicación de estos como métodos clínicos de diagnóstico y pronóstico, incluyéndolos en los nomogramas utilizados en la actualidad, para así evaluar la efectividad de estos y su potencial implementación en el área clínica.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

1. Bhavsar, A. and S. Verma, *Anatomic imaging of the prostate*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 728539.
2. Joshua, A.M., et al., *Prostatic preneoplasia and beyond*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1785**(2): p. 156-81.
3. Gardiner, R., *Prostate Cancer Detection*, 2014: Europe PubMed Central.
4. Sarikaya, S., et al., *Evaluation of the pathologic results of prostate biopsies in terms of age, Gleason score and PSA level: our experience and review of the literature*. Arch Ital Urol Androl, 2014. **86**(4): p. 288-90.
5. Frydenberg, M., *Benign Prostate Disorders*. Europe PubMed Central, 2012.
6. Maya, R.-L., *Patologías benignas de la próstata: prostatitis e hiperplasia benigna*. Rev Biomed, 2007. **18**(1): p. 13.
7. Rodriguez-Berriguete, G., et al., *Role of IAPs in prostate cancer progression: immunohistochemical study in normal and pathological (benign hyperplastic, prostatic intraepithelial neoplasia and cancer) human prostate*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 18.
8. Miah, S. and J. Catto, *BPH and prostate cancer risk*. Indian J Urol, 2014. **30**(2): p. 214-8.
9. Institute, N.C. *Prostate Cancer Treatment (PDQ®): Patient Version*. . 2002.
10. Hsing, A., *prostate cancer epidemiology*. Bioscience, 2006. **11**: p. 26.
11. Hughes, C., et al., *Molecular pathology of prostate cancer*. J Clin Pathol, 2005. **58**(7): p. 673-84.
12. Buhmeida, A., et al., *Prognostic factors in prostate cancer*. Diagn Pathol, 2006. **1**: p. 4.
13. Ministerio de Salud, C., *Guía Clínica PRÓSTATA EN PERSONAS DE 15 AÑOS Y MÁS*. Minsal, 2010: p. 44.
14. Nelson, W., *Prostate cancer prevention*. The Journal of Nutrition, 2004. **134**: p. 2.
15. Li, L.C., P.R. Carroll, and R. Dahiya, *Epigenetic changes in prostate cancer: implication for diagnosis and treatment*. J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(2): p. 103-15.
16. Li, L.C., S.T. Okino, and R. Dahiya, *DNA methylation in prostate cancer*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1704**(2): p. 87-102.
17. Shore, N., *Management of Early Stage Prostate Cancer*. Am J Manag, 2014. **20**(13): p. 5260.
18. Spans, L., et al., *The genomic landscape of prostate cancer*. Int J Mol Sci, 2013. **14**(6): p. 10822-51.
19. Manoharan, M., *Epigenetic targets in the diagnosis and treatment of prostate cancer*. International Brazil Journal Urology, 2007. **33**(1): p. 8.
20. Humphrey, P.A., *Gleason grading and prognostic factors in carcinoma of the prostate*. Mod Pathol, 2004. **17**(3): p. 292-306.
21. Makarov, D., *Updated nomogram to predict pathologic stage of prostate cancer given prostate-specific antigen level, clinical stage, and biopsy Gleason score (Partin tables) based on cases from 2000 to 2005*. Urology, 2007. **69**(6): p. 11.
22. Montironi, R., et al., *Gleason grading of prostate cancer in needle biopsies or radical prostatectomy specimens: contemporary approach, current clinical significance and sources of pathology discrepancies*. BJU Int, 2005. **95**(8): p. 1146-52.

23. Eifler, J.B., et al., *An updated prostate cancer staging nomogram (Partin tables) based on cases from 2006 to 2011*. BJU Int, 2013. **111**(1): p. 22-9.
24. Verma, M., P. Patel, and M. Verma, *Biomarkers in prostate cancer epidemiology*. Cancers (Basel), 2011. **3**(4): p. 3773-98.
25. Truong, M., et al., *Using the Epigenetic Field Defect to Detect Prostate Cancer in Biopsy Negative Patients*. The Journal of Urology, 2013. **189**(6): p. 2335-2341.
26. Damaschke, N.A., et al., *Epigenetic susceptibility factors for prostate cancer with aging*. Prostate, 2013. **73**(16): p. 1721-30.
27. Marjolaine, N., *Epigenetic modifications in prostate cancer*. Epigenomics, 2014. **6**(4): p. 12.
28. Nelson, W.G., A.M. De Marzo, and S. Yegnasubramanian, *Epigenetic alterations in human prostate cancers*. Endocrinology, 2009. **150**(9): p. 3991-4002.
29. Dobosy, J.R., et al., *The expanding role of epigenetics in the development, diagnosis and treatment of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia*. J Urol, 2007. **177**(3): p. 822-31.
30. Jeronimo, C., et al., *Epigenetics in prostate cancer: biologic and clinical relevance*. Eur Urol, 2011. **60**(4): p. 753-66.
31. Valdes-Mora, F. and S.J. Clark, *Prostate cancer epigenetic biomarkers: next-generation technologies*. Oncogene, 2014. **34**(13): p. 1609-18.
32. Pang, Y., C.Y.F. Young, and H. Yuan, *MicroRNAs and prostate cancer*. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2010. **42**(6): p. 363-369.
33. Coppola, V., R. De Maria, and D. Bonci, *MicroRNAs and prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2010. **17**(1): p. F1-17.
34. Chen, Y., et al., *MicroRNAs 221/222 and genistein-mediated regulation of ARHI tumor suppressor gene in prostate cancer*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(1): p. 76-86.
35. Shi, X.B., et al., *miR-125b promotes growth of prostate cancer xenograft tumor through targeting pro-apoptotic genes*. Prostate, 2011. **71**(5): p. 538-49.
36. Majid, S., et al., *MicroRNA-205-directed transcriptional activation of tumor suppressor genes in prostate cancer*. Cancer, 2010. **116**(24): p. 5637-49.
37. Hulf, T., et al., *Epigenetic-induced repression of microRNA-205 is associated with MED1 activation and a poorer prognosis in localized prostate cancer*. Oncogene, 2013. **32**(23): p. 2891-9.
38. Lin, S.L., et al., *Loss of mir-146a function in hormone-refractory prostate cancer*. RNA, 2008. **14**(3): p. 417-24.
39. Majid, S., et al., *miR-23b represses proto-oncogene Src kinase and functions as methylation-silenced tumor suppressor with diagnostic and prognostic significance in prostate cancer*. Cancer Res, 2012. **72**(24): p. 6435-46.
40. Suh, S.O., et al., *MicroRNA-145 is regulated by DNA methylation and p53 gene mutation in prostate cancer*. Carcinogenesis, 2011. **32**(5): p. 772-8.
41. Avgeris, M., et al., *The loss of the tumour-suppressor miR-145 results in the shorter disease-free survival of prostate cancer patients*. Br J Cancer, 2013. **108**(12): p. 2573-81.
42. Hagman, Z., et al., *The tumour suppressor miR-34c targets MET in prostate cancer cells*. Br J Cancer, 2013. **109**(5): p. 1271-8.
43. Rauhala, H.E., et al., *miR-193b is an epigenetically regulated putative tumor suppressor in prostate cancer*. Int J Cancer, 2010. **127**(6): p. 1363-72.
44. Kristensen, H., et al., *Hypermethylation of the GABRE~miR-452~miR-224 promoter in prostate cancer predicts biochemical recurrence after radical prostatectomy*. Clin Cancer Res, 2014. **20**(8): p. 2169-81.
45. Chen, Z., et al., *Histone modifications and chromatin organization in prostate cancer*. Epigenomics, 2010. **2**(4): p. 551-60.

46. Ke, X.-S., *Genome-Wide Profiling of Histone H3 Lysine 4 and Lysine 27 Trimethylation Reveals an Epigenetic Signature in Prostate Carcinogenesis*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. 14.
47. Marjolaine, N., *The association between histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and prostate cancer relationship with clinicopathologica*. BioMed Central, 2014. **14**(994): p. 15.
48. Tan, D., et al., *Histone trimethylation of the p53 gene by expression of a constitutively active prolactin receptor in prostate cancer cells*. Chin J Physiol, 2013. **56**(5): p. 282-90.
49. Ellinger, J., et al., *Global histone H3K27 methylation levels are different in localized and metastatic prostate cancer*. Cancer Invest, 2012. **30**(2): p. 92-7.
50. Behbahani, *Alterations of global histone H4K20 methylation during prostate carcinogenesis*. BMC Urology, 2012. **12**(5): p. 6.
51. Ezponda, T., et al., *The histone methyltransferase MMSET/WHSC1 activates TWIST1 to promote an epithelial-mesenchymal transition and invasive properties of prostate cancer*. Oncogene, 2013. **32**(23): p. 2882-90.
52. Yegnasubramanian, S., et al., *DNA hypomethylation arises later in prostate cancer progression than CpG island hypermethylation and contributes to metastatic tumor heterogeneity*. Cancer Res, 2008. **68**(21): p. 8954-67.
53. Yang, M. and J.Y. Park, *DNA Methylation in Promoter Region as Biomarkers in Prostate Cancer*. 2012. **863**: p. 67-109.
54. Brothman, A.R., et al., *Global hypomethylation is common in prostate cancer cells: a quantitative predictor for clinical outcome?* Cancer Genet Cytogenet, 2005. **156**(1): p. 31-6.
55. Cho, N.Y., et al., *Genomic hypomethylation and CpG island hypermethylation in prostatic intraepithelial neoplasm*. Virchows Arch, 2009. **454**(1): p. 17-23.
56. Yang, B., et al., *Evaluation of global DNA hypomethylation in human prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasm tissues by immunohistochemistry*. Urol Oncol, 2013. **31**(5): p. 628-34.
57. Cho, N.Y., et al., *Hypermethylation of CpG island loci and hypomethylation of LINE-1 and Alu repeats in prostate adenocarcinoma and their relationship to clinicopathological features*. J Pathol, 2007. **211**(3): p. 269-77.
58. Florl, A.R., et al., *Coordinate hypermethylation at specific genes in prostate carcinoma precedes LINE-1 hypomethylation*. Br J Cancer, 2004. **91**(5): p. 985-94.
59. Tokizane, T., et al., *Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5793-801.
60. Ercole, C., *Catechol estrogen metabolites and conjugates in different regions of the prostate of Noble rats treated with 4-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced initiation of prostate cancer*. Carcinogenesis, 2002. **23**(2): p. 5.
61. Hoque, M.O., *DNA methylation changes in prostate cancer: current developments and future clinical implementation*. Expert Rev Mol Diagn, 2009. **9**(3): p. 243-257.
62. Jong, P., *Promoter hypermethylation in prostate cancer*. cancer control, 2010. **17**(4): p. 21.
63. Perry, A.S., et al., *The emerging roles of DNA methylation in the clinical management of prostate cancer*. Endocr Relat Cancer, 2006. **13**(2): p. 357-77.
64. Mavis, C.K., et al., *Expression level and DNA methylation status of glutathione-S-transferase genes in normal murine prostate and TRAMP tumors*. Prostate, 2009. **69**(12): p. 1312-24.

65. Yoon, H.Y., et al., *Combined hypermethylation of APC and GSTP1 as a molecular marker for prostate cancer: quantitative pyrosequencing analysis*. J Biomol Screen, 2012. **17**(7): p. 987-92.
66. Rabiau, N., *Methylation analysis of BRCA1, RASSF1, GSTP1 and EPHB2 promoters in prostate biopsies according to different degrees of malignancy*. in vivo, 2009. **23**: p. 5.
67. Van Neste, L., et al., *A tissue biopsy-based epigenetic multiplex PCR assay for prostate cancer detection*. BMC Urol, 2012. **12**: p. 16.
68. Strand, S.H., T.F. Orntoft, and K.D. Sorensen, *Prognostic DNA methylation markers for prostate cancer*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(9): p. 16544-76.
69. Jeronimo, C., *A quantitative promoter methylation profile of prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2004. **10**: p. 8.
70. Okegawa, T., K. Nutahara, and E. Higashihara, *Association of circulating tumor cells with tumor-related methylated DNA in patients with hormone-refractory prostate cancer*. Int J Urol, 2010. **17**(5): p. 466-75.
71. Bastian, P.J., *GSTP1 hypermethylation as a molecular marker in the diagnosis of prostatic cancer is there a correlation with clinical stage*. European Journal Of Medical Research, 2004. **9**: p. 5.
72. Bassi, P., *Preoperative serum DNA GSTP1 CpG island hypermethylation and the risk of early prostate-specific antigen recurrence following*. Imaging, Diagnosis, Prognosis, 2005. **11**(11): p. 8.
73. Hashad, D.I., et al., *Role of glutathione-S-transferase P1 hypermethylation in molecular detection of prostate cancer*. Genet Test Mol Biomarkers, 2011. **15**(10): p. 667-70.
74. Enokida, H., et al., *Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(18): p. 6582-8.
75. Serenaitė, I., et al., *Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer*. Virchows Arch, 2015. **466**(1): p. 53-9.
76. Tokumaru, Y., *Optimal use of a panel of methylation markers with GSTP1 hypermethylation in the diagnosis of prostate adenocarcinoma*. Clinical Cancer Research, 2004. **10**: p. 6.
77. Alumkal, J.J., et al., *Effect of DNA methylation on identification of aggressive prostate cancer*. Urology, 2008. **72**(6): p. 1234-9.
78. Henrique, R., et al., *Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis*. Mol Cancer Res, 2006. **4**(1): p. 1-8.
79. Woodson, K., J. Hanson, and J. Tangrea, *A survey of gene-specific methylation in human prostate cancer among black and white men*. Cancer Lett, 2004. **205**(2): p. 181-8.
80. Meiers, I., J.H. Shanks, and D.G. Bostwick, *Glutathione S-transferase pi (GSTP1) hypermethylation in prostate cancer: review 2007*. Pathology, 2007. **39**(3): p. 299-304.
81. Yegnasubramanian, S., *Hypermethylation of CpG islands in primary and metastatic human prostate cancer*. Cancer Research, 2004. **64**: p. 13.
82. Bastian, P.J., et al., *Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation*. Eur Urol, 2004. **46**(6): p. 698-708.
83. Richiardi, L., et al., *Methylation of APC and GSTP1 in non-neoplastic tissue adjacent to prostate tumour and mortality from prostate cancer*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e68162.
84. Woodson, K., et al., *Heterogeneous gene methylation patterns among pre-invasive and cancerous lesions of the prostate: a histopathologic study of whole mount prostate specimens*. Prostate, 2004. **60**(1): p. 25-31.

85. Ellinger, J., et al., *CpG island hypermethylation at multiple gene sites in diagnosis and prognosis of prostate cancer*. *Urology*, 2008. **71**(1): p. 161-7.
86. Chen, R., et al., *Impact of glutathione-S-transferases (GST) polymorphisms and hypermethylation of relevant genes on risk of prostate cancer biochemical recurrence: a meta-analysis*. *PLoS One*, 2013. **8**(9): p. e74775.
87. Roupret, M., et al., *Molecular detection of localized prostate cancer using quantitative methylation-specific PCR on urinary cells obtained following prostate massage*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(6): p. 1720-5.
88. Rogers, C.G., et al., *High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection*. *J Urol*, 2006. **176**(5): p. 2280-4.
89. Reibenwein, J., et al., *Promoter hypermethylation of GSTP1, AR, and 14-3-3sigma in serum of prostate cancer patients and its clinical relevance*. *Prostate*, 2007. **67**(4): p. 427-32.
90. Payne, S.R., et al., *DNA methylation biomarkers of prostate cancer: confirmation of candidates and evidence urine is the most sensitive body fluid for non-invasive detection*. *Prostate*, 2009. **69**(12): p. 1257-69.
91. Hoque, M.O., et al., *Quantitative methylation-specific polymerase chain reaction gene patterns in urine sediment distinguish prostate cancer patients from control subjects*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(27): p. 6569-75.
92. Ellinger, J., et al., *CpG island hypermethylation in cell-free serum DNA identifies patients with localized prostate cancer*. *Prostate*, 2008. **68**(1): p. 42-9.
93. Vener, T., et al., *Development of a multiplexed urine assay for prostate cancer diagnosis*. *Clin Chem*, 2008. **54**(5): p. 874-82.
94. Woodson, K., et al., *The usefulness of the detection of GSTP1 methylation in urine as a biomarker in the diagnosis of prostate cancer*. *J Urol*, 2008. **179**(2): p. 508-11; discussion 511-2.
95. Eilers, T., et al., *Prospective diagnostic efficiency of biopsy washing DNA GSTP1 island hypermethylation for detection of adenocarcinoma of the prostate*. *Prostate*, 2007. **67**(7): p. 757-63.
96. Maldonado, L., et al., *GSTP1 promoter methylation is associated with recurrence in early stage prostate cancer*. *J Urol*, 2014. **192**(5): p. 1542-8.
97. Mahon, K.L., et al., *Methylated Glutathione S-transferase 1 (mGSTP1) is a potential plasma free DNA epigenetic marker of prognosis and response to chemotherapy in castrate-resistant prostate cancer*. *Br J Cancer*, 2014. **111**(9): p. 1802-9.
98. Vasiljevic, N., et al., *Association between DNA methylation of HSPB1 and death in low Gleason score prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2013. **16**(1): p. 35-40.
99. Ummanni, R., et al., *Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 1 (UCHL1) is a potential tumour suppressor in prostate cancer and is frequently silenced by promoter methylation*. *Mol Cancer*, 2011. **10**: p. 129.
100. Khor, T.O., et al., *Epigenetic DNA methylation of antioxidative stress regulator NRF2 in human prostate cancer*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2014. **7**(12): p. 1186-97.
101. Trock, B.J., et al., *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*, 2012. **110**(1): p. 56-62.
102. Chuang, C.K., et al., *Hypermethylation of the CpG islands in the promoter region flanking GSTP1 gene is a potential plasma DNA biomarker for detecting prostate carcinoma*. *Cancer Detect Prev*, 2007. **31**(1): p. 59-63.
103. Roupret, M., et al., *Promoter hypermethylation in circulating blood cells identifies prostate cancer progression*. *Int J Cancer*, 2008. **122**(4): p. 952-6.

104. Ge, Y.Z., et al., *The association between RASSF1A promoter methylation and prostate cancer: evidence from 19 published studies*. *Tumour Biol*, 2014. **35**(4): p. 3881-90.
105. Kawamoto, K., et al., *Epigenetic modifications of RASSF1A gene through chromatin remodeling in prostate cancer*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(9): p. 2541-8.
106. Pan, J., et al., *Association of DSC3 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92815.
107. Aitchison, A., et al., *RASSF1A promoter methylation is frequently detected in both pre-malignant and non-malignant microdissected prostatic epithelial tissues*. *Prostate*, 2007. **67**(6): p. 638-44.
108. Litovkin, K., et al., *Methylation of PITX2, HOXD3, RASSF1 and TDRD1 predicts biochemical recurrence in high-risk prostate cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2014. **140**(11): p. 1849-61.
109. Dansranjavin, T., et al., *Epigenetic down regulation of RASSF10 and its possible clinical implication in prostate carcinoma*. *Prostate*, 2012. **72**(14): p. 1550-1558.
110. Daniunaite, K., et al., *Prognostic value of RASSF1 promoter methylation in prostate cancer*. *J Urol*, 2014. **192**(6): p. 1849-55.
111. Schatz, P., et al., *Development of a diagnostic microarray assay to assess the risk of recurrence of prostate cancer based on PITX2 DNA methylation*. *J Mol Diagn*, 2010. **12**(3): p. 345-53.
112. Weiss, G., et al., *DNA methylation of the PITX2 gene promoter region is a strong independent prognostic marker of biochemical recurrence in patients with prostate cancer after radical prostatectomy*. *J Urol*, 2009. **181**(4): p. 1678-85.
113. Vinarskaja, A., et al., *Association of PITX2 mRNA down-regulation in prostate cancer with promoter hypermethylation and poor prognosis*. *Urol Oncol*, 2013. **31**(5): p. 622-7.
114. Dietrich, D., et al., *Development and clinical validation of a real-time PCR assay for PITX2 DNA methylation to predict prostate-specific antigen recurrence in prostate cancer patients following radical prostatectomy*. *J Mol Diagn*, 2013. **15**(2): p. 270-9.
115. Banez, L.L., et al., *Multicenter clinical validation of PITX2 methylation as a prostate specific antigen recurrence predictor in patients with post-radical prostatectomy prostate cancer*. *J Urol*, 2010. **184**(1): p. 149-56.
116. Vasiljevic, N., et al., *DNA methylation of PITX2 predicts poor survival in men with prostate cancer*. *Biomark Med*, 2014. **8**(9): p. 1143-50.
117. Sai, P., *CpG island promoter methylation and silencing of 14-3-3sigma gene expression in LNCaP and Tramp-C1 prostate cancer cell lines*. *Oncogene*, 2006. **25**(33): p. 25.
118. Lodygin, D., J. Diebold, and H. Hermeking, *Prostate cancer is characterized by epigenetic silencing of 14-3-3sigma expression*. *Oncogene*, 2004. **23**(56): p. 9034-41.
119. Urano, T., et al., *14-3-3sigma is down-regulated in human prostate cancer*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **319**(3): p. 795-800.
120. Mhawech, P., et al., *Downregulation of 14-3-3sigma in ovary, prostate and endometrial carcinomas is associated with CpG island methylation*. *Mod Pathol*, 2005. **18**(3): p. 340-8.
121. Liang, C., *Loss of 14-3-3sigma in prostate cancer and its precursors*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**: p. 6.

122. Sai, P., *Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors*. *Oncogene*, 2007. **26**(36): p. 16.
123. Henrique, R., et al., *Hypermethylation of Cyclin D2 is associated with loss of mRNA expression and tumor development in prostate cancer*. *J Mol Med (Berl)*, 2006. **84**(11): p. 911-8.
124. Verdoodt, B., et al., *Inverse association of p16 INK4a and p14 ARF methylation of the CDKN2a locus in different Gleason scores of prostate cancer*. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2011. **14**(4): p. 295-301.
125. Hasegawa, Y., et al., *DNA methylation of the RIZ1 gene is associated with nuclear accumulation of p53 in prostate cancer*. *Cancer Sci*, 2007. **98**(1): p. 32-6.
126. Suzuki, M., et al., *Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer*. *Cancer Lett*, 2006. **242**(2): p. 222-30.
127. Woodson, K., et al., *CD44 and PTGS2 Methylation are Independent Prognostic Markers for Biochemical Recurrence Among Prostate Cancer Patients with Clinically Localized Disease*. *Epigenetics*, 2014. **1**(4): p. 183-186.
128. Zheng, J., et al., *HIC1 modulates prostate cancer progression by epigenetic modification*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(6): p. 1400-10.
129. Serenaite, I., et al., *Heterogeneity of DNA methylation in multifocal prostate cancer*. *Virchows Arch*, 2014. **466**(1): p. 53-9.
130. Das, P.M., et al., *Methylation mediated silencing of TMS1/ASC gene in prostate cancer*. *Mol Cancer*, 2006. **5**: p. 28.
131. Murphy, T.M., A.S. Perry, and M. Lawler, *The emergence of DNA methylation as a key modulator of aberrant cell death in prostate cancer*. *Endocrine Related Cancer*, 2008. **15**(1): p. 11-25.
132. Collard, R.L., et al., *Methylation of the ASC gene promoter is associated with aggressive prostate cancer*. *Prostate*, 2006. **66**(7): p. 687-695.
133. Higuchi, T., et al., *HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer*. *Prostate*, 2008. **68**(1): p. 105-13.
134. Sorensen, K.D., et al., *Genetic and epigenetic SLC18A2 silencing in prostate cancer is an independent adverse predictor of biochemical recurrence after radical prostatectomy*. *Clin Cancer Res*, 2009. **15**(4): p. 1400-10.
135. Cheng, Y., et al., *Genetic and epigenetic inactivation of TNFRSF10C in human prostate cancer*. *Prostate*, 2009. **69**(3): p. 327-35.
136. Mishra, D.K., et al., *Global methylation pattern of genes in androgen-sensitive and androgen-independent prostate cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(1): p. 33-45.
137. Stott-Miller, M., et al., *Validation study of genes with hypermethylated promoter regions associated with prostate cancer recurrence*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2014. **23**(7): p. 1331-9.
138. Koch, P., et al., *PTPIP51 mRNA and protein expression in tissue microarrays and promoter methylation of benign prostate hyperplasia and prostate carcinoma*. *Prostate*, 2009. **69**(16): p. 1751-62.
139. Chen, Y., *APC gene hypermethylation and prostate cancer a systematic review and meta-analysis*. *European Journal of Human Genetics*, 2013. **21**: p. 7.
140. Richiardi, L., et al., *Promoter methylation in APC, RUNX3, and GSTP1 and mortality in prostate cancer patients*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(19): p. 3161-8.
141. Henrique, R., et al., *High promoter methylation levels of APC predict poor prognosis in sextant biopsies from prostate cancer patients*. *Clin Cancer Res*, 2007. **13**(20): p. 6122-9.
142. Chen, L.N., et al., *Correlation of HOXD3 promoter hypermethylation with clinical and pathologic features in screening prostate biopsies*. *Prostate*, 2014. **74**(7): p. 714-721.

143. Kron, K., et al., *Discovery of novel hypermethylated genes in prostate cancer using genomic CpG island microarrays*. PLoS One, 2009. **4**(3): p. e4830.
144. Kim, Y.J., et al., *EFEMP1 as a novel DNA methylation marker for prostate cancer: array-based DNA methylation and expression profiling*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(13): p. 4523-30.
145. Almeida, M., et al., *Epigenetic regulation of EFEMP1 in prostate cancer: biological relevance and clinical potential*. J Cell Mol Med, 2014. **18**(11): p. 2287-97.
146. Yang, M. and J.Y. Park, *DNA methylation in promoter region as biomarkers in prostate cancer*. Methods Mol Biol, 2012. **863**: p. 67-109.
147. Shinjima, T., et al., *Heterogeneous epigenetic regulation of TIMP3 in prostate cancer*. Epigenetics, 2012. **7**(11): p. 1279-89.
148. Li, Z., et al., *Epigenetic inactivation of PCDH10 in human prostate cancer cell lines*. Cell Biol Int, 2011. **35**(7): p. 671-6.
149. Lin, Y.L., et al., *Aberrant methylation of protocadherin 17 and its clinical significance in patients with prostate cancer after radical prostatectomy*. Med Sci Monit, 2014. **20**: p. 1376-82.
150. Niu, W.B., et al., *Promoter methylation of protocadherin8 is an independent prognostic factor for biochemical recurrence of early-stage prostate cancer*. Med Sci Monit, 2014. **20**: p. 2584-9.
151. Guan, M., et al., *Aberrant methylation of EphA7 in human prostate cancer and its relation to clinicopathologic features*. Int J Cancer, 2009. **124**(1): p. 88-94.
152. Sorensen, K.D., et al., *Chromosomal deletion, promoter hypermethylation and downregulation of FYN in prostate cancer*. Int J Cancer, 2008. **122**(3): p. 509-19.
153. Liu, J.W., et al., *Hypermethylation of MCAM gene is associated with advanced tumor stage in prostate cancer*. Prostate, 2008. **68**(4): p. 418-26.
154. Kwabi-Addo, B., et al., *Identification of differentially methylated genes in normal prostate tissues from African American and Caucasian men*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(14): p. 3539-47.
155. Wang, J., et al., *Sprouty4, a suppressor of tumor cell motility, is down regulated by DNA methylation in human prostate cancer*. Prostate, 2006. **66**(6): p. 613-24.
156. McKie, A.B., et al., *Epigenetic inactivation of the human sprouty2 (hSPRY2) homologue in prostate cancer*. Oncogene, 2005. **24**(13): p. 2166-74.
157. Vanaja, D.K., et al., *Hypermethylation of genes for diagnosis and risk stratification of prostate cancer*. Cancer Invest, 2009. **27**(5): p. 549-60.
158. Liu, W., et al., *Quantitative assessment of AKAP12 promoter methylation in human prostate cancer using methylation-sensitive high-resolution melting: correlation with Gleason score*. Urology, 2011. **77**(4): p. 1006 e1-7.
159. Olkhov-Mitsel, E., et al., *Quantitative DNA methylation analysis of genes coding for kallikrein-related peptidases 6 and 10 as biomarkers for prostate cancer*. Epigenetics, 2012. **7**(9): p. 1037-45.
160. Kron, K.J., et al., *DNA methylation of HOXD3 as a marker of prostate cancer progression*. Lab Invest, 2010. **90**(7): p. 1060-7.
161. Vanaja, D.K., et al., *PDLIM4 repression by hypermethylation as a potential biomarker for prostate cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(4): p. 1128-36.
162. Borno, S.T., et al., *Genome-wide DNA methylation events in TMPRSS2-ERG fusion-negative prostate cancers implicate an EZH2-dependent mechanism with miR-26a hypermethylation*. Cancer Discov, 2012. **2**(11): p. 1024-35.
163. Moison, C., et al., *Synergistic chromatin repression of the tumor suppressor gene RARB in human prostate cancers*. Epigenetics, 2014. **9**(4): p. 477-82.

164. Sharad, S., et al., *Methylation of the PMEPA1 gene, a negative regulator of the androgen receptor in prostate cancer*. Epigenetics, 2014. **9**(6): p. 918-27.
165. Ekonida, H., *CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer*. Cancer Research, 2004. **64**(1): p. 8.
166. Cottrell, S., et al., *Discovery and validation of 3 novel DNA methylation markers of prostate cancer prognosis*. J Urol, 2007. **177**(5): p. 1753-8.
167. Kim, J.W., et al., *Genetic and epigenetic inactivation of LPL gene in human prostate cancer*. Int J Cancer, 2009. **124**(3): p. 734-8.
168. Pierconti, F., et al., *Epigenetic silencing of SOCS3 identifies a subset of prostate cancer with an aggressive behavior*. Prostate, 2011. **71**(3): p. 318-25.
169. Zhang, J., L. Liu, and G.P. Pfeifer, *Methylation of the retinoid response gene TIG1 in prostate cancer correlates with methylation of the retinoic acid receptor beta gene*. Oncogene, 2004. **23**(12): p. 2241-9.
170. Bastian, P.J., et al., *CpG island hypermethylation profile in the serum of men with clinically localized and hormone refractory metastatic prostate cancer*. J Urol, 2008. **179**(2): p. 529-34; discussion 534-5.
171. Rui, H., *MT1G hypermethylation is associated with higher tumor stage in prostate cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2005. **14**(5): p. 6.
172. Jeronimo, C., *Quantitative RARbeta2 hypermethylation a promising prostate cancer marker*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(6): p. 4010.
173. Hideki, E., *CpG hypermethylation of MDR1 gene contributes to the pathogenesis and progression of human prostate cancer*. Cancer Res, 2004. **68**: p. 8.
174. Leiblich, A., et al., *Lactate dehydrogenase-B is silenced by promoter hypermethylation in human prostate cancer*. Oncogene, 2006. **25**(20): p. 2953-60.
175. Rui, H., *Epigenetic regulation of MDR1 gene through post-translational histone modifications in prostate cancer*. BMC Genomics, 2013. **14**: p. 12.
176. Kang, G.H., et al., *Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia*. J Pathol, 2004. **202**(2): p. 233-40.

