



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD

“Determinación de polimorfismos de los Citocromos CYP1B1 y CYP2W1 asociados a cáncer de próstata en población mexicana”.

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS DE LA SALUD
PRESENTA:**

LUIS ALEJANDRO ORTEGA ARAGON.

DIRECTORES DE TESIS

Dr. en C. Norma E. Herrera González

Dr. en C. Esaú Floriano Sánchez



MÉXICO, D. F. NOVIEMBRE DE 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 4 del mes de Noviembre del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M para examinar la tesis titulada:

“Determinación de los polimorfismo de los Citocromos CYP1B1, y CYP2W1 asociados a cáncer de próstata en población mexicana”

Presentada por el alumno:

Ortega Aragón Luis Alejandro
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

B	0	9	1	7	7	6
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA SALUD

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

**Dra. Norma Estela Herrera
González**

Dr. Esau Floriano Sánchez

Dr. Angel Miliar García

M. en C. Evangelina Muñoz Soria

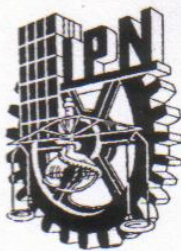
**M. en C. Pineda Ramón Álvarez
Grave**

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Eleazar Lara Padilla



**ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
I.P.N.
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION
CONTROL ESCOLAR**



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día 4 del mes noviembre del año 2011, el que suscribe Ortega Aragón Luis Alejandro alumno del Programa de Maestría en Ciencias de la Salud con número de registro B091776 adscrito a La Escuela Superior De Medicina, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Norma Estela Herrera González, Dr. Esaú Floriano Sánchez y cede los derechos del trabajo intitulado “Determinación de los polimorfismo de los Citocromos CYP1B1, y CYP2W1 asociados a cáncer de próstata en población mexicana”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección alejandro2662_6@hotmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Luis Alejandro Ortega Aragón

Nombre y firma

TITULO DE LA INVESTIGACIÓN:

DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE LOS CITOCROMOS
CYP1B1 Y CYP2W1 ASOCIADOS A CÁNCER DE PRÓSTATA EN
POBLACION MEXICANA

ALUMNO

LUIS ALEJANDRO ORTEGA ARAGON.

DIRECTORES DE TESIS

Dr. en C. Norma E. Herrera González

Dr. en C. Esaú Floriano Sánchez

SINODALES

Dr. en C. Ángel Milliar García

M. en C. Píndaro R. Álvarez Grave

M. en C. Evangelina Muñoz Soria

INDICE.

1. Resumen.....	8
2. Abstract.....	9
3. Glosario.....	10
4. Introducción.....	11
4.1 Cáncer de próstata.....	11
4.1.1. Definición.....	12
4.1.2. Epidemiología.....	12
4.1.3. Factores de riesgo.....	14
4.1.4. Estadificación.....	17
4.1.5. Marcadores tumorales.....	1.8
4.2. Prostata.....	21
4.2.1.1. Anatomía.....	21
4.2.1.2. Histología.....	24
4.3. Citocromo P-450.....	26
4.3.1.1. Características.....	26
4.3.1.2. Función celular del citocromo P-450.....	28
4.3.1.3. Polimorfismo genético.....	29
4.3.1.4. Polimorfismos de citocromo P-450 y su relación con el Cáncer de próstata.....	31
4.3.1.5. CYP1B1.....	31
4.3.1.6. CYP2W1.....	34
4.4. Genotipificación por análisis de fusión de alta resolución.....	36
5. Planteamiento del problema.....	38
6. Justificación.....	40
7. Hipótesis.....	43

8. Objetivos.....	43.
8.1.1. General.....	43
8.1.2. Específicos.....	43
9. Criterios de inclusión.....	44
10. Criterios de no inclusión.....	44
11. Criterios de eliminación.....	44
12. Materiales y métodos.....	45
12.1.1. Obtención de las muestras.....	45
12.1.2. Desparafinado.....	46
12.1.3. Extracción de DNA.....	47
12.1.4. Verificación de la integridad del material genético.....	48
12.1.5. Reacción en cadena de la polimerasa.....	48
12.1.6. Detección de los polimorfismos.....	49
13. Resultados.....	50
13.1.1. Datos de los pacientes.....	51
13.1.2. Integridad del DNA.....	52
13.1.3. Ampliación de los productos de PCR en tiempo real.....	53
13.1.4. SNP 1103 G>C del gen CYP1B1.....	54
13.1.5. SNP 7021 G>A del gen CYP2W1.....	55
13.1.6. Incidencia de los polimorfismos G/C (1103) del CYP1B1 y G/A (7021) del CYP2W1.....	56
13.1.7. Asociación de los polimorfismos G/C (1103) del CYP1B1 y G/A (7021) del CYP2W1 con el cáncer de próstata.....	57
Discusión.....	58
14. Conclusiones.....	63
15. Bibliografía.....	64

GLOSARIO

AHR	receptor aril de los hidrocarburos.
APE	antígeno prostático específico.
CaP	cáncer de próstata.
CYP	citocromo.
DRE	elementos de respuesta a las dioxinas.
HRM	melting de alta resolución.
IgA	inmunoglobulina tipo A.
Kb	kilo bases.
KLK2	calicreina humana.
M	metástasis.
N	nódulo linfático.
PCR	reacción en cadena de la polimerasa.
PIN	neoplasia intraepitelial no invasiva.
PSA	antígeno prostático específico.
RE	retículo endoplásmico.
RT-PCR	reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real.
T	tumor.
TNM	tumor, nódulo, metástasis.
ZC	zona central de la próstata.
ZT	zona de transición de la próstata.
ZP	zona periférica de la próstata.

RESUMEN

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia más común después del cáncer de piel en los varones y la segunda causa de muerte después del cáncer de pulmón. Así mismo el cáncer de próstata es uno de los principales problemas de salud pública en todo el mundo pues se ha convertido en uno de los tumores más frecuentemente diagnosticados y es una de las principales causas de incapacidad y de muerte en pacientes mayores a los 50 años. Por otra parte, todavía no se conocen los factores etiológicos que participan en el inicio de esta enfermedad así como el porqué algunos tumores de los pacientes progresarán de forma latente a invasiva.

Hay diferentes factores de riesgo al inicio y progreso de la enfermedad tales como la edad, la etnia, hábitos alimenticios así como los polimorfismos genéticos de ciertas proteínas que intervienen en su actividad individual, entre ellas las del P450 pues se considera que algunos de sus citocromos pueden incrementar el riesgo a desarrollar el cáncer de próstata.

Por lo que el objetivo de la presente investigación es el determinar como se asocian los polimorfismos del citocromo P450 al desarrollo de esta patología en la población mexicana.

A través del uso de tejido embebido en parafina y muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados con CaP se realizó la extracción de DNA, y una vez revisada su integridad, la presencia/ausencia de los polimorfismos se llevo a cabo por la técnica de PCR en tiempo real mediante el Análisis de alta Resolución de Curvas Melting (HRM).

ABSTRACT

Prostate cancer is the second most common malignancy after cancer of skin in men and the second leading cause of cancer death after lung. Likewise, prostate cancer is a major public health problems worldwide as it has become one of the tumors most frequently diagnosed and is a major cause of disability and death in patients over 50 years . On the other hand, are not known etiologic factors involved in the onset of this disease and why some tumors of patients will progress to invasive latent form.

There are different risk factors to the initiation and progression of the disease such as age, ethnicity, dietary habits and genetic polymorphisms of certain proteins involved in individual activities, including the P450 and it is considered that some of the cytochromes may increase the risk of developing prostate cancer. So the objective of this research is to determine how the polymorphisms associated cytochrome P450 to the development of this disease in the Mexican population.

Through the use of paraffin-embedded tissue and peripheral blood samples of patients diagnosed with CaP was performed DNA extraction, and a revised its integrity, the presence / absence of polymorphisms was carried out by PCR technique Real-time High Resolution Analysis of Melting Curves (HRM)

INTRODUCCION

A. CÁNCER DE PRÓSTATA

A.1. Definición.

Bajo el nombre genérico de cáncer se engloba al conjunto de enfermedades que tienen en común un crecimiento celular desordenado (tumor) y una colonización tisular (metástasis), todo ello determinado por una mutación inicial seguida de la acumulación de otras mutaciones sucesivas, esta enfermedad se manifiesta con alteraciones bioquímicas de todo tipo a nivel celular, tisular y particularmente por la aparición de marcadores tisulares y tumorales **(1)**.

Las lesiones epiteliales no invasivas en las glándulas prostáticas se han descrito como parte de las transformaciones citológicas y estructurales que provocan el desarrollo del adenocarcinoma prostático. (CaP), las neoplasias intraepiteliales prostáticas (PIN) se clasifican dentro de las neoplasias epiteliales no invasivas, se originan en el tejido epitelial cilíndrico simple de las glándulas prostáticas considerándose como las principales precursoras de CaP ya que muestran características genéticas y morfológicas de éste, aunque carecen de invasividad. Las alteraciones que se llevan a cabo durante el proceso carcinogénico en la próstata incluyen la pérdida de la formación glandular con el desarrollo de la morfología anaplásica, pleomorfismo nuclear, invasión de la membrana basal, incremento en la motilidad celular, pérdida de la inhibición por contacto y la proangiogénesis **(2)**.

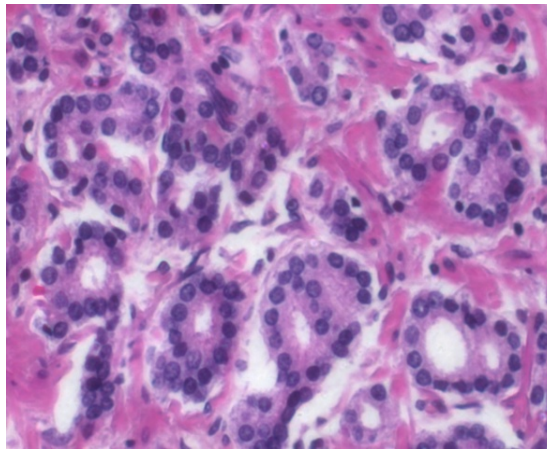


Figura 4. Cáncer de la próstata

A.2. Epidemiología.

Después del cáncer de pulmón, el adenocarcinoma prostático (CaP) es la segunda causa de muerte en la población masculina a nivel mundial. Un total de 30,350 hombres murieron de cáncer de próstata en 2005, y en hombres de más de 55 años de edad este padecimiento es responsable del 4% del total de las muertes **(3)**. La edad incrementa el riesgo de padecer cáncer de próstata en aproximadamente el 14% después de los sesenta años. No obstante la mortalidad de este cáncer es relativamente baja cuando se compara con el número total de pacientes diagnosticados cada año. En los Estados Unidos de Norteamérica, se diagnosticaron 218,890 nuevos casos en 2007 y 27,050 defunciones siendo esta cifra tres veces mayor que el número de casos diagnosticados con cáncer en el tracto respiratorio **(4)**. El número de hombres diagnosticados cada año con este tipo de cáncer se ha incrementado en un 30% en los pasados 25 años y en la siguiente década se espera un incremento igual. Se considera que la incidencia del cáncer de próstata para el año 2030 sea del doble, esto debido a la fuerte asociación del cáncer con la edad del paciente, el mejoramiento de las técnicas de detección y a los programas para la detección temprana.

Jemal y Murray observaron que el número de hombres diagnosticados con CaP no es similar en las diferentes poblaciones raciales, ya que esta enfermedad presenta una mayor incidencia en Afro-Americanos, intermedia en los caucásicos y baja en las poblaciones asiáticas **(5)** .

Por otra parte, las autopsias y las muestras de biopsias revelan una alta prevalencia del CaP en lesiones que no han sido diagnosticadas clínicamente, por lo que se considera que entre el 15%-30% en hombres de más de 50 años de edad así como el 80% de pacientes con edad mayor a los 80 años tienen una lesión de CaP que no ha sido detectado **(6)**.

En México, al igual que en el plano internacional, con la información disponible en el periodo comprendido entre los años 2004 al 2007, existe un incremento en los casos de cáncer. Durante 2004 se registraron de un total de 135 mil 708 egresos hospitalarios, 43.7% ocurrieron en varones; durante 2005, hay un incremento de 1 429 casos (137 mil 137 en total); presentándose un aumento de 8 mil 008 egresos hospitalarios más por tumores malignos al reportarse 145 mil 145 casos, y en 2007 se registra otro crecimiento en los egresos hospitalarios de 4 mil 375 casos. **(7)**. En estudios realizados en México sobre autopsias se ha encontrado que el 10.6% en los varones de 50 en a 59 años, el 43.6% entre los 80 y 89 años y el 83% de los varones de 90 a 99 años tienen cáncer de próstata **(8)**.

Entre las entidades federativas hay amplias diferencias, destaca Nayarit, con una tasa de 33 defunciones por cada 100 mil hombres de 25 años y mas, le siguen Jalisco (28.2), Michoacán (27.4) y Zacatecas (26.9). Quintana Roo muestra la menor tasa (9.4) y su diferencia con Nayarit es casi de 24 defunciones por cada cien mil varones de 25 años y más **(9)**.

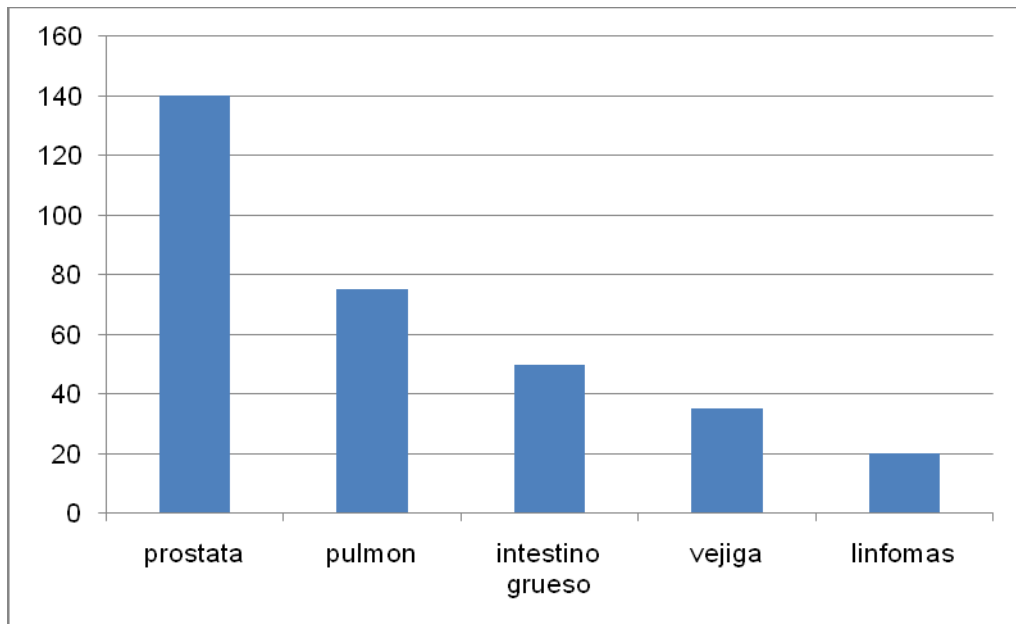


Figura 4. Incidencia del cáncer de próstata en la población mexicana (INEGI 2007)

A.3. Factores de riesgo.

Se desconocen las causas específicas que determinan el inicio y la progresión del cáncer de próstata; sin embargo se atribuyen factores genéticos y ambientales en la evolución de esta enfermedad. Se ha observado que los individuos con un familiar de primer grado con CaP tienen un riesgo duplicado de desarrollar la neoplasia, mientras que, en los casos con 2 o 3 familiares de primer grado afectados el riesgo aumenta 5 a 11 veces **(10)**.

Con respecto a la edad, hay una correlación entre la edad del individuo y el riesgo de padecer el cáncer de próstata ya que después de los 50 años de edad la incidencia de este padecimiento aumenta 3 ó 4 veces cada 10 años, más del 90 por ciento de los casos se diagnostican en hombres de más de 55 años de edad **(10)**.

El comienzo y la progresión de CaP está influido por los andrógenos pues la reducción de sus niveles mediante castración o terapia estrogénica tienen un efecto paliativo en esta enfermedad **(10)**.

Los hombres cuyo padre o hermano tienen cáncer de próstata tienen más riesgo de desarrollar la enfermedad. Esto es así porque el cáncer de próstata está relacionado con cambios o mutaciones de la estructura genética (ADN). Cuanto más joven y cercano el familiar diagnosticado, mayor el riesgo. La historia familiar aumenta el riesgo de tener ciertas enfermedades como el cáncer de vejiga, riñón y piel **(11)**.

La ingesta de grasas animales es un fuerte predisponente al cáncer de próstata pues se ha observado que los hombres que comen al menos 5 porciones de comidas que contienen grasa animal al día tienen más riesgo de tener cáncer de próstata. Una de las razones puede ser que la grasa animal afecta los niveles hormonales, que aumentan el riesgo de cáncer de próstata, por lo que la ingesta de comidas que contienen grasa animal como la carne de res, de cordero, leche entera y carne de cerdo se consideran factores para el desarrollo del CaP. El consumo de grasas, especialmente grasas poliinsaturadas, muestra una alta correlación con la incidencia y mortalidad de cáncer de próstata, ya que la grasa induce alteraciones en los perfiles hormonales, el efecto de los metabolitos intermedios de la grasa actúa sobre las proteínas así como con el ADN, induciendo la elevación del estrés oxidativo. Los retinoides, incluyendo la vitamina A, ayudan a regular la diferenciación y la proliferación de células epiteliales, con una asociación positiva hacia el riesgo de cáncer de próstata. **(11)**

Con respecto al consumo de alcohol y el riesgo de cáncer de próstata, un estudio, que incluyó a más de 10, 000 hombres, encontró que los que bebían mucho, o sea 50 gramos (1.7 onzas) de alcohol puro por día, la cantidad que se encuentra en cuatro copas de licor fuerte, cinco o más días de la semana, tenían más del doble de probabilidades de desarrollar este tipo de cancer. No

hubo diferencia en el riesgo de cáncer de próstata entre abstemios y los que bebían de forma moderada. La mayoría de cánceres de próstata son de bajo grado, crecen con gran lentitud, y cien por ciento de los hombres que los padecen tienen aproximadamente diez años de sobrevida. La mayoría de los hombres muere de otra cosa. Con el cáncer de próstata de alto grado, la sobrevida a los diez años es de apenas 60 a 70 % **(12)**.

El tabaquismo aumenta el riesgo de padecer el Cáncer de Próstata, sobre todo en hombres de la mediana edad **(13)**. Existen mecanismos hipotéticos que pueden explicar la asociación entre el tabaquismo y el cáncer de próstata, tales como los cambios en los niveles hormonales en la circulación y la exposición directa a los agentes carcinógenos del cigarrillo. Un estudio basado en la comparación de 753 casos de hombres entre 40 y 64 años diagnosticados con cáncer de próstata, con 703 hombres de edad similar en la misma región y sin cáncer de próstata, seleccionados al azar encuentra que el tabaquismo es realmente un factor de riesgo muy importante para desarrollar cáncer de próstata **(13)**. En particular, los fumadores activos parecen tener un riesgo más alto de desarrollar esta enfermedad relativamente en comparación a los no-fumadores. También existe una relación entre la dosis de exposición, con un aumento bastante significativo del riesgo a medida que se incrementa el número de años fumando. El riesgo de cáncer de próstata fue mucho más pronunciado en aquellos hombres con más de 40 años fumando quienes tuvieron 1.6 veces más probabilidad de presentar cáncer y un riesgo aun mayor de desarrollar formas más agresivas de la enfermedad. Muy importante, si una persona deja de fumar, hay una reducción significativa del riesgo para contraer cáncer de próstata, después de 20 años de haber dejado de fumar el

riesgo es casi el mismo que el de aquellas personas que nunca han fumado **(13)**.

A.4. Estadificación.

Los carcinomas de la próstata, al igual que otras formas de cáncer, se clasifican en grados de malignidad y estadios de extensión. El estadio anatomopatológico tiene como objetivo primordial el establecer el pronóstico del padecimiento y elegir el tratamiento más adecuado sobre la base de la supuesta extensión de la enfermedad **(14)**.

Los sistemas de clasificación clínica TNM (tumor, nódulo, metástasis o extensión) y Whitmore-Jewett son los más utilizados en la estadificación de CaP. La clasificación TNM ha reemplazado al sistema ABCD para clasificar el cáncer de próstata y sigue después de la clasificación de Gleason. La T significa tumor primario y representa la extensión del cáncer dentro de la próstata y en los tejidos directamente vecinos. La N significa nódulos linfáticos y representa si el cáncer de próstata ha invadido nódulos linfáticos cercanos, mientras que la M significa metástasis e indica que el cáncer ha invadido tejidos lejanos como hueso y pulmones. Estas letras son seguidas por un número de 0 a 4 representando la extensión del tumor y ocasionalmente alguna letra minúscula que representa información adicional a la gravedad de este padecimiento **(15)**.

El sistema de Gleason es el método más utilizado para analizar el grado histológico de diferenciación. Se basa en los hallazgos histológicos calificando microscópicamente a las células desde bien diferenciadas (grado 1), hasta muy indiferenciadas (grado 5). Debido a que los carcinomas prostáticos presentan más de un patrón histológico este sistema también toma en cuenta la heterogeneidad en las diferentes áreas del tumor, estudiándose dos patrones

estructurales (primario y secundario) sumando un mínimo de 2 puntos y un máximo de 10 puntos considerando que los grados 1 y 2 son normales. Así, un Gleason 10 será en términos simples el más grave de todos, y un Gleason 2 totalmente normal. Para su clara evaluación se debe reportar como la suma de los dos factores, por ejemplo 7 (3+ 4), y cuanto mayor el número más grave **(16)**.

A.5. Marcadores tumorales.

La acumulación de distintos eventos genéticos y moleculares determina el fenotipo de un tumor dado. Existen rutas bioquímicas cuya alteración parece ser necesaria en el desarrollo de la mayoría de las neoplasias, ya que regulan procesos celulares básicos en todas las células. Por lo tanto, un compromiso en la integridad de estas rutas puede conducir al crecimiento incontrolado característico de toda neoplasia. La mayoría de neoplasias requieren, al menos, la alteración de tres rutas: control del ciclo celular, control de la muerte celular programada y activación de la ruta de mantenimiento de los telómeros **(17)**.

En los últimos años, el estudio de las alteraciones moleculares específicas asociadas al desarrollo tumoral se ha centrado en el análisis del patrón de expresión génica del tumor. Una mejor comprensión de los cambios moleculares, asociados con el inicio y progresión del cáncer de próstata provee una base racional para el desarrollo de nuevas herramientas en el diagnóstico y pronóstico, así como nuevos blancos para la terapia. El número de biomarcadores, ha crecido sustancialmente, así como la comprensión acerca del inicio y progresión del cáncer de próstata. Está claro que a través de la evaluación, y la comprobación clínica de especificidad de los marcadores

moleculares, se mejorará y permitirá hacer la diferenciación entre el cáncer de próstata, próstata normal y HPB en una fase más temprana **(18)**.

A pesar de las severas limitaciones del antígeno prostático específico (PSA) como marcador, la falta de especificidad y la dificultad en la identificación de un valor normal de corte, sus valores incrementados juegan todavía un papel importante en el diagnóstico de cáncer de próstata **(19)**.

El PSA es una glicoproteína perteneciente al grupo de las kalicreínas, producida básicamente por las células epiteliales situadas en los tejidos prostáticos y líquido seminal, codificadas por un grupo de genes en el cromosoma 19q. Aproximadamente entre un 70% y 90% del PSA se presenta de forma compleja (PSAc) ligado al α -1 antitripsina y una menor proporción al α 1 antitripsina. El PSA libre (PSAI) corresponde a un 10%, un 30% del PSA es una forma generalmente inactiva y esta a su vez puede presentar varias isoformas como se ha visto recientemente. El PSA libre en sangre periférica en gran parte está presente como forma inactiva. Recientemente nuevas isoformas derivadas de este PSA libre han sido descubiertas, las conocidas como bPSA originario de la porción benigna de la próstata (zona transicional) y el proPSA o más relacionado con la presencia de tumor o zona periférica. En cualquier caso la porción del PSA en sus diferentes formas puede interponerse o entremezclarse tanto en tejido benigno como tumoral si bien alguna de las formas compleja, libre y nuevas isoformas de la porción inactiva pudieran ser consideradas más específicas para detectar este padecimiento **(20)**.

La calicreína humana relacionada con peptidasa 2 (KLK2, previamente conocido como hK2) es una serina proteasa producida por la misma familia de genes como PSA. Datos obtenidos de tejidos con CaP han demostrado que la KLK2 aumenta durante la progresión de este

padecimiento y por lo tanto puede tener un uso como un biomarcador. Estudios en suero han demostrado mejoras en el diagnóstico de CaP cuando KLK2 se utiliza junto con el PSA total y fPSA, específicamente con respecto a la extensión extracapsular y el volumen del tumor **(21)**. La KLK2 proporcionó también una mejor información pronóstica independiente en comparación con el antígeno prostático en relación con el riesgo de recurrencia en hombres con PSA de 10 mg/dl. Los estudios de validación adicionales se requieren para dilucidar el potencial pronóstico completo de KLK2 **(22)**.

B. PRÓSTATA.

B.1. Anatomía.

La próstata es un órgano glandular fibromuscular que en condiciones normales pesa aproximadamente 18 g, mide 3 cm de longitud, 4 cm de ancho y 2 cm de profundidad. Está localizada en el suelo pélvico, debajo de la vejiga urinaria (figura 1). La próstata tiene superficies anterior, posterior y lateral con un vértice estrechado por debajo y una base ancha por arriba, está envuelta por una cápsula compuesta de colágeno, elastina y músculo liso. La superficie posterior se fusiona con la fascia de Denonvilliers y las superficies anterior y lateral se adhieren a la fascia endopélvica. El vértice de la próstata se continúa con el esfínter uretral estriado.

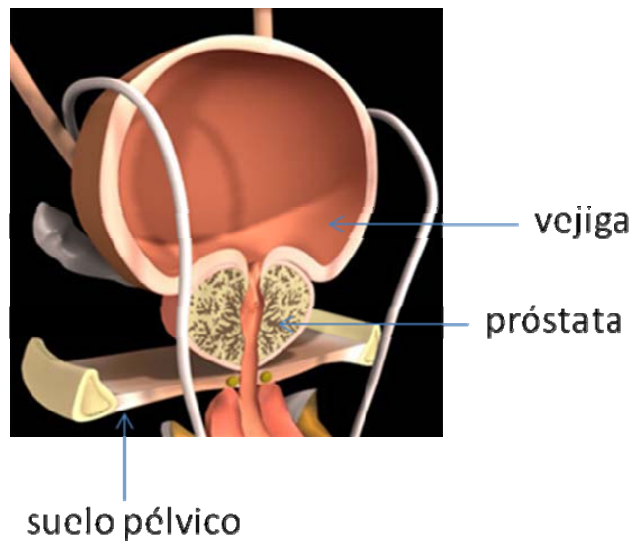


Figura 1. Ubicación anatómica de la próstata.

En la base, el tejido fibromuscular se fusiona a las fibras longitudinales del detrusor, pero sin formar una cápsula verdadera que separe la próstata de la vejiga. La uretra se encuentra más próxima a la superficie anterior y discurre a lo largo de la próstata. La cresta uretral se proyecta hacia adentro desde la línea media posterior, discurre en la longitud de la uretra prostática y desaparece en el esfínter estriado, a cada lado de la cresta se forma un surco (senos prostáticos) en el cual drenan todos los elementos glandulares. En su punto medio la uretra prostática gira hacia adelante y forma el ángulo uretral que divide la uretra prostática en dos segmentos: proximal (pre-prostática) y distal (prostática). En el segmento proximal el músculo liso circular forma el esfínter uretral interno. Más allá del ángulo uretral todos los elementos glandulares principales de la próstata se abren en la uretra prostática **(23)**.

Desde el punto de vista anatómico, la próstata puede diferenciarse en tres zonas: la zona periférica (ZP), central (ZC) y la de transición (ZT) **(23)**.

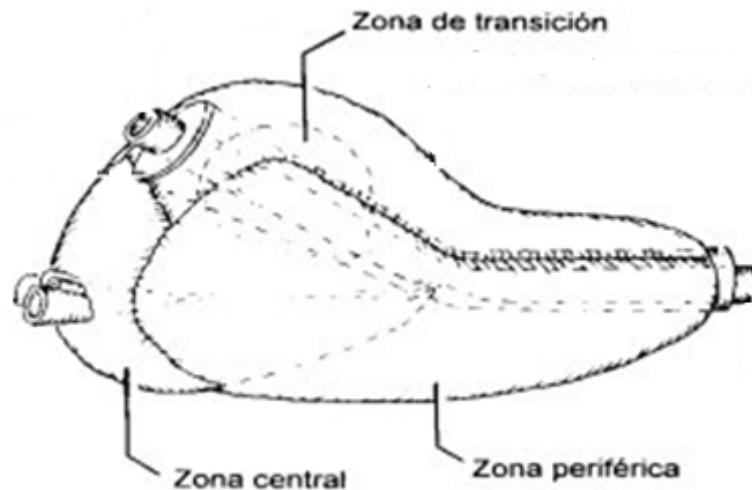


Figura 2. División de la próstata.

La ZP es la subdivisión anatómica de mayor tamaño. Compuesta por tejido secretor, contiene un 75% del tejido glandular. Corresponde a la región donde normalmente se desarrolla la neoplasia intraepitelial prostática y el carcinoma de próstata. La ZC, que representa aproximadamente el 25% de la masa glandular total de la próstata, se encuentra envolviendo a los conductos eyaculadores. Se diferencia de la ZP y de la ZT por sus características glandulares tanto morfológicas como histológicas. Presenta una longitud de sus conductos mayor que el resto de las áreas y el citoplasma de las células secretoras es mucho más granular y oscuro. Los núcleos son relativamente más largos y dispuestos a diferente altura en las distintas células que componen la glándula **(24)**.

La ZT, corresponde al 5% restante de la próstata, está formada por un pequeño conjunto de conductos que proceden de un mismo punto en la unión entre los segmentos proximal y distal de la uretra. Es la principal región donde se origina la hiperplasia prostática benigna **(24)**.

Desde el punto de vista clínico la próstata tiene 2 lóbulos laterales separados por un surco central que es palpable en el examen digital rectal y un lóbulo

medio que puede proyectarse en la vejiga en los hombres de edad avanzada **(24)**.

B.2. Histología.

La próstata se compone de unas 40 glándulas tubuloalveolares que se vacían en unos 20 conductos excretores independientes. A su vez estos desembocan en la uretra, a ambos lados del colículo seminal. Las glándulas están incluidas en un estroma, compuesto en su mayor parte de células musculares lisas, separadas por hebras de tejido conectivo. La musculatura conforma una masa muy densa alrededor de la uretra y por debajo de la cápsula, que es delgada, pero fuerte, y presenta características similares al estroma, al que está muy unida **(25)**.

Los alveolos tienen forma muy irregular, dado que la lámina propia, recubierta por tejido conectivo, forma evaginaciones a la luz. El tamaño de los alveolos es muy variable. Están revestidos por epitelio cúbico a cilíndrico pero también pueden aparecer células basales, por lo que el epitelio se transforma en pseudoestratificado. El citoplasma contiene abundantes gránulos de secreción y con microscopía óptica y electrónica se distinguen lisosomas dispersos, que contienen fosfatasa ácida **(25)**.

El epitelio de los conductos excretores es cilíndrico simple y por último se transforma en epitelio de transición, cerca de la desembocadura de uretra. La próstata se caracteriza por la presencia, en los alveolos, de cuerpos amiláceos, redondos y eosinófilos. Los alveolos poseen zonas concéntricas y llegan a medir más de un milímetro y están compuestos por depósitos de ciertas glucoproteínas, el amiloide, que le da el nombre. La cantidad de cuerpos amiláceos aumenta con la edad. También se pueden calcificar, y entonces se denominan cálculos o concreciones. Los cuerpos amiláceos pueden aparecer

en el espermatozoide. El epitelio descansa sobre una delgada lámina propia que se continúa en el estroma circundante siendo esta la región en donde se desarrollan los adenocarcinomas **(25)**.

La secreción prostática es un líquido lechoso muy fluido, que contiene cantidades importantes de ácido cítrico, por lo que el pH es algo ácido. También contiene fosfatasa ácida y antígeno prostático específico (APE), una enzima proteolítica con efecto sobre el espermatozoide coagulado, cuya función fisiológica es mantener fluido el eyaculado. Varios activadores del plasminógeno también ejercen este efecto sobre la estructura de gel del espermatozoide. Es característica una concentración muy elevada de zinc, de importancia para la estabilización de la cromatina muy condensada de las cabezas de los espermatozoides (3). La secreción prostática también contiene IgA y una elevada concentración de poliaminas, con efecto bacteriostático, al igual que el zinc **(25)**.

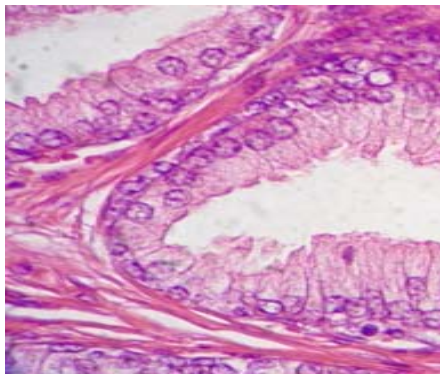


Figura 3. Histología de la próstata normal

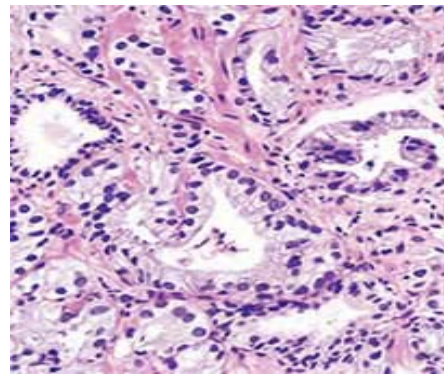


Figura 4. Histología de cáncer de próstata

C. CITOCROMO P-450.

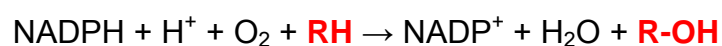
C.1. Características

El sistema citocromo P450 (CYP450) es una superfamilia de hemoproteínas que catalizan el metabolismo de fase I de un gran número de compuestos tanto endógenos como exógenos, estos últimos comúnmente llamados xenobióticos.

Los CYPs (citocromo P450) catalizan la conversión de numerosos xenobióticos incluidos los cancerígenos y las drogas, pueden participar en las rutas metabólicas de la activación de precarcinógenos y/o inactivación de los agentes carcinógenos durante el proceso oncogénico.

Los xenobióticos son sustancias químicas naturales o artificiales que son ajenas al cuerpo, tales como fármacos, productos industriales, pesticidas, contaminantes, alcaloides, metabolitos de plantas y toxinas producidas por hongos, plantas y animales **(26)**.

Muchos de ellos actúan como disruptores endocrinos. En su estado natural o biotransformado, algunos xenobioticos pueden afectar la integridad del ADN resultando en cáncer si la exposición persiste. El mecanismo de catálisis de estas enzimas consiste en la adición de un átomo de oxígeno a un sustrato que previamente se había unido a su sitio de reconocimiento dentro de la proteína. La reacción típica catalizada por el CYP450 se conoce como monooxigenación y se resume como se muestra a continuación:



Al final, la biotransformación del sustrato (representado como RH) genera un producto más polar e hidrofílico (ROH) que puede ser más fácilmente

excretado por la orina o, en su defecto, sufrir metabolismo de fase II, conjugándose así con otras moléculas que lo hagan todavía más polar y por lo tanto más fácilmente excretable para el organismo. Cabe resaltar que la monooxigenación no es la única reacción que pueden catalizar estas enzimas, otras reacciones también incluyen reducciones y desmetilaciones **(27)**.

Se les llama enzimas CYP450 por que contienen un pigmento hemo (cromo y fosforo) que absorbe la onda de luz de 450 nm cuando se expone a monóxido de carbono, localizándose principalmente en el retículo endoplásmico del hígado e intestino delgado **(28)**.

El complejo enzimático del CYP-450 consta de 144 enzimas distribuidas en diversos tejidos y órganos, especialmente en las membranas del retículo endoplásmico liso del hígado. Estas enzimas participan en la desintoxicación de elementos xenobióticos, como los medicamentos, y en el metabolismo de algunos endobióticos, como los esteroides, los eicosanoides y las vitaminas liposolubles, recientemente se han encontrado una variedad de CYPs expresados en un número creciente de tejidos cancerosos, así como los tejidos normales **(29)**.

Las enzimas CYP450 son esenciales para la producción de colesterol, esteroides, prostaciclina y tromboxano A₂. También son necesarias para la detoxificación de sustancias extrañas y el metabolismo de fármacos. Ésta expresión local del CYP en los tumores parece ser importante para el desarrollo de los diferentes tipos de cánceres ya que pueden estar también implicados en la activación y/o inactivación de los medicamentos específicos para controlar estas enfermedades. La expresión de CYPs en tumores también

puede convertir en sustratos endógenos a los metabolitos que faciliten el desarrollo del cáncer **(30)**.

C.2. Función celular del citocromo P-450.

Las enzimas que metabolizan compuestos xenobióticos se han clasificado históricamente en dos categorías: las de fase I, que cumplen una misión metabolizadora; y las de fase II, que tienen la misión de conjugar los sustratos con otros compuestos **(31)**.

En el citocromo P450 las enzimas principales del metabolismo de fase I actúan dentro de la célula acompañadas de las enzimas de fase II, encargadas de la conjugación de los metabolitos producidos por las primeras, entre las que se encuentran las glutatión-S-transferasas (GST) y las N-acetiltransferasas (NAT). La mayor o menor acción de unas y otras va a tener como consecuencia que las sustancias exógenas que llegan a la célula, ya sean agentes terapéuticos, drogas o carcinógenos resulten inocuos o tengan un efecto tóxico o un efecto benéfico y eficaz **(31)**.

Estas sustancias van a ser reconocidas por la célula como señales exógenas mediante diversos mecanismos de recepción, y entrarán en ella por difusión pasiva o mediante transportadores activos. Una vez dentro actuarán las enzimas de fase I. Los metabolitos que se generan y las propias moléculas no metabolizadas, podrán actuar sobre su diana y ser eficaces, o podrán resultar tóxicos para la célula por uniones covalentes a proteínas y ácidos nucleicos o por una perturbación en el ciclo celular provocado por un estrés oxidativo. El que una droga, carcinógeno o agente terapéutico, resulte inocuo para la célula, impidiendo su efecto beneficioso o perjudicial, va a depender de la cantidad formada de sustratos intermedios, de la estabilidad química de éstos y de la presencia cercana de enzimas de fase II. Si dichas enzimas pueden actuar,

formarán conjugados que serán excretados de la célula, no teniendo ninguno de los efectos mencionados. Además estas sustancias van a poder actuar como agonistas o antagonistas para inducir o reprimir los genes que codifican para las enzimas de fase I y fase II, lo que les va a permitir regular su propio metabolismo **(31)**.

POLIMORFISMO GENETICO.

Un polimorfismo es una variación en la secuencia de un lugar determinado del ADN entre los individuos de una población, es decir, el polimorfismo genético hace referencia a la existencia en una población de múltiples alelos de un gen.

Aquellos polimorfismos que afectan a la secuencia codificante o reguladora y que producen cambios importantes en la estructura de la proteína o en el mecanismo de regulación de la expresión, pueden traducirse en diferentes fenotipos (por ejemplo, el color de la piel).

Un polimorfismo puede consistir en la sustitución de una simple base nitrogenada (por ejemplo, la sustitución de una A (adenina) por una C (citosina) o puede ser más complicado (por ejemplo, la repetición de una secuencia determinada de ADN, donde un porcentaje de individuos tenga un determinado número de copias de una determinada secuencia).

Los cambios poco frecuentes en la secuencia de bases en el ADN no se llaman polimorfismos, sino más bien mutaciones. Para que verdaderamente pueda considerarse un polimorfismo, la variación debe aparecer al menos en el 1% de la población **(32)**.

Los polimorfismos genéticos son variantes del genoma que aparecen por mutaciones en algunos individuos, se transmiten a la descendencia y adquieren cierta frecuencia en la población tras múltiples generaciones. Se ha estimado que hay una variante en cada 1,000 pares de bases de los 3,000 millones que configuran el genoma humano, pueden ser silenciosos o proporcionar ventajas a los individuos, aunque también pueden contribuir a causar enfermedades. Se conocen muchas enfermedades determinadas genéticamente por mutaciones o variantes denominadas de «alta penetrancia», ya que los portadores de la variante suelen manifestar la enfermedad con una alta probabilidad. Estas variantes suelen ser de baja frecuencia en la población general. En la actualidad muchos trabajos centran sus avances en identificar genes con polimorfismos que se dan en la población con mayor frecuencia y que influyen en el riesgo de padecer una enfermedad, pero con baja probabilidad (son los llamados polimorfismos de «baja penetrancia»).

Los polimorfismos más frecuentes son cambios de una única base. A éstos se les llama polimorfismos de un único nucleótido (*single nucleotide polymorphism* SNP). Otros polimorfismos son repeticiones, en un número variable de veces, de una secuencia corta (*variable number tandem repeat* VNTR). En otras ocasiones, los polimorfismos se deben a deleciones o inserciones de secuencias cortas de nucleótidos. El cambio de un único nucleótido, si ocurre en una zona codificante puede provocar un cambio de aminoácido en la proteína resultante, y ello puede resultar en una modificación de su actividad o función **(33)**.

Para el estudio de los polimorfismos genéticos en términos generales podemos considerar que hoy en día es posible visualizarlos directa e indirectamente. Por un lado, al nivel de las proteínas, las reacciones de complementariedad de los

antígenos y anticuerpos utilizados in vitro para este fin darán cuenta de las variaciones estructurales que resulten inmunogénicas en modelos animales y humanos. Por otro lado, las reacciones de complementariedad de las secuencias nucleotídicas (ADN-ADN o ADN-ARN) permitirán poner en evidencia las diferencias estructurales de genes homólogos. Estas últimas podrán ser mejor definidas gracias a la especificidad de corte de las enzimas de restricción tanto como a la visualización directa de las diferencias en tamaño de los alelos correspondientes **(34)**.

C.3. POLIMORFISMOS DEL CITOCROMO P450 Y SU RELACIÓN CON EL CÁNCER DE PRÓSTATA.

C.3.1. CYP1B1

La ari-hidrocarbón hidroxilasa es una enzima que pertenece a la superfamilia de los citocromos P450. Las proteínas del citocromo P450 son monooxigenasas que catalizan reacciones que incluyen el metabolismo de fármacos, síntesis de colesterol, esteroides y otros lípidos. Esta proteína se localiza en el retículo endoplásmico y su activación es inducida por la presencia de algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos.

La proteína CYP1B1 cataliza la 4-hidroxilación del 17 β -estradiol al 4-OH catecol estrógeno, el cual puede ser convertido al 4-catecolestrógeno semiquinona o al 4-catecolestrógeno quinona. Estos metabolitos reactivos se unen con las purinas del ADN, que pueden resultar en la carcinogénesis de la próstata. Por lo tanto, el CYP1B1 cataliza la conversión de esteroides y otros sustratos exógenos a metabolitos tóxicos los cuales son la causa de daño genotóxico y oxidante en las células, que resulta en la transformación neoplásica **(35)**.

El gen del CYP1B1 humano ha sido asignado a la región cromosomal 2p21-p22 y está compuesto de tres exones y dos intrones que abarcan aproximadamente 12 kb de ADN. Aunque el CYP1B1 se expresa en una amplia gama de tejidos, su expresión es más alta en la próstata, en mama y en ovario **(36)**.

El CYP1B1 es inducido por la dioxina y transforma varios xenobióticos, por ejemplo cafeína y teofilina, es capaz de activar pro carcinógenos ambientales así como agentes anti cancerígenos. El CYP1B1 se expresa en varios tejidos corporales normalmente y se ha demostrado por inmunohistoquímica que su expresión se da en una amplia variedad de tumores: cáncer de mama, colón, pulmón y cerebro **(37)**.

Se han descrito dos polimorfismos en CYP1B1 (432 Val-Leu; 543 Asn-Ser). El 4-hidroxi-estradiol ha sido implicado en la carcinogénesis inducida hormonalmente por el CYP1B1 en varios tejidos **(37)**.

La hiperactivación del gen CYP1B1 en el tejido glandular prostático es causa de la sobre expresión de proteínas, y podría ser importante en el desarrollo de CaP. Se han descritos seis polimorfismos del gen CYP1B1 de los cuales cuatro producen una sustitución de aminoácido (en el codón 48C-T, 119G-T, 432C-G, y 453A-G) . La región promotora del gen CYP1B1 se encuentra entre los nucleótidos 164 y 25 en relación con el sitio de inicio de la transcripción, esta región contiene la caja TATA de NT 33 a 28 y dos sitios de unión Sp1 (GGGCGG) a partir de las nt 84 y 28 en la cadena antisentido. Se ha demostrado que el sitio Sp1 mantiene altas tasas de transcripción y el potenciador se ubica entre las nt 1022 a 835 y contiene varios elementos de respuesta a las dioxinas (DRE) las cuales participan en la activación transcripcional por hidrocarburos aromáticos policíclicos, tales como 2,3,7,8-

tetraclorodigenzo-p-dioxina. La inducción del CYP1B1 está regulado por el receptor aril de los hidrocarburos (AHR) en la vía de señalización para la unión de alta afinidad de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. En ausencia de ligando la AHR presente en el citoplasma se trasloca al núcleo en donde se forma un complejo heterodimérico complejo con el Ahr/nuclear (ARNT); este complejo Ahr/ARNT se une al DRE, lo que resulta en una mayor expresión del CYP1. En recientes estudios se ha identificado al AHR como un gen diana de la Wnt/h-cateína en células de cáncer de próstata **(38)**.

El CYP1B1 está sobreexpresado en varias células de diferentes tumores como el de pulmón, mama **(39)**, hígado **(40)**, de tracto gastrointestinal y ovario. Usando la técnica de inmunohistoquímica se reportó que el CYP1B1 está sobreexpresado en el citoplasma de las células de CaP comparado con tejido premaligno y de hiperplasia **(41)**. El CYP1B1 ya se encuentra expresado durante la etapa de premalignidad y es un regulador positivo en estadios tempranos de CaP. Así mismo se ha encontrado que el CYP1B1 está sobreexpresado en el citoplasma de células de CaP con una alta frecuencia, y expresado en forma normal en muestras de hiperplasia prostática benigna. Estos datos se han confirmado mediante RT-PCR de muestras de prostatectomía radical y claramente muestran que la expresión del CYP1B1 no se encuentra en tejido normal/sano **(42)**.

El polimorfismo Leu432Val de CYP1B1 ha sido asociado con CaP en muchos estudios que se han hecho en poblaciones japonesas. Previamente se mostró una asociación con el polimorfismo 432 Leu/Val CYP1B1 comparado con Leu/Leu en hombres con enfermedad menos agresiva principalmente en caucásicos. Se encontró que los polimorfismos (432 Leu/Leu o Leu/Val)-hOGG1 (326 Cys/Cys) de CYP1B1 resultaron en una mayor disminución en el

riesgo de CaP, particularmente en hombres caucásicos con CaP más agresivo. El CYP1B1 es altamente expresado en la ZP, zona en la que se origina la mayoría del CaP **(43)**.

Una transversión de C a G en la posición 1666 en el exón 3 de CYP1B1 (sustitución Leu-Val) en el codón 432 de la proteína. Este polimorfismo juega una considerable variación étnica con frecuencias de alelos que van de 0.17 en China a 0.75 en caucásicos. Resultados obtenidos en preparaciones de microsomas de pulmón humano de individuos con los genotipos Val/Val y Leu/Leu indicaron que la variante Val 432 es un alelo altamente activo, resultando de diferencias individuales en la actividad de CYP1B1 indicando que el CYP1B1 Val432 se asocia con el cáncer de próstata y cáncer de ovario. **(44)**

C.3.2. CYP2W1.

El CYP450 de la familia 2 esta involucrado en el metabolismo de muchos fármacos y otros xenobióticos normalmente se encuentran tanto en la membrana del reticulo endoplasmico (RE) y en las mitocondrias.

La familia CYP2 es una amplia familia de enzimas involucradas principalmente en el metabolismo de drogas y otros xenobióticos. Sin embargo, algunas de las enzimas del CYP2 también están involucradas en el metabolismo de substratos endógenos, como el metabolismo del AA **(45)**.

Recientemente, se identificó el citocromo CYP2W1 dicha enzima se localiza tanto en tejido hepático como extra hepático expresándose tanto en tejidos asociados y no asociados al metabolismo de xenobióticos. El gen del CYP 2W1 se encuentra localizado en el brazo largo del cromosoma 7q22.3 y posee una estructura común a los genes de la familia 2 con 9 exones. Se ha reportado que se expresa en los tejidos cancerosos y durante la vida fetal, mientras que

en tejidos de adultos, sólo se han detectado niveles bajos de expresión. Se ha demostrado que CYP2W1 metaboliza el ácido araquidónico; sin embargo en recientes publicaciones, diversos autores han demostrado que a pesar de estar involucrado en su metabolismo no es su principal substrato **(46)**.

También se encuentra relacionado en el metabolismo del benzfetamine, así como ser capaz de activar metabólicamente varios pro carcinógenos, incluidos los dihidrodiol de los hidrocarburos policíclicos aromáticos (PAHs), la aflatoxina B1 y esterigmatocistina. La expresión selectiva en algunas formas de cáncer y la expresión baja en los tejidos normales hacen del CYP2W1 un posible blanco terapéutico durante el tratamiento del cáncer **(47)**.

Aunque varias isoformas del CYP2W1 se expresan en distintos tipos de cáncer, de los cuales existen reportes en la literatura refiriendo su asociación, en el año 2010 fue reportado el CYP2W1 por Gervasini y colaboradores, reportaron su expresión en muestras de cáncer de colon y tumores adrenales de humanos, por la técnica de Western Blot. **(48)**; en este mismo año Aung y colaboradores mostraron por RT-PCR la expresión de varias proteínas entre ellas CYP2W1 en cáncer de estómago **(49)**.

Después de estos estudios, en octubre de 2007, Gómez y colaboradores encontraron la expresión y por primera vez la metilación del gen de CYP2W1 en líneas celulares de carcinoma de colon (HepG2 y Caco-2TC7), carcinoma de colon y en tejido normal de colon a partir de RT-PCR en tiempo real y Western Blot. Esta metilación en el exón 1-intrón 1 del gen de CYP2W1 en ambas líneas celulares, mientras que en el carcinoma de colon y en tejido normal se observó que la desmetilación parece ser un requerimiento para la expresión génica de CYP2W1 **(50)**.

Edler y colaboradores encontraron la expresión de CYP2W1 en 162 tumores en pacientes con cáncer colorectal en etapas II y III por métodos inmunohistoquímicos. En este estudio los autores concluyeron que CYP2W1 es un factor pronóstico independiente para etapas II y III en cáncer colorrectal. El CYP2W1 no ha sido reportado como objeto de estudio en el cáncer de próstata, sin embargo existen estudios que refieren la expresión del CYP2W1 en algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de colon, glándula adrenal, pulmón y cánceres gástricos **(51)**.

La alta expresión del CYP2W1 se ha asociado con una peor evolución clínica recientes estudios han mostrado que la sobreexpresión del CYP2W1 en el tejido del cáncer podría estar asociado a una disminución de la metilación. Hoy en día no hay datos sobre el CYP2W1 y su papel en la carcinogénesis y/o tratamiento del cáncer **(52)**.

D.- GENOTIPIFICACION POR ANALISIS DE CURVAS DE FUSION DE ALTA RESOLUCIÓN (HRM).

La genotipificación por análisis de curvas de fusión mejor conocidas como curvas Melting de Alta Resolución (HRM) es una metodología de escrutinio de mutaciones. Es un método de tubo cerrado que indica que la amplificación por PCR en tiempo real y el subsecuente análisis tienen bajo riesgo de contaminación cruzada.

El diseño de buenos oligonucleótidos es esencial para obtener un análisis HRM reproducible. Los SNPs cerca de los primers usualmente alteran la curva disminuyendo la región de baja temperatura de la misma, haciendo una línea más efectiva que cruza esta región presentando una diferencia en la forma de la curva.

También se debe de poner especial cuidado en el diseño de la reacción de PCR en tiempo real para evitar la formación de dímeros de primers o productos inespecíficos de amplificación **(53)**.

El SyberGreen es un intercalante fluorescente del ADN que reporta cuantitativamente la presencia de este ácido nucleico y este método está basado en las propiedades de fusión del ADN en solución. El método HRM no requiere de costosas pruebas y no necesita ningún gen de referencia para la normalización de la curva; hace el experimento relativamente simple y de bajo costo, además de no requerir ningún proceso después la reacción de PCR, siendo esto particularmente importante en el marco del diagnóstico de rutina **(54)**.

El espectro de fluorescencia se registra durante la fase de elongación de cada ciclo de la de PCR generando las curvas de amplificación para cada reacción; la fluorescencia se mide durante cada paso de la amplificación y se toma la primera derivada de la fluorescencia para graficarla como una función de la temperatura.

La discriminación máxima de temperatura de hibridación es independiente de varios factores tales como el contenido de GC y la longitud del amplicón, de forma tal que esta información puede ser utilizada para discriminar la amplificación inespecífica y dímeros de primers de una amplificación específica de cada polimorfismo estudiado **(55)**.

E. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En México la principal causa de muerte por cáncer entre la población masculina corresponde al de próstata (15.7 por ciento). La tasa de muerte es de 19.2 defunciones por cada 100 mil varones de 25 años y más. Entre los estados hay amplias diferencias, destaca Nayarit, con una tasa de 33 defunciones por cada 100 mil hombres de este grupo de edad, le siguen Jalisco (28.2), Michoacán (27.4) y Zacatecas (26.9). Quintana Roo muestra la menor tasa (9.4) y su diferencia con Nayarit es casi de 24 defunciones por cada cien mil varones de 25 años y más **(56)**.

La etiología del CaP sigue siendo poco entendida, pero ha sido relacionado a la predisposición genética, edad avanzada, etnicidad y factores ambientales como posibles riesgos para el desarrollo del cáncer de próstata **(57)**. Factores hereditarios de riesgo puede implicar genes de susceptibilidad de alta penetrancia con frecuencias bajas y/o genes con baja penetrancia con más altas frecuencias en la población. A pesar de que el APE es el método diagnóstico más sensible para CaP, este se encuentra elevado sólo en el 16% al 86% de los pacientes **(58)**.

La hiperactivación del gen CYP1B1 en el tejido glandular prostático es causa de la sobreexpresión de proteínas, y podría ser importante en el desarrollo de CaP **(59)**.

Uno de los mecanismos por el cual el CYP1B1 puede ser hiperactivado es por la presencia de polimorfismos genéticos. Hasta la fecha, seis polimorfismos del gen CYP 1B1 han sido descritos, de los cuales cuatro de ellos sufren sustitución de aminoácidos (en el codón 48C-T, 119G-T, 432C-G y 453A-G) **(60)**. Varias investigaciones sugieren que estos polimorfismos también pueden alterar la actividad enzimática y la especificidad catalítica del CYP1B1, y con esto coadyubar en el proceso de carcinogénesis (28,29). La importancia de CYP1B1

en los carcinógenos químicos está bien ilustrada en los modelos animales en los que los metabolitos de CYP1B1 inducen el desarrollo del cáncer **(61)**. Existe evidencia notable para el papel potencial del CYP1B1 en CaP ya que este está sobreexpresado en CaP mientras no se ha detectado la expresión del mismo en tejido prostático normal (29). Una correlación entre el polimorfismo 355T/T y el riesgo para CaP en una población polaca (28) y el RS1056836 en una población japonesa y una caucásica **(61)**.

De acuerdo con lo anterior, debido a la asociación existente entre la presencia de diferentes polimorfismos y el cáncer, en el presente trabajo se determino por primera vez, la asociación de los SNPs +1103G>C del CYP1B1 y el +7021 G/A del CYP2W1 en el cáncer de próstata en una población mexicana.

F.- JUSTIFICACIÓN.

En México el CaP es la segunda causa de muerte en hombres por cáncer después del cáncer de pulmón. Después de los 50 años de edad la incidencia de cáncer de próstata aumenta 3 ó 4 veces cada 10 años. Aunque el APE es el mejor indicador sérico para el diagnóstico de CaP actualmente disponible, tiene grandes limitaciones a pesar de su gran sensibilidad, el uso del APE se ve limitado debido a su baja especificidad, por consiguiente, la valoración clínica de pacientes con un valor de APE elevado resultará en el rendimiento de las biopsias prostáticas superfluas en un número concreto de hombres.

El tratamiento y pronóstico de los pacientes con CaP depende del grado de extensión del mismo, por lo que en pacientes con metástasis resulta ser incurable el cáncer y solamente se les puede ofrecer tratamientos paliativos; por lo tanto entonces, es de vital importancia detectarlo tempranamente.

El cáncer de próstata es la segunda neoplasia mas común después del cáncer de piel en los varones y la segunda causa de muerte en hombres por cáncer después del cáncer de pulmón. Se atribuyen numerosos factores al aumento de la incidencia del cáncer de próstata. Más de 200 mil hombres en los Estados Unidos son diagnosticados anualmente con cáncer de próstata y 30 mil mueren cada año debido a este padecimiento. Después de los 50 años de edad la incidencia de cáncer de próstata aumenta 3 o 4 veces cada 10 años. Los afroamericanos muestran la tasa de elevada incidencia teniendo un incremento de 124 por 100 mil a 250 por 100 mil esto es un incremento de 102%. Los hispanoamericanos presentan una incidencia intermedia, esto es 104 por 100 mil. Los países asiáticos sobre todo Japón y China, presentan una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad por cáncer de próstata. En México el cáncer de próstata ocupó en 1998, el segundo lugar respecto a la incidencia entre las

neoplasias del varón después del cáncer de piel; en cuanto a la mortalidad, ocupó el segundo lugar de la totalidad de las neoplasias después del carcinoma cervicouterino.

Se atribuyen numerosos factores al aumento de la incidencia del cáncer de próstata. Mas de 200 mil hombres en los Estados Unidos son diagnosticados anualmente con cáncer de próstata, y 30 mil mueren cada año debido a esta enfermedad. Después de los 50 años de edad la incidencia de cáncer de próstata aumenta 3 o 4 veces cada 10 años. En la última década los afroamericanos muestran la tasa de incidencia mas elevada, ya que setuvo un incremento de 124 por 100 mil a 250 por 100 mil lo que representa un incremento del 102%. Los hispanoamericanos presentan una incidencia intermedia, esto es 104 por 100 mil. Los países asiáticos sobre todo Japón y China, presentan una de las tasas mas bajas de incidencia y mortalidad por cáncer de próstata **(62)**. En México el cáncer de próstata ocupa el segundo lugar respecto a la incidencia entre las neoplasias del varón después del cáncer de piel; en cuanto a la mortalidad, ha sido el segundo lugar de la totalidad de las neoplasias, después del carcinoma cervicouterino.

El cáncer de próstata es un importante problema de salud pública con altos costes sociales y una considerable carga individual para el paciente. La incidencia del cáncer de próstata parece aumentar en la mayoría de los países debido a la mejoría y al uso de las pruebas diagnósticas, particularmente la determinación del antígeno prostático específico (PSA), a un envejecimiento de la población y, probablemente, a un aumento real de la incidencia. Generalmente, el cáncer de próstata crece lentamente y muchos hombres con la enfermedad nunca experimentarán problemas derivados de ella y llevaran a cabo sus actividades cotidianas sin que el cáncer alcance significación clínica **(63)**. El cáncer de

próstata aumenta a partir de los 40 años, llegando a su pico máximo a los 80 años. El 80% de los casos se diagnostican en hombres de más de 65 años, siendo la edad media del diagnóstico 72 años. La mayor parte de los cánceres se dan como enfermedad histológica oculta o latente.

Según estimaciones realizadas, de 95 hombres con cáncer de próstata sólo uno tendrá manifestaciones clínicas, y uno de 323 morirá de la enfermedad. Para un hombre de 50 años el riesgo de desarrollar cáncer de próstata a lo largo de su vida es del 42%, sin embargo, el de tener sintomatología clínica es del 9,5% y el de morir por esta causa del 2,9%. La supervivencia específica del cáncer de próstata confinado al órgano, no tratado es del 93,8% a los cinco años.

G. HIPÓTESIS:

Existe una asociación entre los polimorfismos genéticos de los citocromos CYP1B1 (rs 56339482) y CYP2W1 (rs 3808348), y el desarrollo del Cáncer de Próstata en la población mexicana.

H. OBJETIVOS.

General:

Evaluar la asociación entre los polimorfismos de los citocromos CYP1B1 (rs 56339482 +1103 G/C) y CYP2W1 (rs 3808348 +7021 G/A) y el riesgo a desarrollar cáncer de próstata en la población mexicana.

Específicos:

- Estandarizar la técnica de PCR-RT.
- Identificar el polimorfismo del CYP1B1 (+1103 G/C).
- Identificar el polimorfismo del CYP2W1 (+7021 G/A).
- Establecer la relación del polimorfismo del citocromo CYP1B1 (rs 56339482 +1103 G/C.) y el cáncer de próstata en la población mexicana.
- Establecer la relación del polimorfismo del citocromo CYP2W1 (rs 3808348 +7021 G/A.) y el cáncer de próstata en la población mexicana.
- Establecer la presencia de los SNPs rs 56339482 y rs 3808348 con el riesgo a cáncer de próstata en la población mexicana.
- Coadyuvar en la conformación de un banco de DNA de pacientes mexicanos con CaP.

I. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.

- a. Muestras de tejido de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata.
- b. Muestra de sangre periférica de pacientes diagnosticados con cáncer de próstata.
- c. Muestras con adecuada cantidad y bien conservados.

J. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.

- a. Muestra de tejido que durante el manejo no se haya conservado adecuadamente.
- b. Muestra con tejido insuficiente.

K. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.

- a. Muestra con ácidos nucleicos degradados.

L. MATERIALES Y METODOS

L.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS:

Para este estudio se utilizaron 61 muestras, de las cuales 41 correspondieron a bloques de parafina con tejido prostático incluido y previamente corroborado por medio del servicio de patología como positivo a cáncer de próstata, y 20 muestras de sangre periférica de pacientes diagnosticados clínicamente con cáncer de próstata del servicio de urología del Hospital Central Militar.

Las muestras incluidas en el estudio fueron obtenidas entre el periodo comprendido entre los meses de mayo del 2009 y febrero del 2011 atendiendo a los criterios de inclusión y exclusión antes expuestos.

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de Oncología Molecular de la Sección de Estudios e Investigación de Posgrado de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional y en el laboratorio de Biología Molecular de la Escuela Médico Militar.

L.2. DESPARAFINADO:

Para realizar el desparafinado de las muestras incluidas se colocaron en un tubo eppendorf 7 cortes delgados de la muestra (de aprox. 4 micras de grueso) agregándose 1 ml. de xilol e Incubando 30 min. a 42°C (en horno seco) para posteriormente centrifugar a 14000 r.p.m. por 5 min. a 25°C. se retira el sobrenadante repitiendo dos veces este mismo procedimiento con xilol.

En la etapa de hidratación se agrego 1 ml. de alcohol-xilol 50:50 incubándose 5 min. para posteriormente centrifugar a 14000 r.p.m. por 5 min. a 25°C. retirando nuevamente el sobrenadante y repitiendo esto en series de alcohol al 100, 75, 50 y 25 %.

Haciendo un lavado con agua DEP y después de centrifugar para quitar el exceso de agua se adicionaron 50 µl de acetona dejando el tubo destapado a 42°C toda la noche.

A las muestras de sangre les fueron eliminados los eritrocitos por medio de una solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 0.15 M, KHCO₃ 10 mM y NaEDTA 0.1mM) dejando para el desarrollo del trabajo únicamente a los leucocitos con la finalidad de obtener DNA lo mejor conservado posible.

L.3. EXTRACCION DE DNA.

La extracción del DNA en ambos tipos de muestra se llevo a cabo mediante la técnica de cloroformo-fenol-alcohol-isoamilico de acuerdo con el siguiente procedimiento:

A un tubo conteniendo la muestra se le agrego 300 µl de TE (Tris-HCl pH8 10 mM, EDTA 1 mM). Homogeneizándose y adicionando 50 µl de SDS 10%. e incubando a 56°C por 30 min., posteriormente se adicionaron 50 µl de proteinaza K (10 mg/ml) incubando nuevamente a 56°C por 90 min.

Para la extracción se adicionaron 500 µl de fenol-cloroformo-alcohol isoamilico (25:24:1) se homogeneizó suavemente y centrifugandose a 14000 r.p.m. por 5 min. a 4°C. recuperando la fase acuosa en otro tubo eppendorf para después adicionar 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) homogeneizándose suavemente y centrifugando nuevamente a 14000 r.p.m. por 5 min. a 4°C. se retiro la fase acuosa en otro tubo eppendorf haciendo la precipitación con 700 µl de isopropanol- acetato de amonio 7.5M (10:1). Después de homogeneizar se incubaron las muestras por 20 min. a 4°C. y para precipitar el DNA, se centrifugo nuevamente a 14000 r.p.m. por 5 min a 4°C. eliminando el sobrenadante y lavando el pellet con etanol 75%. Para centrifugar a 14000 r.p.m. por 5 min. a 4°C. y una vês que se retiro em exceso de alcohol se dejo

secar el botón durante 30 min. y se agregaron 50 µl agua DEPC. para disolverlo. El ADN se conservó en congelación a -20°C.

A partir de estas muestras, se realizó una dilución 1:10 con agua molecular estéril obteniendo una concentración aproximada de ADN de 10 ng/ µl para los ensayos de amplificación por PCR en tiempo real.

L.4. VERIFICACION DE LA INTEGRIDAD DEL MATERIAL GENÉTICO.

La verificación de la integridad del ADN total fue realizada por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%, colocando 6 µL del ADN total extraído de cada muestra con ayuda del sistema de análisis de electroforesis EDAS 290 (EDAS 290 KODAK, New Haven, CT, USA).

Para preparar la muestra se emplearon 5 µl de cada muestra de DNA, se mezcla con 1 µl de Buffer de carga 6X. Posteriormente se cargo cada una de las muestras y el marcador de peso molecular en una minicámara con Buffer TBE 0.5X para la corrida. Se corrió durante 5 min. a 60V/20mA para concentrar la muestra, subiendo el voltaje a 80V/20mA por 30 min.

El gel de agarosa se observó con un equipo, CTUV UVis-20, Hoffer adquiriéndose la imagen con una cámara Kodak EDAS 290, MacroNew Haven CT. La fotografía se analizó con el software Kodak 1D 3.6. La cuantificación del ADN total fue realizada por medio de fluorescencia con SYBR Green, con el multidetector Synergy HT-I (BIO-TEK Instruments, Inc. Highland Park, Vermont, USA).

L.5. PCR.

Para el desarrollo de la PCR se diseñaron oligonucleótidos específicos para los genes CYP1B1, CYP2W1 y GAPDH (gliceraldehido 3 fosfato

deshidrogenasa) como control endógeno. Las secuencias fueron obtenidas del GenBank.TM La búsqueda de las secuencias fue realizada en (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para confirmar su especificidad. Utilizándose para el diseño de los primers el programa Primer Express 2.0. Los primers fueron sintetizados (InvitrogenTM Carlsbad CA, USA) libres de sales y altamente purificados optimizados a una temperatura de alineamiento de 50°C para CYP1B1 y 57°C para el CYP2W1.

GEN	Secuencias de los Primers	Longitud del amplicón (pb)
CYP1B1	F: GAC AGAGCC ACA CGG AAG R: CTC ACC TCT CGT TCG CTC	206
CYP2W1	F: ACC CAG CAG GGA CAC AAA C R: TGG ATG GCT ACA GAG GTG AG	179
GAPDH*	F: GAG CCA AAA GGG TCA TCA TCT C R: CTC TCC ACG ATA CCA AAG TTG TCA	195

Las condiciones para la PCR fueron optimizadas con el termociclador de gradiente (gradient Px2 Thermal Cycler Hybaid, Franklin, MA). Las secuencias tomadas correspondieron a los registros en el GenBankTM. Los productos de amplificación por PCR fueron verificados, visualizando su peso molecular en pares de bases (pb) por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2%, utilizando un marcador de 50 pb DNA Ladder (10416-014, Invitrogen life technologies, 1600 Faraday Av. Carlsbad, California, USA) y estudiados con el sistema de análisis de electroforesis EDAS 290, (KODAK, New Haven, CT). Los resultados obtenidos de las amplificaciones como son las condiciones de temperatura, concentraciones de primers, dNTPs (nucleótidos) y volúmenes, fueron transferidos al protocolo de amplificación del sistema de detección Rotor Gene 6.0 (Corbett Life Science, Sídney City, Australia). Protocolo de PCR en tiempo real "ROTOR-GENE 3000".

Las reacciones de PCR fueron realizadas llevadas a 12.5 μ L de volumen final con 10 ng. de ADN total de las muestras, utilizando una concentración final de 25 mM $MgCl_2$, 5 U/ μ L de AmpliTaq Gold DNA polimerasa, mezcla de dNTPs (2.5 mM de ATP, 2.5 mM de CTP, 2.5 mM de GTP y 5.0 mM de dUTP), 0.4 μ L del primer forward (0.4 μ M), 0.4 μ L del primer reverso (0.4 μ M), y 0.8 μ L de agua grado molecular. Las reacciones fueron realizadas inicialmente a 94°C por 5 min, seguido de 35 ciclos en la fase de PCR, cada ciclo de 95°C por 20 s, 50°C por 20 s, 72°C por 20 s, con una fase de extensión de 72°C por 5 min. y finalmente una fase de desnaturalización para generar las curvas melting para cada producto amplificado (T_m de cada amplicón) a una temperatura de 60 y un gradiente de 60 a 98°C, con intervalos de 0.1°C y con rango de discriminación de 0.008°C para los productos generados. Todas las reacciones tanto para el ADN de los pacientes (CaP y Controles), se realizaron por triplicado haciéndose un total de 549 reacciones. Se amplificó y determinó en paralelo, el fragmento control utilizando su curva estándar, determinando de esta forma el SNP de los tejidos procesados. Se verificó el tamaño de los fragmentos amplificados por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2%, colocando 4 μ L del volumen de amplificación, visualizando las bandas con luz UV con el sistema de análisis de electroforesis EDAS 290 (EDAS 290 KODAK).

L.6. DETECCION DE LOS POLIMORFISMOS.

La determinación de la presencia/ausencia de polimorfismos en las muestras se llevó a cabo mediante la técnica de High Resolution Melting (HRM), considerando los cambios debidos a la variación en las bases próstata (TABLA 1).

CYP	SNPs	Posición	Alelo	Cambio de nucleótido	Cambio de a.a.
1B1	rs 79204362	1103	G/C	C/T	Arg::His
2W1	rs 3735684	7021	G/A	C/T	Ala::Thr

Tabla 1. Identificación de los SNPs CYP1B1 y CYP2W1.

M. RESULTADOS:

M.1 Datos de los pacientes:

En este estudio consideramos las muestras de tejido prostático con diagnóstico de cáncer a través de los expedientes de pacientes del Hospital Central Militar registrados en los archivos del Departamento de Patología, de acuerdo a los criterios de inclusión, de la misma manera fueron obtenidas 29 muestras de pacientes que no presentaron desarrollo de procesos cancerosos, mismos que fueron considerados como controles para establecer la asociación de los polimorfismos al cáncer de próstata (TABLA 2).

Grupo de edad	No. de casos (n=61)	No. de Controles (n=29)
	n (%)	n (%)
40-49	2 (2%)	1 (5%)
50-59	7 (13%)	3 (11%)
60-69	32 (53%)	14 (53%)
70-79	16 (27%)	9 (26%)
Más de 80	4 (5%)	2 (5%)
PROMEDIO	66.2 (\pm 8.2)	67.8 (\pm 7.6)

Tabla 2. Frecuencias y porcentajes de los pacientes según su edad

Revisándose los expedientes se obtuvieron los datos clínicos relevantes para establecer su relación con este padecimiento.

Dentro del grupo de expedientes en estudio (61 pacientes) la edad promedio fue de 66.2 años (\pm 8.2 años) encontrando que el grupo de edad con mayor número de pacientes fue el de 60-69 años y el que presentó menor incidencia fue el de 40-49 años (FIG. 1), con respecto a la concentración promedio de

Antígeno Prostático Específico en este grupo fue de 9.6 ng/ml (\pm 7.1 ng/ml) (FIG. 2).

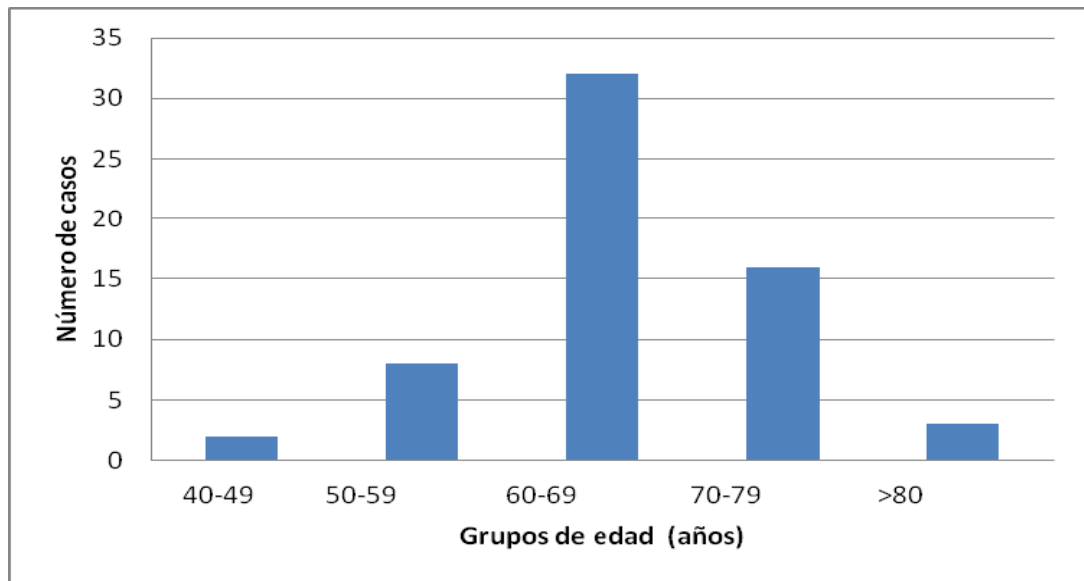


FIGURA 1. Grupos de edad (X), número de pacientes con CaP (Y).

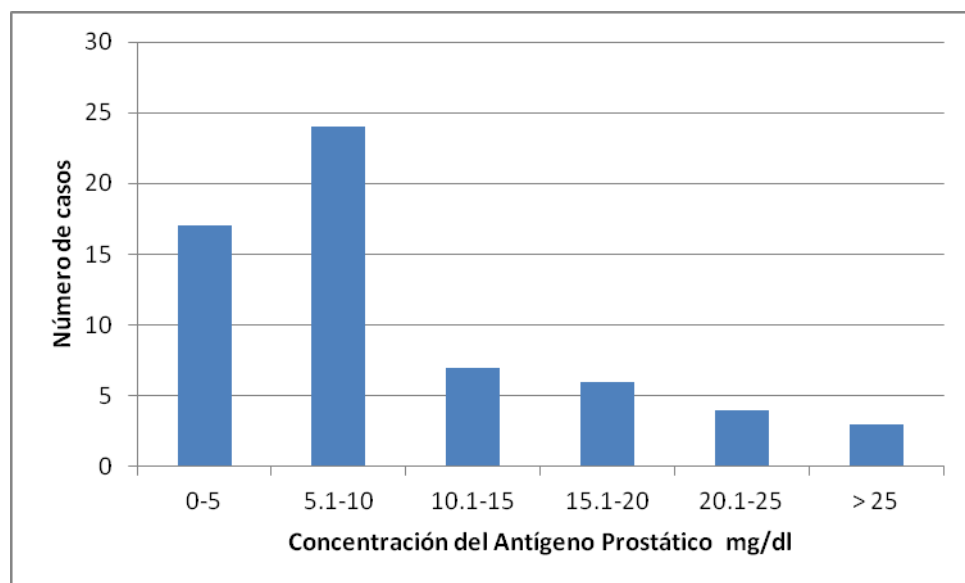


FIGURA 2. Concentración del Antígeno Prostático ng/dl (X) y número de casos que presentaron con CaP (Y).

Con lo que respecta al puntaje en la escala de Gleason fue de 3 en 2 casos (2%), de 4 en 2 casos (2%), de 5 en 2 casos (2%), de 6 en 25 casos (49%), de 7 en 15 casos (24%), de 8 en 10 caso (16%) y con el valor de 9 se presentaron 3 casos (5%) (FIG. 3).

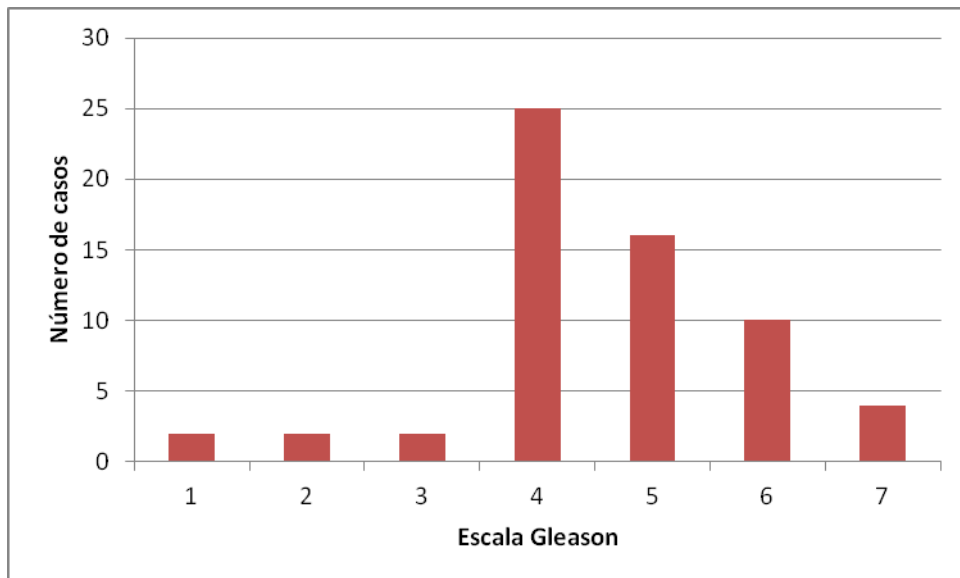


FIGURA 3. Número de pacientes (Y) y valor de la escala Gleason (X)

M.2. Integridad del ADN.

El protocolo de extracción de ADN fue estandarizado para obtener bandas de ADN que fueran visibles en el gel de agarosa para confirmar de ésta manera la integridad del producto, como se muestra en la figura 4 en donde se comprueba la presencia de bandas de ADN extraído tanto de las muestras de CaP a partir de los bloques de parafina así como de las muestras de sangre, observándose que no muestran degradación en ningún caso, así como que los productos están libres de proteínas. Considerándose que la diferencia de intensidad de las bandas se debe a la variación en la cantidad de material genético extraído de cada muestra de tejido de pacientes diferentes.

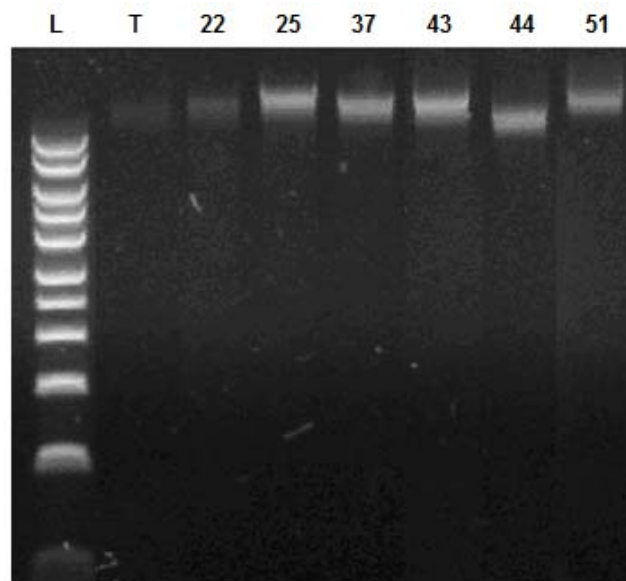


FIGURA 4. Gel de agarosa al 0.7% observándose la integridad del material genético obtenido a partir de las muestras de tejido canceroso.

M.3. Amplificación de los productos de PCR en tiempo real.

La FIGURA 5 muestra la amplificación de las muestras en estudio, observando que en la curva no. 1 del lado izquierdo la emisión de fluorescencia inicia +/- en el ciclo 7 lo que indica que el equipo (Rotor-Gene 3000) detectó en ese ciclo una diferencia en la emisión del fluorocromo utilizado (Sybr Green); el cual tiene la propiedad de intercalarse en el ADN de doble cadena y solo en ese momento es capaz de emitir fluorescencia la cual es captada por el aparato mencionado y automáticamente lo convierte en un valor. Posterior a esas amplificaciones le sigue una fase de desnaturalización de los productos de PCR obtenidos, durante este paso el equipo detecta el cambio de fluorescencia determinando el pico de desnaturalización el cual se compara con los controles.

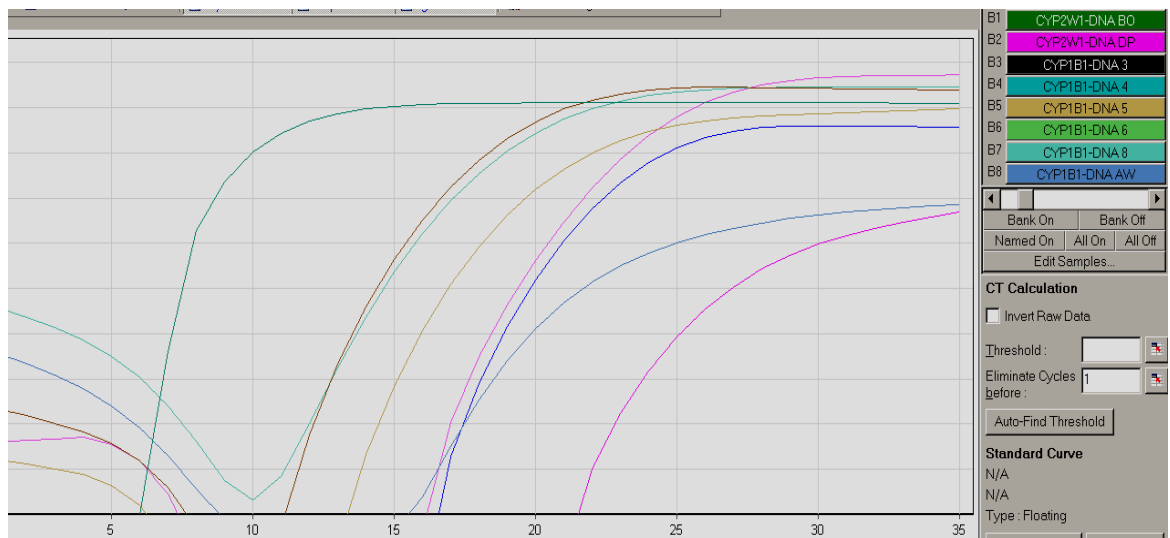


FIGURA 5. Gráficas de las amplificaciones del gen CYP1B1 en el que se muestran las amplificaciones de las muestras de ADN de los pacientes con CaP y controles. Del lado derecho se muestra cada uno de los tubos mostrados en colores

La detección de los polimorfismos en nuestras muestras se realizó mediante el HRM, mismo que se lleva a cabo en el equipo utilizado habiendo programado un gradiente de temperatura de acuerdo a la temperatura de alineamiento para

la cual fueron diseñados los primers. De manera que la diferencia en el alineamiento de nuestros fragmentos de DNA nos marca la diferencia existente en nuestro grupo de muestras con el alelo wild-type y el polimórfico (FIGURA 6).

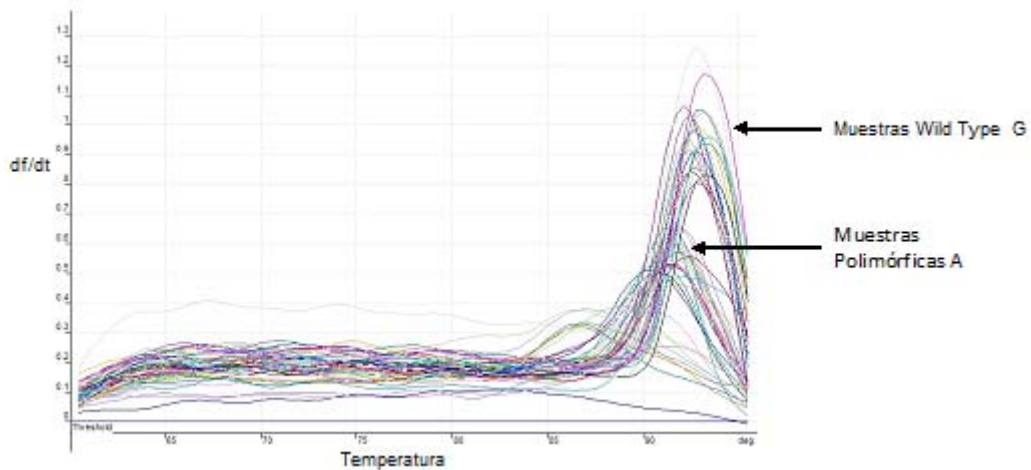


FIGURA 6. Gráficas de las temperaturas de alineamiento en las que se muestra al grupo de muestras con el alelo ancestral y al que presenta el polimorfismo

M.3.2 SNP 1103 G>C del gen CYP1B1.

Con el objeto de detectar la presencia de las secuencias génicas correspondientes al SNP 1103 G>C del gen CYP1B1 en las muestras utilizadas una vez que se obtuvieron los productos de PCR en tiempo real, éstos se analizaron mediante electroforesis en donde se puede observar que el tamaño del amplicón de CYP1B1 /SNP “G”) es de 206 pb (FIGURA 7).

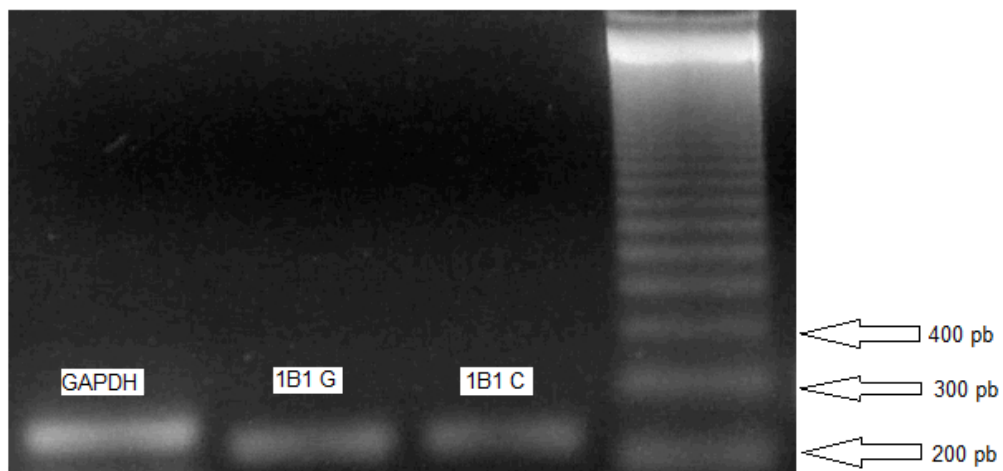


FIGURA 7. Gel de agarosa al 2% donde pueden observarse las amplificaciones de GAPDH, CYP 1B1 (SNP “G”) Y CYP 1B1 (SNP “C”) utilizando un marcador de 123 pb. En el carril 1 el amplicón esperado era de 180 pb, en el carril 2 el amplicón esperado era de 179 pb, y en el carril 3 el aplicón esperado también fue de 179 pb.

M.3.3. SNP 7021 G>A del gen CYP2W1.

La presencia de la secuencia génica amplificada por PCR en tiempo real correspondiente al SNP 7021 G>A del gen CYP2W1 en los tejidos de los pacientes también se comprobó mediante electroforesis observándose así mismo que el tamaño del amplicón de CYP2W1 corresponde a 179 pb (FIGURA 8). Los resultados de la determinación por PCR en tiempo real del SNP 2W1 fueron adecuados, ya que la mayoría de las amplificaciones tuvieron una óptima eficiencia. Los productos de las PCR (amplicones) también fueron los esperados, los primers diseñados flanquearon la región polimórfica que contenía nuestro SNP de interés.

En los muestras con CaP se obtuvo en un 73% de la presencia del SNP 2W1 y en el grupo control la presencia de este mismo SNP fue del 25%. En el caso del análisis de asociación la prueba chi cuadrada arrojó un resultado de 16.98 con un Odds Ratio de 8.308, un riesgo relativo de 2.160, un intervalo de confianza de 95% entre 1.400- 3.424

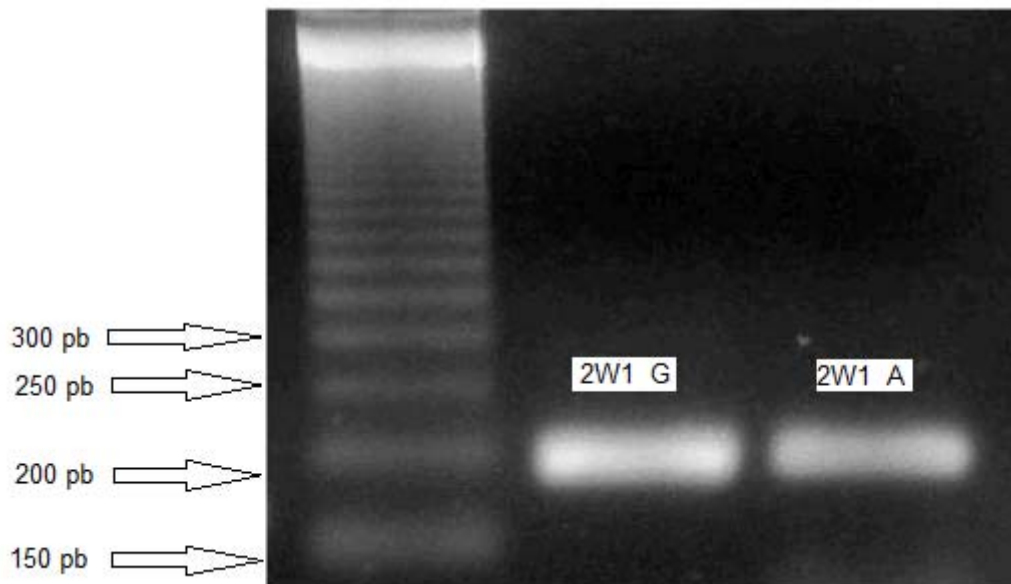


FIGURA 8. Gel de agarosa al 2% donde se observan las amplificaciones de CYP 2W1 (SNP ALELO "G") Y CYP 2W1 (SNP ALELO "A") en el carril dos se muestra el amplicón esperado (179 pb), en el carril tres se observa el mismo amplicón con el mismo peso molecular (179 pb).

M.4. INCIDENCIA DE LOS POLIMORFISMOS G/C (1103) DE CYP 1B1 Y G/A (7021) DE CYP2W1.

En la tabla 3 se muestra la frecuencia de aparición del SNP G/C (1103) del CYP1B1 y el SNP G/A (7021) de CYP2W1 encontrando que el 80% de las muestras analizadas tuvieron presente el polimorfismo G/C, mientras que el 73% presentó el polimorfismo G/A .

		Total de muestras	Presencia del polimorfismo
CYP1B1	SNP G/C	61	49 80%
CYP2W1	SNP G/A	61	45 73%

TABLA 3. Presencia de los polimorfismos en las muestras analizadas

M.5. ASOCIACION DE LOS POLIMORFISMOS G/C (1103) DE CYP 1B1 Y G/A (7021) DE CYP2W1 CON EL CANCER DE PROSTATA.

En cada etnia existen grupos de individuos que presentan más posibilidades que otros, de sufrir cierto tipo de enfermedades lo que nos indica que son individuos especialmente vulnerables que no se presentan aleatoriamente en la población y que muy a menudo esa "vulnerabilidad" tiene sus razones. Esta vulnerabilidad se debe a la presencia de cierto número de características de tipo genético, entre otras, que actuando individualmente o entre sí desencadenan la presencia de un proceso canceroso.

Es entonces cuando se aplica el término "riesgo", que implica la presencia de una característica o factor (o de varios factores) que aumenta la probabilidad de consecuencias adversas. Por lo que el riesgo constituye una medida de probabilidad estadística de que en un futuro se desarrolle un padecimiento por lo general no deseado que implica la presencia de una característica o factor que aumenta la probabilidad de consecuencias adversas.

Un factor de riesgo es cualquier característica o circunstancia detectable de una persona o grupo de personas que se sabe asociada con un aumento en la probabilidad de padecer, desarrollar o estar especialmente expuesto a un proceso mórbido.

Por lo que para establecer la asociación de la presencia de los polimorfismos en estudio se llevo a cabo la prueba estadística ODDS que es la razón de los productos cruzados de la proporción de un padecimiento de los sujetos expuestos a un factor de riesgo multiplicada por la proporción de individuos sanos que no presentan el polimorfismo, sobre los productos cruzados de la proporción de sanos con la presencia del polimorfismo multiplicada por la proporción de enfermos que no presentan el polimorfismo indicándonos la probabilidad de presentarse que tiene un padecimiento, elaborándose la tabla de contingencia de 2x2 para ambos polimorfismos:

Con lo que en base a los resultados obtenidos podemos decir que los pacientes que presentan el polimorfismo CYP1B1 tienen 10.7 veces más probabilidad a desarrollar CaP mientras que los pacientes que presentan el polimorfismo CYP2W1 tienen 8.8 veces más probabilidad a desarrollar CaP.

Asociación del polimorfismo G/C (1103) con el cáncer de próstata (CYP 1B1).			
	% Pacientes	si	no
Px. Con CaP	61% (61)	80% (49)	20% (12)
Controles	29% (29)	28% (8)	72% (21)
Total	100% (90)	63% (57)	37% (33)

OR=10.72, RR=2.364, IC (95%)=1.487-3.758

Asociación del polimorfismo G/A (7021) con el cáncer de próstata (CYP2W1).			
	% Pacientes	si	no
Px. Con CaP	68% (61)	73% (45)	27% (16)
control	32% (29)	24% (7)	76% (22)
Total	100%(90)	58% (52)	42% (38)

OR=8.839, RR=2.055, IC (95%)=1.394-3.03

Así mismo podemos observar que los pacientes que presentan el polimorfismo CYP1B1 presentan 2.3 veces más riesgo de desarrollar CaP mientras que los pacientes con el polimorfismo CYP2W1 tienen el doble de riesgo para a desarrollar CaP.

N. DISCUSIÓN.

Las causas de cáncer de próstata no son bien conocidas pero los factores genéticos y ambientales tienen un papel importante en su desarrollo. La próstata es un órgano dependiente de andrógenos y los polimorfismos de varios genes involucrados en el metabolismo androgénico, como el CYP1B1, el cual ha sido asociado al riesgo para CaP. **(64)**. El CYP1B1 es genéticamente polimórfico y varios SNP's han sido identificados, de los cuales cuatro cambian la secuencia de aminoácidos, que podrían alterar la actividad enzimática y especificidad catalítica del CYP1B1, consiguientemente alterando la síntesis de proteínas **(65)**. En nuestro estudio exploramos el polimorfismo +1103 G/C el cual provoca un cambio erróneo en la traducción del aminoácido, cambiando el aminoácido Glutamina por Histidina. Encontramos que la frecuencia de nuestro alelo estudiado fue de 80% y al analizar este dato encontramos una asociación de 20.1, el cual confiere un riesgo de 10.5 por lo que se considera que puede tener implicaciones en la evolución o etiología del CaP.

Schab y cols. encontraron una correlación entre el polimorfismo 355 T/T y el riesgo para CaP en una población polaca, notaron una frecuencia de 14.3% del genotipo homocigótico 355 T/T del gen CYP1B1 comparada con la de 8.4% en la población general de Polonia, concluyendo que la presencia de este polimorfismo puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de CaP; además, su investigación indicó que el genotipo ya mencionado no está relacionado con la edad de presentación de CaP, pero que si se encontró más asociado con CaP esporádico y no tiene un rol significativo en la agregación hereditaria de CaP **(65)**.

La edad de hombres afroamericanos diagnosticados con CaP fue de 60.2 años. Aproximadamente 45.7% de los casos tuvieron un Gleason total de 7 y 19.4% tuvieron un Gleason mayor a 7. Dentro del grupo de pacientes de nuestro estudio con diagnóstico de Cáncer de Próstata la edad promedio fue de 66.2 años (\pm 8.2 años) o sea 6 años más tarde que los afroamericanos de ese estudio y la concentración promedio de Antígeno Prostático Específico en este grupo fue de 9.1 ng/dl (\pm 7.1 ng/dl). El puntaje en la escala de Gleason fue de menor de 7 en el 67%, de 7 en 23%, y de más de 7 en 10%.

Pérez-Cadahía B. y cols reportaron varios polimorfismos en el gen del CYP1B1, cuatro de ellos son SNPs y generan sustituciones de aminoácidos. El CYP1B1*3 origina transversión de C a G en la posición 1666 en el exón 3 codón 432,

generando un cambio de Leucina a Valina. En general las variantes de las isoenzimas del CYP 1B1 son más activas que otros tipos. El genotipo C/C se encontró en una frecuencia de 0.345 presentándose en 81 casos, el genotipo C/G se presentó en una frecuencia de 0.447 en 105 casos y el G/G en una frecuencia de 0.208 en una población española **(66)** y Tang y cols. reportaron que estaba presente en 34% de los hombres caucásicos con CaP, mientras solo 12% de los controles expresaron este polimorfismo, concluyendo que el polimorfismo genético del CYP1B1 podrá ocupar un rol en la carcinogénesis de CaP.**(67)** El genotipo del CYP1B1 +1103G/C se encontró en una frecuencia de 0.8 presentándose en 36 casos.

En el estudio de Tokizane T. y cols. encontraron que CYP 1B1 estaba sobreexpresado en el citoplasma de células de cáncer de próstata con alta frecuencia, confirmándose estos datos en este estudio mediante RT-PCR en muestras de prostatectomía radical mostrándose claramente que la expresión del CYP1B1 esta elevada significativamente en CaP que en muestras de tejido no maligno **(68)**.

En el año 2006 Karlgren y cols. reportaron que el CYP2W1 fue detectado por PCR en tiempo real en células tumorales de humanos, la más alta expresión se encontró en cáncer de colon pero una expresión moderada fue observada en algunas células tumorales de glándula suprarrenal. Los autores sugieren de este estudio que el CYP2W1 es un potencial agente terapéutico o un marcador molecular útil para el diagnóstico y terapia del cáncer.**(69)**

En el 2007 Gómez y cols. determinaron la expresión del gen del CYP 2W1, se encuentra presente en tejidos de colon en estado fetal, además de ser específica para el tumor de colon; también afirman que está asociado con el estado de metilación de dicho gen, lo que sugiere una relación de causalidad entre la hipometilación del gen y su mayor expresión.**(70)**

De nuevo Karlgren y cols. en el 2007 encontraron que el CYP 2W1 es capaz de metabolizar el ácido araquidónico y la benzeftamina, así como de activar metabólicamente algunos procarcinógenos incluyendo los dihidrodioles de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, la aflatoxina B1 y la esterigmatocistina; por otra parte comentan que la expresión selectiva en algunas formas de cáncer y su expresión baja en tejidos normales hacen de ésta enzima un posible blanco para el estudio de la terapia farmacológica del cáncer.**(71)**

Hanzawa y cols. en el 2008 reportaron la identificación de seis polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) mediante análisis de cromatografía de líquidos de los productos de Reacción en Cadena de la Polimerasa. Tres de los SNPs no similares fueron los siguientes **(72)** 173A>C (Glu58Ala) en el exón 1, 5432G>A (Val432Ile) y 5584G>C (Gln482His) en el exón 9, 2008G>A (Ala181Thr) en el exón 4 y por último el 5601C>T (Pro488Leu) en el exón 9 y dos SNPs no similares ya anteriormente conocidos también fueron identificados: 2008G>A (Ala181Thr) en el exón 4 y 5601C>T (Pro488Leu) en exón 9. Los datos encontrados en esta población sugieren que estas variantes alélicas y el estudio de sus haplotipos pueden ser usados para predecir los fenotipos metabólicos de los substratos del CYP 2W1.

En este estudio mediante la metodología de PCR en tiempo real se estableció la presencia del polimorfismo del citocromo p450 2W1 +7021 (Ala181Thr) en tejidos de CaP, en la población mexicana, encontrándose una frecuencia de 73%, con 8.3 veces más de riesgo a padecer o evolucionar a esta entidad patológica, siendo esta la primera vez que es asociado el riesgo a un factor genético; éste hallazgo es consistente con la literatura, ya que se sabe que las poblaciones en diferentes partes del mundo, presentan diferencias en las frecuencias de la mayoría de las enfermedades, dependiendo de su localización geográfica. Considerando que en estudios posteriores se debe analizar con más detalle la frecuencia de estos SNPs en una población mayor, y determinar si estos polimorfismos conservan la ley del equilibrio genético de Hardy- Weinberg, para establecer con ello si genéticamente en nuestra población está presente el fenotipo que incrementa el riesgo a éste padecimiento, lo cual es debido a la avanzada edad en la que es diagnosticado en combinación con la relativa baja velocidad con la que crece el tumor implicando que un gran número de personas pueden tener presente esta enfermedad de manera asintomática.

La asociación entre los polimorfismos genéticos de riesgo de cáncer de próstata CYP1A1 y familiar ha sido examinado por un estudio caso-control con 185 individuos en una población japonesa y aunque el análisis individual de los genotipos M1 o M2 de CYP1A1 no mostraron asociación significativa con el riesgo de cáncer de próstata, la presencia de alelos mutados aumentó significativamente el riesgo de cáncer de próstata en comparación con los genotipos de tipo salvaje; mediante el análisis combinado (odds ratio [OR] = 2,38; 95% intervalo de confianza [IC] = 1.72-3.29, $p = 0,0069$) estos hallazgos sugirieron que los

polimorfismos de CYP1A1 tienen una asociación con el riesgo de cáncer de próstata. **(73)**

A pesar de la evidencia de estudios acerca del papel potencial de CYP1B1 en la etiología del cáncer de próstata son pocos los estudios que han evaluado la asociación de los polimorfismos genéticos *CYP1B1* con el riesgo de cáncer de próstata. No se había encontrado asociación estadística significativa entre los polimorfismos de *CYP1B1* y el riesgo de este padecimiento, sin embargo, en este estudio observó a través del 61 muestras confirmadas y 20 que la asociación de la presencia de estos polimorfismos juegan un papel importante en el riesgo de desarrollar esta enfermedad.

La importancia funcional de la *Val*⁴³² *Leu* polimorfismo no se ha estudiado adecuadamente no obstante los cambios de nucleótidos pueden ser importantes para la función de la enzima correspondiente. Bailey *et al.* informó que los pacientes caucásicos con el genotipo *Val / Val* tenían un porcentaje significativamente mayor de cáncer de próstata, lo que sugiere que este polimorfismo puede ser funcionalmente importante para la expresión de los receptores de esteroides en esta enfermedad. Debido a que el pronóstico de ER / PR-positivo de cáncer es mejor que la ER / PR negativo del cáncer, estudios caso-control incluyendo casos prevalentes pueden ser subjetivas a un sesgo de supervivencia. En otras palabras, el genotipo *Val / Val* pueden ser representados en los casos prevalentes, que puede atenuar la asociación positiva, en su caso, con el genotipo *Leu / Leu*. No se ha reportado actualidad directamente la asociación de *CYP1B1* genotipos con diferentes subtipos de cáncer no obstante el que su expresión parece ser importante en el desarrollo de esta enfermedad **(74)**.

Comúnmente los estudios de riesgo incorporan un pequeño número de factores clínicos que se asocian con la progresión y tratamiento de la enfermedad, no obstante la predicción puede variar de un caso a otro, sin embargo para tener una predicción de dichos factores asociados es de vital importancia la recaudación de bases de datos para evitar la causalidad cuando los datos son retrospectivos. La importancia de los factores genéticos en estos tipos de predicciones son complejos para ser apreciados y ejemplificados de manera individual. De tal manera que podemos tener una perspectiva específica de las variables moleculares genéticas una vez que las mismas han sido estudiadas de manera independiente. Estos estudios tienen una gran cantidad de asociaciones

genéticas pero aun su significancia clínica esta en debate ya que no solo intervienen los factores genéticos si no que intervienen una gran cantidad de factores para argumentar la individualidad de sus efectos. Por lo que para explorar genéticamente estos factores se deben de considerar tanto la parte molecular, así como los mecanismos de los mismos y los factores que están influyendo en estos para idealizar los modelos de predicción. Finalmete tenemos que mirar u observar en un posible futuro clínico de implementación de los riesgos genéticos en estas predicciones.(75)

Las limitaciones metodológicas de este estudio fueron pocas. La tasa de incidencia de este padecimiento fue alta, minimizando el potencial sesgo de selección que es común a muchos estudios caso-control tal como lo muestran nuestros índices de confiabilidad siendo estos congruente con los reportes de Floriano et al (76). De la misma manera no se consideran los factores que pudieran sesgar nuestros resultados debido al origen étnico ya que los polimorfismos en estudio no han sido correlacionados con el cáncer de próstata para la población y no obstante de que el tamaño de muestra no fue muy grande la estimación del riesgo es confiable tal como lo muestran los datos obtenidos mediante el análisis estadístico de ODDS y RR siendo estos consistentes con investigaciones realizadas en otras poblaciones, lo que implica un papel importante de los polimorfismos de los citocromos CYP1B1 y CYP2W1 en la etiología del cáncer de prostata.

Nuestros resultados son por lo tanto biológicamente plausibles y merecen una investigación adicional con un mayor tamaño de muestra, en otras poblaciones étnicas y atendiendo a la mayor cantidad posible de hospitales que tengan areas clínicas en las que se atienda a la población que inicie o tenga plenamente diagnosticado el padecimiento estudiado en la presente investigación.

O.- CONCLUSIONES.

1. El polimorfismo rs 56339482 +1103 G/C del citocromo CYP1B1 es determinante para el padecimiento del cáncer de próstata.
2. La presencia del polimorfismo rs 3808348 +7021 G/A del citocromo CYP2W1 ocasiona el doble de riesgo de padecer cáncer de próstata.
3. Los polimorfismos de los citocromos CYP1B1 (rs 56339482) y CYP2W1 (rs 3808348) pueden ser utilizados como indicadores para el diagnóstico temprano CaP.

BIBLIOGRAFIA.

1. Biología Molecular e Ingeniería Genética Luque José, Herráez Ángel. Ed. Harcourt, 10ª ED. 2009 pp.410-412.
2. Biología Molecular en el Cancer de Prostata, Marco Antonio Arap, Arch. Esp. Urol. 2010; 63 (1): 1-9.
3. Identifying Susceptibility Genes for Prostate Cancer—A Family-Based Association Study of Polymorphisms in CYP17, CYP19, CYP11A1, and LH-b Julie A. Douglas,¹ Kimberly A. Zuhlke,² Jennifer Beebe-Dimmer,^{2,3} Albert M. Levin,¹ Stephen B. Gruber,^{1,2,4} David P. Wood,^{2,3} and Kathleen A. Cooney^{2,3} Departments of ¹Human Genetics, ²Internal Medicine, ³Urology, and ⁴Epidemiology, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan
4. Genetic Polymorphisms in CYP17, CYP3A4, CYP19A1, SRD5A2, IGF-1, and IGFBP-3 and Prostate Cancer Risk in African-American Men: The Flint Men's Health Study Aruna V. Sarma., Rodney L. Dunn, Leslie A. Lange, Anna Ray, Yunfei Wang, Ethan M. Lange, and Kathleen A. Cooney, Prostate. 2008 February 15; 68(3): 296–305
5. Prostate cáncer risk and polymorphism in 17 hidroxilase (CYP17) and steroid reductase (SRD5A2)., Ruth M. Lunn, Douglas A. Bell, James L. Mohler and Jack A. Taylor., Carcinogenesis, vol. 20, no. 9 pp. 1727-1731, 1999.
6. Molecular pathology of prostate cancer. C. Hughes, A. Murphy, C. Martin, O. Sheils, O. O'Leary. Review., J. Clin. Path. 2005. 673-681
7. SSA, DGIS, Egresos hospitalarios, 2006. Base de datos, Procesó INEGI. INEGI estadísticas demográficas 2006. Edición 2007.
8. Programa de Acción para la Prevención y Control del Cáncer de Próstata, Programa Nacional de Salud 2001-2006 Registro histopatológico en México / DGE. Elaborado por el Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica / SSA.
9. **INEGI.** Estadísticas vitales, 2007. Base de datos. CONAPO. Proyecciones de la población de México, 2005-2050.
10. Human Prostate Cancer Risk Factors., David G. Bostwick, M.D. Harry B. Burke, M.D., Ph.D. Daniel Djakiew, Ph.D. Susan Euling, Ph.D. Shuk-mei Ho, Ph.D. Joseph Landolph, M.D., Ph.D. Howard Morrison, Ph.D. Babasaheb Sonawane, Ph.D. Tiffany Shifflett, David J. Waters, D.V.M., Ph.D. Barry Timms, Ph.D. CANCER Supplement November 15, 2004 / Volume 101 / Number 10
11. Factores de riesgo al cáncer. Instituto Nacional del Cáncer EEUU.
12. <http://www.nlm.nih.gov/> <http://www.salud.com>
13. Merayo-Chalico Claudio E, Sánchez-Turati Gustavo J, Santana-Ríos Zael, Pérez-Becerra Rodrigo, Saavedra- Briones Dorian V, Morales-Montor Jorge G,

Pacheco-Gahbler Carlos, Calderón-Ferro Francisco. Prevalencia del cáncer de próstata incidental en el Hospital General Dr. Manuel Gea González; 20 años de revisión. División de Urología, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", México D.F.

14. RoCHAT, B. y cols. (2001) Human CYP1B1 and anticancer agent metabolism: mechanism for tumor-specific drug inactivation? *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 296, 537–541.
15. Consenso Nacional Inter-Sociedades sobre Pautas para el Diagnóstico y Tratamiento del Cáncer de Próstata, Sociedad Argentina de Cancerología, Sociedad Argentina de Urología, Julio 2005
16. Grading prostate cancer. Bostwick DG. *Am J Clin Pathol.* 1994 Oct;102 (4 Suppl 1):S38-56.
17. Basic concepts in the molecular biology of cancer. Genetic susceptibility
18. J. García-Foncillas, E. Bandrés, V. Catalán, F. García Amigot, N. Zabalegui. *ANALES Sis San Navarra* 2001, Vol. 24, Suplemento 1.
19. Use of classical and novel biomarkers as prognostic risk factors for localised prostate cancer: a systematic review. P Sutcliffe, S Hummel, E Simpson, T Young, A Rees, A Wilkinson, F Hamdy, N Clarke and J Staffurth. *Health Technology Assessment* 2009; Vol. 13: No. 5
20. Therapeutic strategy for prostate specific antigen (PSA) failure after radical prostatectomy. Kinoshita H, Kamoto T, Mitsumori M, Kiyokawa T, Habuchi T, Kakehi Y, Hiraoka M, Ogawa O. *Gan To Kagaku Ryoho.* 2003 Jan;30(1):32-7.
21. Papel actual del antígeno prostático específico y otros marcadores en el diagnóstico del cáncer de próstata. F. Gómez Veiga, J. Ponce Reixa, A. Barbagelata López, E. Fernández Rosado y M. González Martín. *Arch. Esp. Urol.*, 59, 10 (1.069-1.082), 2006
22. Martínez NE, Castro M, Sánchez EF y cols: Marcador molecular relacionado con cáncer de próstata: superóxido dismutase-1 (SOD-1), una enzima antioxidante; *Col. Uro. Nac. A.C* 2008; 23[3]: 78-83.
23. Emerging Biomarkers for the Diagnosis and Prognosis of Prostate Cancer, Girish Sardana, Barry Dowell and Eleftherios P. Diamandis, *Clinical Chemistry* 54:12 1951–1960 (2008)
24. Drake PR, Vogl PW, Mitchell AW: *Gray's Anatomy For students.* Churchill Livingstone, 2009: 409-410.
25. Hammerich KH, Ayala EG, Wheeler MT: *Anatomy of the prostate gland and surgical, pathology of prostate cancer, USA,* New York Cambridge University Press, 2009: 1 -10.
26. Genesser F: *Histología, tercera edición.* Ed. Panamericana, 2000: 657-658

27. POLIMORFISMOS DE CITOCROMO P450: PAPEL COMO MARCADOR BIOLÓGICO C. Santiago, F. Bandrés y F. Gómez-Gallego. *Medicina del Trabajo*, 11, 3, mayo-junio 2002 (130-140).
28. Structural diversity of cytochrome P450 enzyme system Tsuneo Omura. *J. Biochem.* 2010;147(3):297–306
29. <http://minf.vub.ac.be/~fabi/edu/3degraad/HIV/cytochrome.html>
30. El citocromo P-450 y la respuesta terapéutica a los antimaláricos. Guzmán V, Carmona-Fonseca J. *Rev Panam Salud Publica.* 2006;19(1):9-22 Volume 19 (1) | January 31, 2006 | page(s) 9-22
31. Targeting Cytochrome P450 Enzymes: A New Approach in Anticancer
32. Drug Development. Robert D. Bruno and Vincent C.O. Njar. *Bioorg Med Chem.* 2007 August 1; 15(15): 5047–5060.
33. Targeting Cytochrome P450 Enzymes: A New Approach in Anticancer Drug Development. Robert D. Bruno and Vincent C. O. Njar. *Bioorg. Med. Chem.* 2007 August 1;15(15): 5047-5060.
34. Polimorfismos genéticos:Importancia y aplicaciones. MARCO ANTONIO CHECA CARATACHEA, *REV INST NAL ENF RESP MEX. VOLUMEN 20 - NÚMERO 3 JULIO-SEPTIEMBRE 2007 PÁGINAS: 213-221*
35. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Raquel Iniesta, Elisabet Guinó, Víctor Moreno, *Gac Sanit v.19 n.4 Barcelona jul.-ago. 2005*
36. POLIMORFISMO GENÉTICO, Alberto Gómez Gutiérrez, Ins. *Genética Humana*
37. *Fac. Med.Pontificia Universidad Javeriana*
38. Association of the CYP1B1*3 allele with survival in patients with prostate cancer receiving docetaxel. Tristan M. Sissung, Romano Danesi, Douglas K. Price, Seth M. Steinberg, Ronald de Wit, Muhammad Zahid, Nilesh Gaikwad, Ercole Cavalieri, William L. Dahut, Dan L. Sackett, William D. Figg, and Alex Sparreboom. *Mol Cancer Ther* 2008;7(1). January 2008.
39. CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians Joke Beuten, Jonathan A.L.Gelfond, John J.Byrne, Ivana Balic, AnaLisa C.Crandall, Teresa L.Johnson-Pais, Ian M.Thompson, DouglasK.Price and Robin J.Leach. *Carcinogenesis* vol.29 no.9 pp.1751–1757, 2008
40. Análisis estadístico de polimorfismos genéticos en estudios epidemiológicos. Raquel Iniestaa, Elisabet Guinóa y Víctor Morenoa, *Gac Sanit v.19 n.4 Barcelona jul.-ago. 2005*
41. Cytochrome P450 1B1Is Overexpressed and Regulated by Hypomethylation in Prostate Cancer Takashi Tokizane, Hiroaki Shiina, Mikio Igawa, Hideki Enokida, Shinji Urakami, Toshifumi Kawakami, Tatsuya Ogishima, Steven T. Okino, Long-

Cheng Li, Yuichiro Tanaka, Norio Nonomura, Akihiko Okuyama, and Rajvir Dahiya. *Clin Cancer Res* 2005;5793 11(16) August 15, 2005

42. Genetic Polymorphism of Cytochrome P450–1B1 and Risk of Breast Cancer, Wei Zheng,² Da-Wen Xie, Fan Jin, Jia-Rong Cheng, Qi Dai, Wan-Qing Wen, Xiao-Ou Shu, and Yu-Tang Gao. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, Vol. 9, 147–150, February 2009.
43. Single and concerted effects of benzo[a]pyrene and flavonoids on the AhR and Nrf2-pathway in the human colon carcinoma cell line Caco-2. Jeanette Niestroy, Alfonso Barbara, Kathrin Herbst, Sandra Rode, Manuela van Liempt, Peter H. Roos *Toxicology in Vitro* 25 (2011) 671–683.
44. Genetic polymorphism in cytochrome P450 1B1 in a Spanish population. Pérez-Cadahía B, Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Toxicology Unit, University of A Coruña, Spain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007 Jul;101(1):70-2.
45. Target validation of cytochrome P450 CYP1B1 in prostate carcinoma with protein expression in associated hyperplastic and premalignant tissue Dawn M. Carnell, Rowena E. Smith, M. Daley, Paul R. Barber, D. Peter J. Hoskin George D. Wilson Graeme I. Murray. and Steven A. *International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics* Volume 58, Issue 2, 1 February 2004, Pages 500-509
46. Polymorphisms in the CYP1B1 gene are associated with increased risk of prostate cancer. BL Chang. , SL Zheng, SD Isaacs, AR Turner, GA Hawkins , KE Wiley , ER Bleecker PC Walsh, DA Meyers, WB Isaacs and J Xu*, *British Journal of Cancer* (2003) 89, 1524 – 1529
47. Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls. Tang YM, Green BL, Chen GF, Thompson PA, Lang NP, Shinde A, Lin DX, Tan W, Lyn-Cook BD, Hammons GJ, Kadlubar FF. *Pharmacogenetics*. 2000 Dec;10(9):761-6.
48. P450 metabolites of arachidonic acid in the control of cardiovascular function. Roman R. *J. Physiol Rev*. 2002; 82:131-185
49. Novel extrahepatic P450 enzymes with emphasis on the tumor specific CYP 2W1. Karlgren M. Department of physiology and pharmacology, section of pharmacogenetics, Karoliska Institutet, 2007
50. Tumour-specific expression of CYP2W1: its potential as a drug target in cancer therapy, Karlgren M., Ingelman-Sundberg M 2007; 11: 61- 67
51. CYP2W1 variant alleles in Caucasians and association of the CYP2W1 G541A (Ala181Thr) polymorphism with increased colorectal cancer risk. Guillermo Gervasini†1, Silvia Gonzalez de Murillo1, Jose M Ladero2 & Jose AG Agúndez1.
52. *Pharmacogenomics* July 2010, Vol. 11, No. 7, Pages 919-925 ,

53. Genetic Polymorphisms and Haplotype Structures of the Human CYP2W1 Gene in a Japanese Population Yoshiyuki Hanzawa, Takamitsu Sasaki, Michinao Mizugaki, Masaaki Ishikawa, and Masahiro Hiratsuka. *DMD* 36:349–352, 2008.
54. Expression of CYP2W1 in colon tumors: regulation by gene methylation. Alvin Gomez, Maria Karlgren, David Edler, Maria Luisa Bernal, Souren Mkrtchian and Magnus Ingelman-Sundberg *Pharmacogenomics* 8(10):1315-25 (2007)
55. The expression of the novel CYP2W1 enzyme is an independent prognostic factor in colorectal cancer - a pilot study. David Edler, Kristina Stenstedt, Katarina Ohrling, Marja Hallström, Maria Karlgren, Magnus Ingelman-Sundberg and Peter Ragnhammar *Eur J Cancer* 45(4):705-12 (2009)
56. Tumor-specific expression of the novel cytochrome P450 enzyme, CYP2W1
57. Maria Karlgren, Alvin Gomez, Katarina Stark, Jenny Svärd, Cristina Rodriguez-Antona, Ernst Oliw, Maria Luisa Bernal, Santiago Ramón y Cajal, Inger Johansson, Magnus Ingelman-Sundberg. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Volume 341, Issue 2, 10 March 2006, Pages 451-458
58. Development of a high-resolution melting method for the detection of hemoglobin alpha variants Hung-Chang Shih c,d,f, Tze-Kiong Er b,e, Tien-Jye Chang c, Ya-Sian Chang, Ta-Chih Liu a,b,e, Jan-Gowth Chang, *Clinical Biochemistry* 43 (2010) 671–676
59. Amplicon DNA Melting Analysis for Mutation Scanning and Genotyping: Cross-Platform Comparison of Instruments and Dyes, Mark G. Herrmann, Jacob D. Durtschi, L. Kathryn Bromley, Carl T. Wittwer, and Karl V. Voelkerding. *Clinical Chemistry* 52:3 494–503 (2006)
60. Identifying Common Genetic Variants by High-Resolution Melting. Joshua G. Vandersteen, Pinar Bayrak-Toydemir. *Clinical Chemistry* 53:7, 1191–1198 (2007)
61. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer, datos nacionales.
62. INEGI, 2010
63. Prostate Cancer Epigenetics: A Review on Gene Regulation, Lena Diaw, Karen Woodson and John W. Gillespie, *Gene Regulation and Systems Biology* 2007:1 313–325
64. Adenocarcinoma de próstata gleason clínico 8-10: influencia pronóstica en la supervivencia libre de progresión bioquímica. Rioja Zuazu J, Zudaire Berbera JJ, Rincón Mayans A, Rosell Costa D, Robles Garcia JE, Berian Polo JM. *ACTAS UROLÓGICAS ESPAÑOLAS SEPTIEMBRE 2008*
65. Karlgren M., Ingelman-Sundberg M. Tumour-specific expression of CYP2W1: its potential as a drug target in cancer therapy, 2007; 11: 61- 67
66. Polimorfismo del citocromo p450 1b1 como factor de riesgo para el cáncer de próstata: frecuencia del alelo (+1103 g/c) en una población mexicana”, Lydia Guerra López, Diana Cruz Chávez, Dulce Uicab Jiménez, Secretaría De La

67. Genetic polymorphism in cytochrome P450 1B1 in a Spanish population. Pérez-Cadahía B, Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Toxicology Unit, University of A Coruña, Spain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007 Jul;101(1):70-2.
68. CYP1B1 variants are associated with prostate cancer in non-Hispanic and Hispanic Caucasians, Joke Beuten, Jonathan A.L.Gelfond, John J.Byrne, Ivana Balic, AnaLisa C.Crandall, Teresa L.Johnson-Pais, IanM.Thompson, DouglasK.Price and Robin J.Leach (2008).. *Carcinogenesis* vol.29 no.9 pp.1751–1757.
69. Neoplasias intraepiteliales prostáticas. Marcadores Tumorales más relevantes y su relación con el adenocarcinoma prostático. Celia María Pereda Meira, Isbel García Figueredo. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, *Rev Cubana Oncol* 1999;15(3):208-15
70. Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A, Dahiya R. department of urology, Veterans Affairs Medical Center and University of California, San Francisco, California 94121, USA. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5793-801.
71. Cicek M.S., Liu X., Casey G., Witte J.S. Role of androgen metabolism genes CYP1B1, PSA/KLK3, and CYP11alpha in prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Sep; 14(9):2173-2.
72. Genetic polymorphism in cytochrome P450 1B1 in a Spanish population. Pérez-Cadahía B, Valdiglesias V, Pásaro E, Méndez J, Laffon B. Toxicology Unit, University of A Coruña, Spain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2007 Jul;101(1):70-2.
73. Tang YM, Green BL, Chen GF, et al. Human CYP1B1 Leu432Val gene polymorphism: ethnic distribution in African-Americans, Caucasians and Chinese; oestradiol hydroxylase activity; and distribution in prostate cancer cases and controls. *Pharmacogenetics* 2000;10:761 – 6.
74. Cytochrome P450 1B1 is overexpressed and regulated by hypomethylation in prostate cancer department of urology, Veterans Affairs Medical Center and University of California, San Francisco, California 94121, USA Tokizane T, Shiina H, Igawa M, Enokida H, Urakami S, Kawakami T, Ogishima T, Okino ST, Li LC, Tanaka Y, Nonomura N, Okuyama A, Dahiya R. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5793-801.

75. Karlgren M., Novel extrahepatic P450 enzymes with emphasis on the tumor specific CYP 2W1. Department of physiology and pharmacology, section of pharmacogenetics, Karoliska Institutet, 2007
76. Expression of CYP2W1 in colon tumors: regulation by gene methylation, Alvin Gomez, **Maria**, Karlgren, **David**, Edler, Maria Luisa Bernal, Souren, Mkrtchian & Magnus Ingelman-Sundberg. Pharmacogenomics. October 2007, Vol. 8, No. 10, Pages 1315-1325 , DOI 10.2217/14622416.8.10.1315
77. Prostate Cancer Epigenetics, Lena Diaw, Karen Woodson and John W. Gillespie. Gene Regulation and Systems Biology 2007:1
78. Hanzawa Y, Sasaki T, Mizugaki M, Ishikawa M, Hiratsuka M. Genetic polymorphisms and haplotype structures of the human CYP2W1 gene in a Japanese population. Drug Metab Dispos, 2008; 36(2):349-52.
79. Asociación del polimorfismo genético en el citocromo P450 (CYP) 1A1, con el riesgo de cáncer de próstata familiar en una población japonesa: un estudio caso-control. Kazuhiro Suzuki Kazuhiro Suzuki , Hiroshi Matsui , Hiroshi Matsui , Haruki Nakazato , Haruki Nakazato , Hidekazu Koike , Hidekazu Koike , Hironobu Okugi , Hironobu Okugi , Masaru Hasumi , Masaru Hasumi. Cancer Letters, 3 Volumen 195, Número 2 , 10 de junio de 2003, Páginas 177-183.
80. Genetic Polymorphisms and Haplotype Structures of the Human *CYP2W1* Gene in a Japanese Population. Yoshiyuki Hanzawa, Takamitsu Sasaki, Michinao Mizugaki, Masaaki Ishikawa, and Masahiro Hiratsuka. DRUG METABOLISM AND DISPOSITION Vol. 36, No. 2
81. Papel del antígeno prostático específico y otros marcadores en el diagnóstico del cáncer der próstata. F. Gomez Veiga, J, Ponce Reixa, A. Barbagelata López, E. Fernández Rosado y M. González Martín, Arch. Esp. Urol., 59,10 (1.069-1.082), 2006
82. Polimorfismo del citocromo P450 2W1 7021 G>A como factor de riesgo para el cáncer de próstata en una población mexicana. Esaú Floriano Sánchez, Noemí Cárdenas Rodríguez, Cindy Rodríguez Bandala, Melchor Castro Marin. AMUAC, Vol, XXVI.2 Mayo-Agosto 2011.