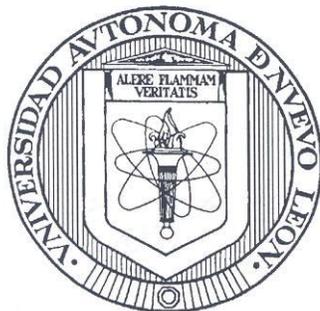


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**ANÁLISIS DE REARREGLOS GENÓMICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA  
AGRESIVO**

**Por**

**Q.C.B. SERGIO ANDRÉS CÁRDENAS CADENA**

**Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con orientación  
terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética**

**Diciembre 2010**

**ANÁLISIS DE REARREGLOS GENÓMICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA  
AGRESIVO**

Aprobación de la tesis:

---

**DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ**  
Director de Tesis

---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Co-Director de Tesis

---

**DR. LAURO GÓMEZ GUERRA**  
Co-Director de Tesis

---

**DR. med. JUAN O GALINDO GALINDO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

## RESUMEN

**Estudiante:** Q.C.B. Sergio Andrés Cárdenas Cadena

**Universidad Autónoma de Nuevo León**

**Facultad de Medicina**

**Título del estudio:** ANÁLISIS DE REARREGLOS GENÓMICOS EN CÁNCER DE PRÓSTATA AGRESIVO.

**Número de páginas:** 70.

**Candidato para titulación de:** Maestría en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

**Introducción:** El cáncer de próstata (CaP) representa un reto clínico debido a la carencia de biomarcadores de evolución tumoral. Sin los cuales, se dificulta definir si un tumor recién diagnosticado permanecerá localizado o cursará de manera agresiva y letal.

**Objetivo:** Identificar marcadores genómicos que permitan desde el diagnóstico, predecir el comportamiento agresivo o no de una neoplasia prostática localizada.

**Material y Métodos:** En este trabajo se realizaron dos tipos de estudio: Un estudio prospectivo para la búsqueda la fusión TMPRSS2:ERG, utilizando la técnica de qPCR, en muestras de tejido prostático fresco de pacientes con diagnóstico reciente de CaP (n=20 casos) y en tejidos de próstata de sujetos sin CaP (n=5 controles). El otro fue un análisis retrospectivo, mediante aCGH, de muestras de tejido prostático embebido en parafina, de CaP metastásico (n=15 casos) y CaP no metastásico (n=8 controles).

**Resultados:** a) Los estudios de la fusión TMPRSS2:ERG mostraron que ésta estuvo presente en el 75% de los casos y se observó una tendencia a correlacionar positivamente al grado Gleason del paciente y a la intensidad de la señal observada en la qPCR b) El análisis por aCGH permitió desarrollar un perfil genómico de 60 clonas/regiones que clasifican el CaP en agresivo o no agresivo en un 70% de los casos. Destacando, la ganancia de regiones donde se localizan los genes TERT, MYC, SSTR5, DDEF1 y la pérdida de regiones donde se localiza EPB41L3, DACH1, asociadas todas éstas a una modalidad agresiva de CaP

**Discusión:** Es claro que la relación entre la presencia de la fusión TMPRSS2:ERG y el grado Gleason tomaría mayor peso estadístico aumentando el número de muestra. Las regiones de pérdida o ganancia de material genético que nosotros identificamos, han sido asociadas a CaP por otros investigadores. Los resultados nos permiten inferir que a pesar del alto grado de heterogeneidad del CaP, existen ciertas regiones de pérdida y ganancia dentro del genoma tumoral que se pueden asociar con su agresividad.

**Conclusión:** Este trabajo marca el inicio de una clasificación del CaP basada en perfiles genómicos y abre las puertas a futuras investigaciones, ya que es el primer trabajo de este tipo realizado en nuestra población. Permitted una caracterización global de las alteraciones genómicas presentes en tejido prostático tumoral con lo cual se pudo desarrollar lo que consideramos hoy en día el primer perfil genómico clasificador de CaP capaz de distinguir un tumor no agresivo de uno agresivo con una tasa de error de clasificación de 0.3, con el fin de hacer el diagnóstico más preciso y de esta manera ajustar las modalidades terapéuticas a las necesidades del paciente mejorando así su calidad de vida.

Firma del Asesor:

Firma del Co-asesor:

---

**DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ**

---

**DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente el esfuerzo y la dedicación que mi madre, **Jackeline Cadena Sarmiento**, me ha brindado durante todo este proceso, pero sobre todo por su amor incondicional que ha hecho de mi lo que soy.

A los doctores **Rocio Ortíz López, Augusto Rojas Martínez y Lauro Gómez Guerra**, Muchas gracias por sus consejos siempre tan apropiados, por su inmensa paciencia y principalmente por compartir su sabiduría para el bien de la humanidad.

A los doctores **Robin J. Leach, Raquel Garza, Marco Ponce, Yohann Grondin, Yamil López, Margarita Martínez, Daniel Cervantes, Ivan Marino, Jorge Lara, Jesus Ancer Rodriguez, Juan O Galindo**, muchas gracias por sus observaciones siempre tan puntuales y su gran apoyo.

A los doctores **Morgan y R. Lockhart** (long life is not enough my friends)

A todos aquellos quienes de una u otra forma participaron e hicieron posible la obtención de este grado: **Jaz, Mag, Giss, Goyo, Dante, Gloria, Adelina, Idalia, Citalán, Arturo, Alí, Richard**, grandes compañeros de trabajo e incondicionales amigos. **Doctor y doctora Amaru**, gracias por satisfacer mis necesidades científicas tan apropiadamente. **Diana Marcela y Milena Andrea** que siempre están en mi corazón (las quiero mucho hermanitas). **CONACYT** como no agradecerte.

Muchas gracias a todos.

Por último quisiera agradecer de manera muy especial a un excelente maestro que siempre estuvo “al pie del cañón” apoyándome ciega e incondicionalmente, quien en alguna ocasión me dijo que yo era un tipo con mucha suerte, y creo que gran parte de esa suerte fue haber tenido el placer de ser su alumno. Muchas gracias **Dra. Herminia Martínez**.

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
1.1 CANCER DE PRÓSTATA (CaP).	1
1.1.1 Diagnóstico de CaP.	3
1.1.1.2 APE.	3
1.1.2 Clasificación y tratamiento del CaP	4
1.1.2.1 Grado Gleason	4
1.1.2.2 Clasificación Tumor Nódulo Metástasis (TNM)	5
1.1.3 Estadios del CaP	6
1.1.3.1 Estadio I (A1)	6
1.1.3.2 Estadio II (A2, B1 o B2)	6
1.1.3.3 Estadio III (C)	6
1.1.3.4 Estadio IV (D1 o D2)	6
1.1.4 Tipos de CaP	7
1.1.5 CaP en México	9
1.1.6 Hibridación genómica comparativa (CGH) en CaP	11
1.1.7 Gen fusión Tmprss2:ERG	12
1.2 JUSTIFICACIÓN	15

1.3 ABORDAJE	16
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
2.1 OBJETIVO GENERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
2.3 METAS	18
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>19</b>
3.1 MATERIAL	19
3.1.1 Área de trabajo	19
3.1.2 Material biológico	19
3.1.3 Reactivos químicos	20
3.1.3.1 Extracción de DNA	20
3.1.3.2 Extracción de RNA	20
3.1.3.3 Retrotranscripción	20
3.1.3.4 Reaccion en cadena de la polimerasa en tiempo real (PCR- TR)	20
3.1.4 Material de laboratorio	20
3.1.4.1 Toma de muestra de sangre periférica	20
3.1.4.2 Extracción de DNA	21
3.1.4.3 Extracción de RNA	21
3.1.4.4 PCR – TR	21

3.1.5 Equipo	21
3.1.5.1 Extracción de DNA y RNA	21
3.1.5.2 Cuantificación de DNA, RNA y cDNA	21
3.1.5.3 Retrotranscripción	22
3.1.5.4 PCR-TR	22
3.1.6 Fuentes en red y Programas computacionales	22
3.1.6.1 Análisis de secuencias	22
3.1.6.2 Cuantificación de DNA	22
3.1.6.3 Arreglos de CGH (aCGH)	22
3.1.6.4 PCR-TR	22
3.2. MÉTODOS	23
3.2.1 Estrategia general de trabajo	23
3.2.1.1 Análisis retrospectivo	23
3.2.1.2 Análisis prospectivo	24
3.2.2 Selección de muestras	25
3.2.2.1 Criterios de inclusión	25
3.2.2.2 Criterios de exclusión	25
3.2.3 Diseño del estudio	25
3.2.4 Análisis de aCGH	26
3.2.4.1 Colección de muestras	26
3.2.4.2 Procesamiento de las muestras	26
3.2.4.3 interpretación de resultados	27
3.2.5 Búsqueda de Tmprss2:ERG por PCR-TR	28

3.2.5.1 Colección de muestras	28
3.2.5.2 Evaluación del tejido criopreservado	29
3.2.5.3 Aislamiento del RNA	30
3.2.5.4 Retrotranscripción	30
3.2.5.5 PCR-TR	30
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
4.1 ANÁLISIS DE aCGH	31
4.2 BÚSQUEDA DE TMPRSS2:ERG POR PCR-TR	41
<b>5. DISCUSIÓN</b>	<b>46</b>
<b>6. CONCLUSIÓN</b>	<b>51</b>
<b>• REFERENCIAS</b>	<b>52</b>

## LISTA DE TABLAS

	<b>Tabla</b>	<b>Página</b>
<b>I.</b>	Clasificación TNM	5
<b>II.</b>	Diferencias entre CaP agresivo y no agresivo	8
<b>III.</b>	Muestras colectadas para el análisis prospectivo	29
<b>IV.</b>	Tabla de contingencia sin significancia estadística	38
<b>V.</b>	Tabla de contingencia con significancia estadística	38
<b>VI.</b>	Genes asociados a CaP	40
<b>VII.</b>	Datos clínicos de pacientes del análisis prospectivo	43
<b>VIII.</b>	Valores de grado Gleason y altura del pico analizados	44

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
1. Incidencia y Mortalidad de diferentes tipos de cáncer en hombres	2
2. Tasa de mortalidad por CaP	2
3. Examen digital del rect	3
4. Escala Gleason	4
5. Progresión del CaP	7
6. Principales causas de muerte en México	10
7. Incidencia y Mortalidad de diferentes tipos de cáncer en México	10
8. Locus de los genes ERG y TMPRSS2	12
9. Diagrama ilustrativo de aCGH	15
10. Estrategia general de trabajo para el análisis retrospectivo	23
11. Estrategia general de trabajo para el análisis prospectivo	24
12. Procesamiento de muestras para aCGH	27
13. Interpretación de señales en aCGH	28
14. Ilustración de la pérdida asociada a la fusión TMPRSS2:ERG	31
15. Ilustración de perfiles cromosómicos (cromosoma 1, 2, 3 y 4)	32
16. Gráfica del agrupamiento no supervisado	33
17. Error de clasificación (sin significancia estadística)	34
18. Error de clasificación (con significancia estadística)	35
19. Tasa de falsos positivos	36

<b>20. Probabilidad de predicción</b>	37
<b>21. Perfil genómico clasificador</b>	39
<b>22. Ensayos de PCR en tiempo real para la presencia de la fusión TMPRSS2:ERG</b>	42
<b>23. Gráfica de correlación entre grado Gleason y altura del pico</b>	44
<b>24. Gráfica corregida de correlación entre grado Gleason y altura del pico</b>	45
<b>25. Gráfica de correlación entre APE sérico y altura del pico</b>	45

## NOMENCLATURA

<b>μL</b>	Microlitro
<b>aCGH</b>	microarreglos de hibridación genómica comparativa
<b>APE</b>	Antígeno prostático específico
<b>BTR</b>	Biopsia transrectal
<b>CaP</b>	Cáncer de próstata
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucleico complementario
<b>CIDCS</b>	Centro de Investigación y desarrollo en Ciencias de la Salud
<b>CMDX</b>	Combimatrix Molecular Diagnostics
<b>CNV</b>	Variación en el número de copias
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNAg</b>	Ácido desoxirribonucleico genómico
<b>EDR</b>	Examen digital del recto
<b>HPB</b>	Hiperplasia prostática benigna
<b>INEGI</b>	Instituto nacional de estadística, geografía e informática
<b>LEV</b>	Bajo volumen de elusión
<b>Mb</b>	Mega bases
<b>mL</b>	Mililitro
<b>Mpb</b>	Mega pares de bases
<b>NCBI</b>	Centro nacional de información biotecnológica
<b>OMS</b>	Organización mundial de la salud

<b>P(CaPa)</b>	Probabilidad de que el CaP sea agresivo
<b>P(CaPna)</b>	Probabilidad de que el CaP sea no agresivo
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PCR - TR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
<b>R<sup>2</sup></b>	Correlación lineal
<b>RHNM</b>	Registro histopatológico de neoplasias malignas
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RTUP</b>	resección transuretral prostática
<b>TNM</b>	Tumor Nodulo Metástasis
<b>UANL</b>	Universidad Autónoma de Nuevo León

## CAPÍTULO 1.

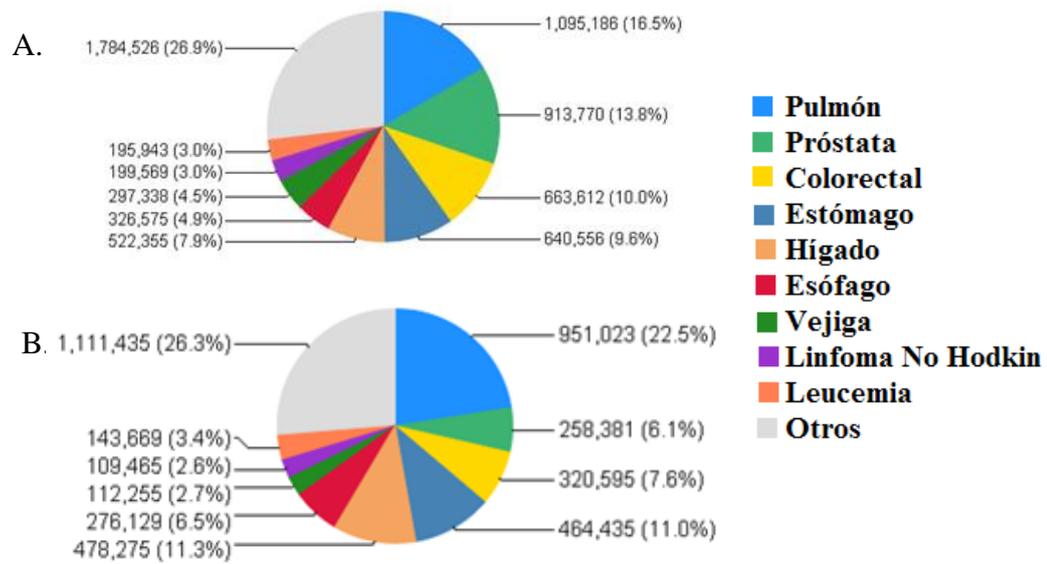
### INTRODUCCIÓN.

#### 1.1 CÁNCER DE PRÓSTATA (CaP).

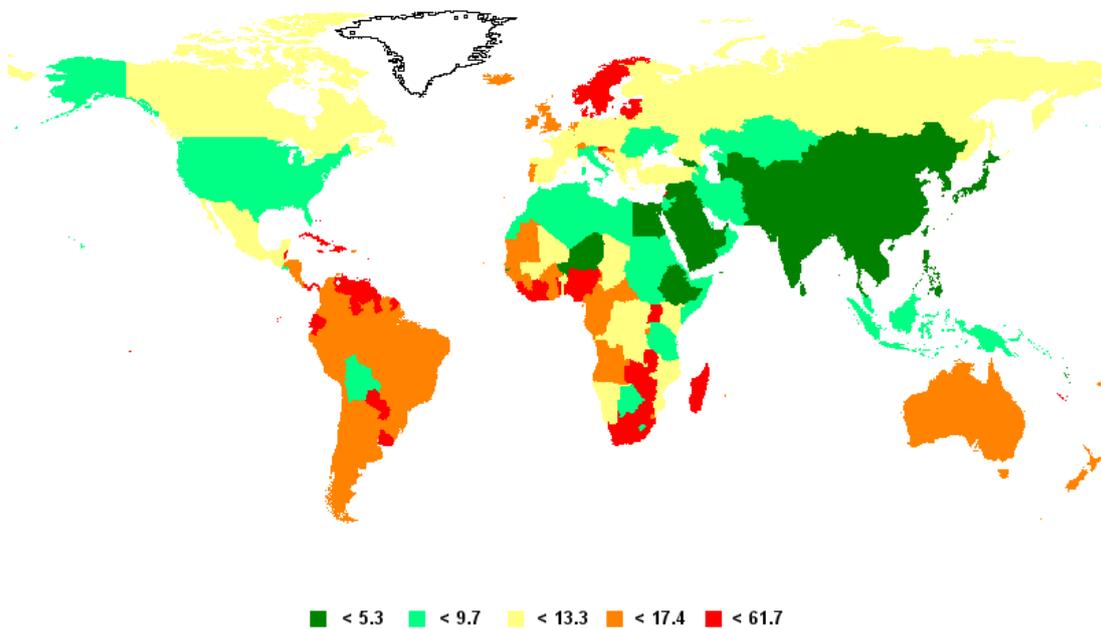
Es una enfermedad que afecta exclusivamente a los hombres, principalmente en edades avanzadas (88% mayores de 65 años). Es la segunda neoplasia maligna más frecuente y ocasiona cerca del 6% de las muertes por cáncer a nivel mundial (Figura 1) <sup>(1)</sup>. Ha sido asociado a factores tanto alimenticios (consumo excesivo de grasas animales), como étnicos (personas de raza negra tienen el doble de riesgo de contraer CaP que los caucásicos), pero nunca se ha descrito con claridad a que se debe su relación <sup>(2)</sup>. Existen diferencias significativas en las tasas de mortalidad, con una incidencia elevada en países escandinavos y cerca de 10 veces menor en países asiáticos, con tasas de 18.6 y 1.8/100,000 habitantes en Noruega y China respectivamente (Figura 2) <sup>(3,4)</sup>.

La asociación entre la actividad androgénica hormonal y el CaP ha sido ampliamente descrita. Se conoce que los varones con disgenesia testicular o eunucos, no desarrollan esta neoplasia <sup>(5-7)</sup>.

En sus primeras etapas, el CaP cursa de manera silenciosa y luego puede cursar con síntomas de naturaleza obstructiva, debido a la anatomía de la próstata (órgano primario afectado) ya que esta glándula rodea la uretra y el conducto eyaculatorio, por lo que en algunos casos el crecimiento tumoral reduce la luz de dichos conductos, impidiendo el flujo continuo de la orina y el semen, respectivamente (Figura 5) <sup>(8)</sup>.



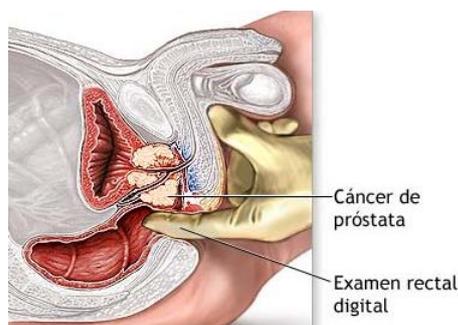
**Figura 1.** A) Incidencia y B) mortalidad mundial de diferentes tipos de cáncer en hombres <sup>(4)</sup>.



**Figura 2.** Tasa de mortalidad por CaP en 100,000 habitantes <sup>(4)</sup>.

### 1.1.1 Diagnóstico de CaP.

Para diagnosticar el CaP se requieren una serie de pruebas que van desde análisis serológicos, como determinación del antígeno prostático específico (APE), hasta exámenes donde el médico palpa las protuberancias provocadas por el CaP mediante el examen digital del recto (EDR) (Figura 3) y finalmente las pruebas confirmatorias, que constan de biopsias de tejido prostático como la biopsia transrectal (BTR) y transuretral (RTUP), en las cuales el tejido extraído es observado al microscopio por un histopatólogo quien definirá la presencia de tejido canceroso en la muestra analizada.

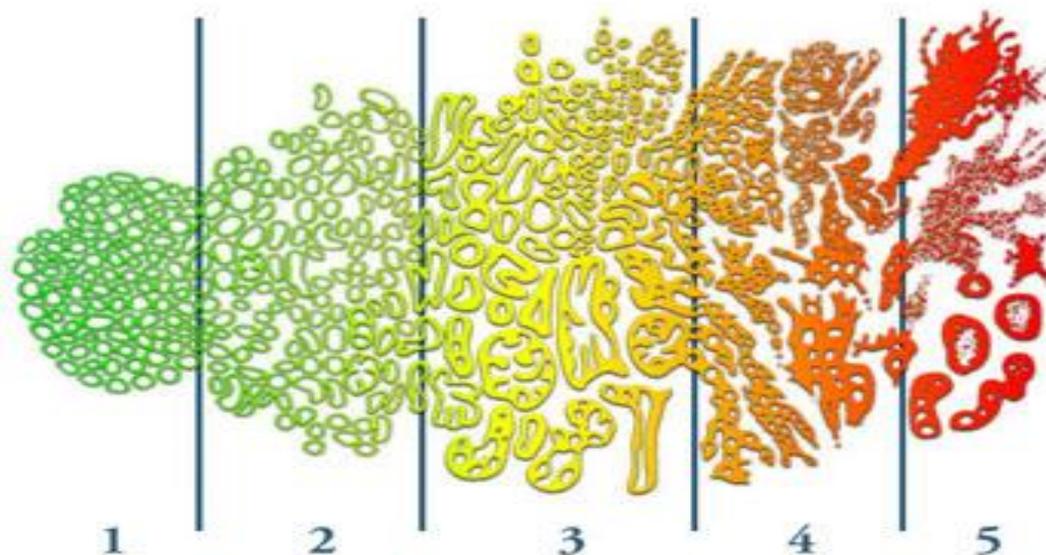


**Figura 3.** Examen digital del recto (EDR)

**1.1.1.1 El APE.** Es una glicoproteína clasificada como serín-proteasa<sup>(9)</sup>. Se produce en los epitelios ductal y acinar y es secretado principalmente, en el epitelio luminal de la glándula prostática. La determinación del APE mide la concentración del mismo en suero, donde se esperan valores bajos (< 4 ng/mL) en condiciones normales. Este valor se puede elevar por varias razones, entre ellas por el desarrollo de algún proceso neoplásico o en procesos normales de la vejez, como la hiperplasia prostática benigna (HPB). En otras palabras, el APE es órgano específico y no CaP específico, por lo cual en casos de valores sospechosos (> 4 ng/mL) se requieren más exámenes para confirmar el diagnóstico, siendo la BTR el más importante.

## 1.1.2 Clasificación y tratamiento del CaP.

**1.1.2.1 El Grado Gleason:** Este se refiere a un sistema descrito en 1974 por Donald Floyd Gleason y colaboradores<sup>10,11</sup>, el cual permite evaluar la arquitectura prostática y el grado de diferenciación de las células cancerosas presentes en la próstata. Consiste en asignarle un valor entero de 1 a 5 a la morfología y disposición celular, de tal forma que de los cinco patrones posibles, el menor valor (1) significa la mayor diferenciación de las células cancerosas (morfológicamente es lo más cercano a las células prostáticas normales) y el máximo valor (5) representa la menor diferenciación celular y se encuentra directamente relacionado con una presentación más agresiva del tumor. El grado Gleason final es la suma de los grados de los patrones de crecimiento primarios y secundarios más frecuentes y puede adquirir valores de 2 (1+1) a 10 (5+5) (Figura 4).



**Figura 4.** Grado Gleason según la arquitectura celular, diferenciación y disposición<sup>(10)</sup>.

**1.1.2.2 Clasificación Tumor Nódulo Metástasis (TNM).** Una clasificación ampliamente utilizada para determinar el estadio de la enfermedad es la clasificación TNM. Este sistema está basado en la evaluación de la extensión tumoral (T), la diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M), como se indica en la siguiente tabla (Tabla I).

<b>Tumor primario (T)</b>	
TX	El tumor primario no puede ser evaluado
T0	No hay evidencia de tumor primario
Tis	Carcinoma in situ (cáncer inicial que no se ha diseminado a tejidos vecinos)
T1, T2, T3, T4	Tamaño y/o extensión del tumor primario

<b>Ganglios linfáticos regionales (N)</b>	
NX	No es posible evaluar los ganglios linfáticos regionales
N0	No existe complicación de ganglios linfáticos regionales (no se encontró cáncer en los ganglios linfáticos)
N1, N2, N3	Complicación de ganglios linfáticos regionales (número y/o extensión de diseminación)

<b>Metástasis distante (M)</b>	
MX	No es posible evaluar una metástasis distante
M0	No existe metástasis distante (el cáncer no se ha diseminado a otras partes del cuerpo)
M1	Metástasis distante (el cáncer se ha diseminado a partes distantes del cuerpo)

**Tabla I.** Clasificación TNM y su respectivo significado <sup>(8)</sup>.



### 1.1.3 Estadios del CaP.

El CaP según su progresión puede dividirse en cuatro etapas o estadios (Figura 5).

**1.1.3.1 Estadio I (A1).** En este estadio el CaP se encuentra confinado exclusivamente en la próstata. No se puede palpar durante un EDR y no es visible mediante un examen por imágenes. Habitualmente se encuentra de manera accidental durante una cirugía programada por otras razones, como la HPB. Su grado Gleason es bajo ( $< 7$ ).

**1.1.3.2 Estadio II (A2, B1 o B2).** En este estadio, el CaP ocupa una mayor porción de la próstata, pero aún no se disemina fuera de ella. Su grado Gleason puede variar de 2 a 10.

**1.1.3.3 Estadio III (C).** En este estadio, el CaP se disemina más allá del margen externo de la próstata e invade tejidos cercanos, se puede encontrar en las vesículas seminales. El grado Gleason puede variar de 2 a 10.

**1.1.3.4 Estadio IV (D1 o D2).** En este estadio el CaP ha hecho metástasis a los ganglios linfáticos cercanos y lejanos a la próstata y a otros órganos, posiblemente vejiga, recto, hígado, pulmón y hueso, siendo este último el más frecuente. El grado Gleason puede variar de 2 a 10<sup>(11)</sup>.

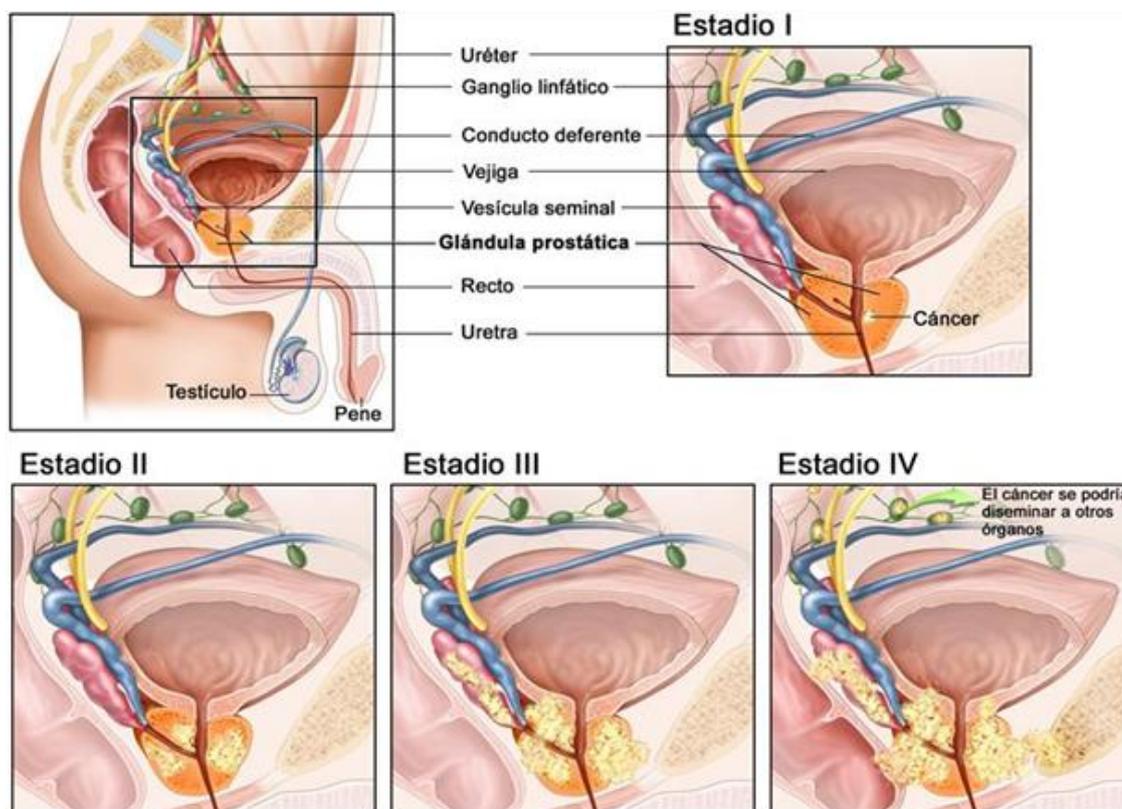


Figura 5. Se esquematiza la progresión del CaP desde el estadio 1 al IV<sup>(27)</sup>

#### 1.1.4 Tipos de CaP.

Tomando como parámetros la agresividad de su cuadro clínico y progreso tumoral, el CaP se puede separar en dos grupos: CaP agresivo y CaP no agresivo. En la mayoría de los casos, las células tumorales se mantienen en la próstata sin traspasar el margen prostático externo, facilitando su erradicación por medio de radioterapia o prostatectomía radical. En estos casos el CaP se mantiene en los estadios tempranos (I y II) y la presentación clínica varía desde indolora a molestias al orinar y eyacular. Después del tratamiento el paciente cuenta con un buen pronóstico de vida, y muy probablemente este tumor no será letal (CaP no agresivo). En un 30% de CaP recién diagnosticado, el tumor avanza rápidamente hasta el estadio IV (CaP agresivo) invadiendo otros órganos y se torna resistente a los tratamientos convencionales,

teniendo un curso fatal y muy pobre supervivencia a los 5 años después del diagnóstico (Tabla II.)

Característica	CaP No Agresivo	CaP Agresivo
<b>Cuadro clínico</b>	Asintomático - Dificultad al orinar, chorro débil, goteo	Sangrado al eyacular y orinar, dolor en cadera, testículos y músculos
<b>APE (generalmente)</b>	<10ng/mL	>20ng/mL
<b>Histología (Gleason)</b>	<u>Confinado</u> (3-6)	<u>Metástasis</u> (8-10)
<b>Pronóstico</b>	Curable	No es curable
<b>Tratamiento (basado en TNM)</b>	Prostatectomía	Paliativos
<b>Sobrevivencia</b>	90% más de 15 años	<5 años

**Tabla II.** Diferencias entre CaP agresivo y no agresivo <sup>(8)</sup>.

Existe en la actualidad un enorme debate sobre la conducta a seguir después del diagnóstico inicial de un CaP localizado o en etapas iniciales, que concierne a las elecciones terapéuticas a seguir (todas las cuales tienen alguna frecuencia de eventos adversos) o si es mejor realizar una vigilancia expectante. Todo lo anterior, tiene por supuesto, importantes implicaciones para la calidad de vida del paciente. Este dilema se creó a finales del siglo XX y se ha globalizado en la actualidad. Esto se debe principalmente al incremento en la detección temprana de CaP después del surgimiento del tamizaje del APE, las controversias aun no definidas sobre los valores mínimos de APE sérico para justificar biopsias de próstata y los lineamientos aun no claros para definir si un paciente debe ser sometido a terapia o ser sujeto de vigilancia expectante.



Los aspectos anteriores constituyen el centro de una importantísima discusión sobre el manejo temprano del CaP que no ha podido resolverse, pues aun no se cuenta con un método específico y sensible para definir si un paciente presenta CaP agresivo o no agresivo.

### **1.1.5 CaP en México.**

En nuestro país los tumores malignos representan la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes mellitus (Figura 6) <sup>(12)</sup>, según el último reporte del Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI). El número de fallecimientos en varones por tumores malignos fue de 38,347 en el 2008, dentro de los cuales 5,938 (16%) murieron a por CaP, cifra que lo ubica en el primer lugar de muertes por cáncer en México junto al cáncer de pulmón (Figura 7) <sup>(4)</sup>. Según el Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas (RHNM), la relación entre caso/defunción por CaP, es de tres casos por defunción en el grupo de edad de 45 a 64 años pero esta relación se ve igualada (1.1 caso/defunción) en el grupo de 65 años o más

(13)



Figura 6. Principales causas de muerte en México <sup>(12)</sup>.

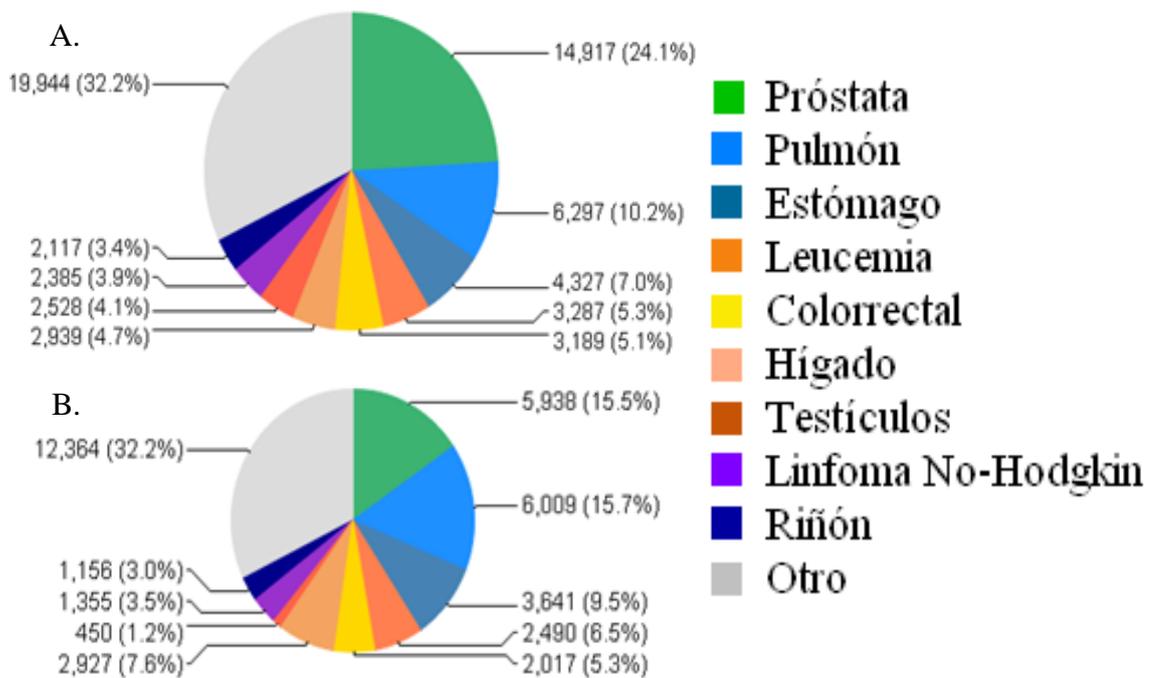


Figura 7. A. Incidencia y B. mortalidad de diferentes tipos de cáncer en México <sup>(4)</sup>.

### **1.1.6 La fusión TMPRSS2:ERG en CaP.**

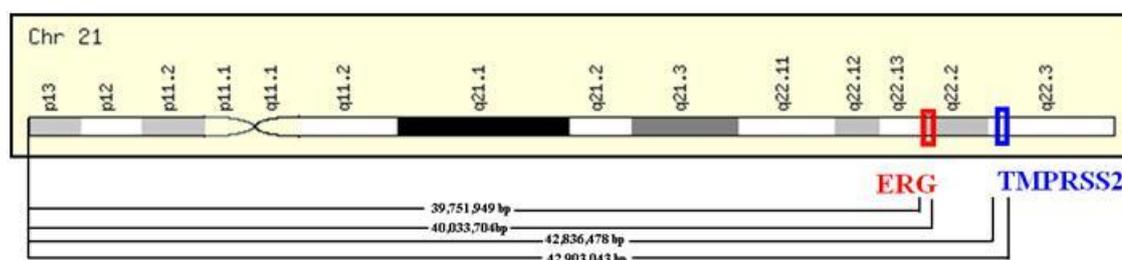
En el año 2005, Tomlins y colaboradores, identificaron y describieron un pequeño número de transcritos fusionados específicos de CaP, como consecuencia de un rearrreglo cromosómico que implicaba dos genes<sup>(21)</sup>. El gen, TMPRSS2, el cual codifica para una serínproteasa que es secretada por las células epiteliales de la próstata como respuesta a la exposición androgénica<sup>(22)</sup>, estaba fusionado con el gen ERG o ETV1 dos miembros de la familia de oncogenes ETS<sup>(21)</sup>. Posteriormente se reportó que el gen ERG era el proto-oncogén sobre expresado con mayor frecuencia en CaP (presente en aproximadamente el 72% de los casos de CaP)<sup>(23)</sup>. Tomlins y colaboradores propusieron un mecanismo que explicaba dicha sobreexpresión, pues encontraron que rearrreglos intra e inter cromosómicos conducían a la formación de un transcrito fusionado al cual denominaron TMPRSS2-ETS.

ETS es una familia de proto-oncogenes activadores e inhibidores transcripcionales y su actividad es regulada por fosforilación e interacciones proteína-proteína<sup>(24)</sup>. ERG, ETV1, ETV4 y ETV5 son miembros de la familia ETS. El gen ERG está localizado en la banda cromosómica 21q, ETV1 en 7p, ETV4 en 17q y ETV5 en 3q. Se determinó que ETVI o ERG (pero no juntos) se encontraban frecuentemente sobreexpresados en células de CaP, pero dicha sobreexpresión no solía incluir a todos los exones de ERG. Los exones 4 al 7 estaban sobreexpresados con mayor frecuencia que los exones 1 al 3. Esta particular observación sugirió que el gen había sido partido y por medio de secuenciación del cDNA confirmaron dicho supuesto, descubriendo que la secuencia perdida del gen ERG había sido remplazada por una secuencia del gen TMPRSS2. Este hallazgo fue corroborado a nivel del DNA por medio de FISH.



Utilizando arreglos de expresión derivados de muestras de CaP confirmaron que uno de los dos oncogenes ETS estaba expresado en el 57% de 167 casos de CaP y concluyeron que en las células que poseían alguno de estos productos de la fusión, la expresión del oncogen ERG estaba bajo control androgénico; por ejemplo, la línea celular VCaP, la cual posee el producto de fusión TMPRSS2:ERG, expresa el transcrito ERG 2 mil veces más que la línea celular LNCAP, la cual no posee el producto de fusión. Debido a que TMPRSS2 es regulado en la próstata por andrógenos, se propuso que este rearrreglo génico podría ser el mecanismo mediante el cual los oncogenes ETV1 o ERG eran sobreexpresados y podrían participar en la carcinogénesis del CaP.

Los genes TMPRSS2 y ERG, localizados ambos en el cromosoma 21, están contiguos, separados únicamente por aproximadamente 3 Mb (Figura 9).



**Figura 8.** Locus de los genes ERG y TMPRSS2

En cerca de 2/3 de los casos, la fusión es el resultado de la delección de la secuencia de DNA que los separa. Sin embargo, dicha fusión también puede ocurrir por un rearrreglo más complejo, como una translocación<sup>(25,26)</sup>. La fusión más frecuente ocurre entre la región 5' no traducible de TMPRSS2 y la región 3' de ERG<sup>(25-28)</sup>. El punto específico de corte varía entre los pacientes. Más de 20 variantes de TMPRSS2:ERG han sido descritas hasta el momento<sup>(29-31)</sup>. La mayoría de las variantes son el resultado de la recombinación entre cualquiera de los exones 1 o 2 del gen TMPRSS2 y el exón 4 del gen ERG (aunque también los exones 2, 3 y 5 pueden estar involucrados). La fusión

reportada con mayor frecuencia ocurre entre el exón 1 del TMPRSS2 y el exón 4 del ERG<sup>(30)</sup>. Este particular arreglo es designado T1/E4, de acuerdo con la nomenclatura propuesta por Clark y colaboradores en el 2007, en remplazo de la notación antiguamente conocida como TMPRSS2:ERGa o tipo III <sup>(21,32)</sup> y representa el 86% de todas las fusiones reportadas <sup>(33)</sup>.

### **1.1.7 Estudios de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) en CaP**

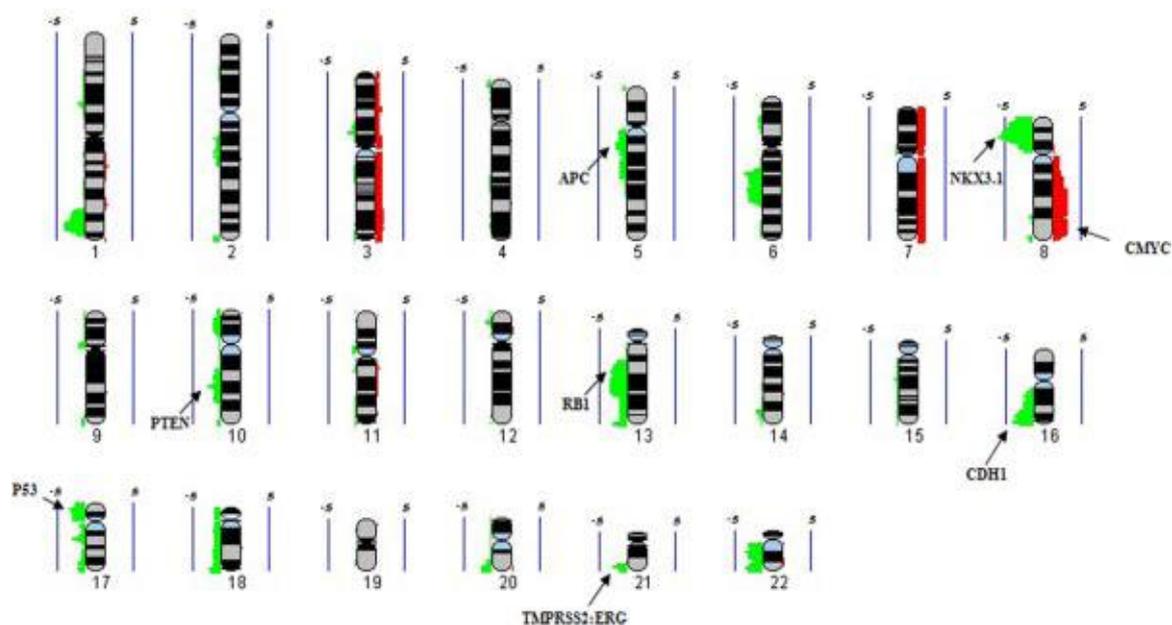
Algunas alteraciones en el DNA como las variaciones (ganancias o pérdidas) en el número de copias (CNVs) es una de las formas en las que se puede modificar la expresión y función génica, y en el cáncer, las pérdidas y ganancias de material genético son los eventos más comunes que conllevan al fenotipo neoplásico. El desarrollo de la técnica de CGH trajo consigo el primer acercamiento a un escaneo completo del genoma teniendo como objetivo primario la identificación de dichos CNVs <sup>(14,16)</sup>. En los análisis por CGH convencional el DNA tumoral es marcado y pareado con DNA normal y juntos son co-hibridizados con cromosomas en metafase y el índice de variación del DNA tumoral respecto al DNA normal indica el número de copias relativo para dicho segmento de DNA. En sus inicios, esta técnica si bien era muy útil, la resolución era muy pobre (mega bases "Mpb") con un 73% de exactitud. Pero algunos años más tarde la metodología fue afinándose y se acopló a las matrices de arreglos de fragmentos de DNA, cDNA, oligonucleótidos o de regiones de cromosomas bacterianos artificiales (BACs), por lo que en la actualidad se le conoce como "arrays CGH (aCGH)". Esta alternativa posee una resolución que alcanza (según cada proveedor de los microarreglos) hasta de fragmentos menores de 500 pares de base (pb), por lo que



incrementaron su exactitud a 95% <sup>(17)</sup>.

Debido a que en el CaP ocurren numerosos eventos moleculares, de los cuales no se ha podido identificar uno característico de fenotipo (CaP agresivo y no agresivo) que se comporte de igual forma en todos los pacientes (característica que ilustra la biología compleja del CaP), la utilización de los aCGH representaría una gran ayuda en la búsqueda de regiones crípticas de pérdida o de ganancia de material genético asociadas con la evolución tumoral, ya que estos estudios se centran en la búsqueda de características moleculares resultantes de la carcinogénesis e identificación de blancos clínicos <sup>(18)</sup>.

Existen varios reportes en los que han utilizando los aCGH para caracterizar algunos tumores. Estos reportan múltiples regiones del genoma frecuentemente alteradas, lo cual ha permitido la identificación de genes supresores de tumor y oncogenes que podrían desempeñar un papel importante en la tumorigenesis del CaP, algunos ejemplos incluyen: deleciones en 10q23, 16q22, 13q21 donde se encuentran los genes supresores de tumor PTEN, ATBF1, KLF5 respectivamente y ganancias en las regiones Xq12 y 8q21 donde se encuentran los protooncogenes AR (frecuentemente encontrado en tumores hormonorefractarios) y MYC, respectivamente <sup>(19)</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Resultados de un análisis por aCGH de 24 pacientes con CaP. Regiones donde se encontró pérdida de material se encuentra en verde, donde hubo ganancia en rojo y algunos genes ya reportados como asociados a CaP se encuentran señalados con flechas <sup>(20)</sup>.

## 1.2 JUSTIFICACIÓN DEL TRABAJO.

Los estadios iniciales del CaP representan un reto clínico, debido a la complejidad que surge al establecer un pronóstico y definir una estrategia terapéutica racional que resulte en mantener una buena calidad de vida para el paciente. Esto se debe a que hasta el momento el único biomarcador clínico de rutina utilizado es el APE, a pesar de que está bien establecido que los niveles séricos de esta proteína se pueden alterar por eventos independientes del CaP. Esto nos obliga como investigadores a profundizar en la búsqueda de biomarcadores adicionales con los cuales poder diferenciar, al momento del diagnóstico primario, un tumor no agresivo e indoloro de uno agresivo y de mal pronóstico en etapas iniciales de la enfermedad.



### 1.3 ABORDAJE.

En el presente trabajo se aborda el CaP desde dos puntos de vista. En el primero se recurre al análisis retrospectivo de dos grupos de muestras conformadas por tejido prostático embebido en parafina de pacientes claramente definidos como CaP metastásico (o agresivo) y CaP no metastásico (o no agresivo), con el fin de definir perfiles genómicos específicos para cada fenotipo, empleando la tecnología de aCGH. En el segundo se recurre al análisis prospectivo de dos grupos de muestras de tejido prostático fresco con reporte histopatológico de CaP (casos) y No CaP (controles) de reciente diagnóstico, a los cuales se les realiza la búsqueda de el gen fusión TMPRSS2:ERG empleando la técnica de procesamiento PCR en Tiempo Real, en el que se correlacionarán parámetros como edad del paciente, antecedentes directos (padre, hermanos) de CaP, APE sérico, grado Gleason y TNM, para intentar definir asociaciones que permitan predicciones de comportamiento. Este trabajo contribuirá en la búsqueda e identificación de cambios característicos en el material genético que sirvan como potenciales biomarcadores específicos de comportamiento tumoral para poder definir pronóstico y mejores modalidades terapéuticas, particularmente en mestizos mexicanos.

## **CAPÍTULO 2.**

### **OBJETIVOS.**

#### **2.1 OBJETIVO GENERAL.**

Identificar marcadores genómicos que permitan predecir el comportamiento agresivo de una neoplasia prostática localizada de diagnóstico reciente.

#### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

- Detectar las variaciones (ganancia/pérdida) en el número de copias de DNA en múltiples muestras de tumores agresivos (metastásicos) y no agresivos (localizados).
- Identificar la presencia de la fusión TMPRSS2:ERG en tumores prostáticos
- Establecer asociaciones clínicas (edad, antecedentes familiares de CaP, APE sérico, grado Gleason y TNM) con las alteraciones genéticas analizadas que pudieran definir el comportamiento tumoral.



### 2.3 METAS.

1. Generar una colección de tejidos no tumorales y tumorales (de comportamiento no agresivo y agresivo):
  - Tejido prostático embebido en parafina
  - Tejido prostático embebido en O.C.T.
2. Analizar las pérdidas/ganancias de material genético en tumores agresivos y no agresivos:
  - Detección de CNVs por aCGH
3. Detección de la fusión TMPRSS2:ERG en tejido tumoral fresco
  - Identificación de la fusión por PCR en Tiempo Real

## **CAPÍTULO 3.**

### **MATERIAL Y MÉTODOS.**

#### **3.1 MATERIAL.**

##### **3.1.1 Área de trabajo.**

La toma de muestras fue realizada en el Hospital Universitario de la UANL en Monterrey, Nuevo León, México. La fase experimental inicial del presente trabajo se realizó en el laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.) y la fase final en la Unidad de Terapia Génica y Celular del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (C.I.D.C.S). El procesamiento de algunas muestras fue realizado por el laboratorio de diagnóstico clínico Combimatrix Molecular Diagnostics (CMDX) en Irvine, CA y para esto se contó con la asesoría del Departamento de Biología Estructural y Celular del University of Texas Health Science Center en San Antonio, TX.

##### **3.1.2 Material Biológico.**

Tejido prostático embebido en parafina de pacientes con CaP agresivo y no agresivo, DNA aislado a partir de sangre periférica a pacientes con y sin CaP, de los cuales también se obtuvieron tejidos prostáticos para posterior extracción de RNA y retrotranscripción a cDNA, así como cDNA de adipocitos humanos y de borrego utilizados como controles.



### **3.1.3 Reactivos Químicos.**

**3.1.3.1 Extracción de DNA:** Paquete comercial Maxwell® 16 FFPE LEV DNA Purification kit de Promega, para tejido embebido en parafina. Soluciones Trizma base, SDS, NaCl, tritón X-100, EDTA (TSNTE) y fenol de Sigma Life Science (Saint Louis, MO, EUA), cloroformo, isopropanol y etanol de Merck (México, D.F.) para tejido criopreservado.

**3.1.3.2 Extracción de RNA:** Buffer RLT, Buffer RW1, Buffer RPE incluidos en el paquete comercial RNeasy mini kit de QIAGEN (Austin, TX), etanol de Merck (Distrito Federal)

**3.1.3.3 Retrotranscripción:** mezcla de reacción 5X iScript de BIO-RAD (Hercules, CA).

**3.1.3.4 Reacción en Cadena de la Polimerasa en Tiempo Real (qPCR):** iQ™ SYBR® Green Supermix, BIO-RAD (Carlsbad, CA), juegos de iniciadores específicos de la fusión TMPRSS2:ERG T1/E4 Invitrogen (Carlsbad, CA).

### **3.1.4 Material de laboratorio.**

**3.1.4.1 Toma de muestra de sangre periférica:** Tubos Vacutanier estériles de 5.0 mL tapón lila con EDTA (Franklin Lakes, NJ), agujas estériles Vacutainer,

torniquete, algodón, bandas adhesivas elásticas de Beiersdorf S.A. (Bogotá, Colombia) y guantes de latex de Cell associates (Houston, TX).

**3.1.4.2 Extracción de DNA:** Tubos Eppendorf de 2.0 mL, soporte para microtubos, micropipeta de precisión de 1000 uL, puntillas de micropipetas de precisión de 0.2 y 1.0 mL, tubos cónicos de polipropileno de 15 y 50 mL y guantes de nitrilo libre de polvo SUPRENO® MICROFLEX (Malasia).

**3.1.4.3 Extracción de RNA:** Columnas de separación mini spin, tubos colectores de 1.5 y 2.0 µL Collection Tubes (1.5 ml) Collection Tubes (2 ml) proporcionados por el paquete comercial RNeasy mini kit de QIAGEN (Austin, TX).

**3.1.4.4 qPCR:** Tubos de microcentrífuga de 0.2, 0.6 y 2.0 mL, soporte para microtubos, micropipeta de precisión de volumen ajustable, de 2, 10, 20 y 200 uL, puntillas de 0.01 y 0.2 mL, hielera para reactivos y guantes de nitrilo libre de polvo SUPRENO® MICROFLEX (Malasia).

### **3.1.5 Equipo.**

**3.1.5.1 Extracción de DNA y RNA:** Instrumento Maxwell® 16 configurado con hardware de bajo volumen de elución (LEV), microcentrífuga Eppendorf modelo 5412 (Hamburgo, Alemania), vórtex modelo 376000 de Thermolyne (Dubuque, IA, EUA), microcentrífuga Biofuge Pico de Kendro Laboratory Products (Alemania).



**3.1.5.2 Cuantificación de DNA, RNA y cDNA:** Espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 de NanoDrop Technologies (Wilmington, DE).

**3.1.5.3 Retrotranscripción:** Termociclador PTC-100TM Thermal Cycler de MJ Research (Waltham, MA).

**3.1.5.4 qPCR:** Termociclador de tiempo real, CFX96 Real Time Systems Bio-Rad C100 thermal cycler (Singapur).

### **3.1.6 Fuentes en red y programas computacionales.**

**3.1.6.1 Análisis de secuencias:** ClustalW2 del instituto Europeo de Bioinformática (E.B.I.), BLAST del Centro nacional de información Biotecnológica (N.C.B.I), Amplify versión 1.2b (Bill Engels 1992, University of Wisconsin Genetics, Madison, WI), Chromas Versión 2.0 de Technelysium Pty Ltd (Helensvale, Australia).

**3.1.6.2 Cuantificación de DNA:** NanoDrop ND-100 Versión 3.1.2 de Coleman Technologies Inc. para NanoDrop Technologies.

**3.1.6.3 aCGH:** Software R, función r, bioconductor.

**3.1.6.4 PCR – TR:** BIO-RAD™ software 1.5

### 3.2 MÉTODOS.

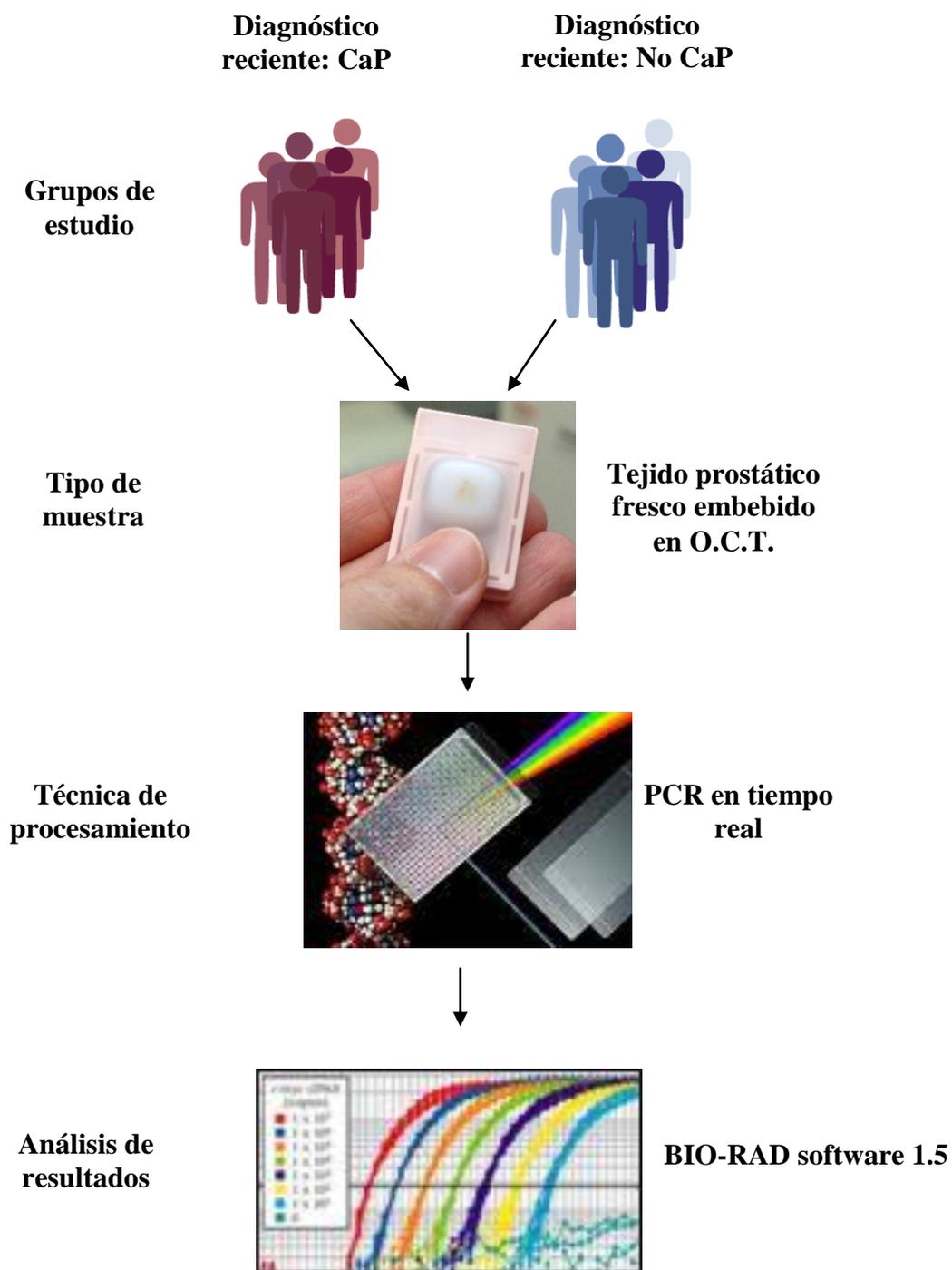
#### 3.2.1 Estrategia general de trabajo.

##### 3.2.1.1 Análisis Retrospectivo



**Figura 10.** Estrategia general de trabajo para el análisis retrospectivo.

### 3.2.1.2 Análisis Prospectivo



**Figura 11.** Estrategia general de trabajo para el análisis prospectivo.

### **3.2.2 Selección de la muestra.**

#### **3.2.2.1 Criterios de inclusión.**

- Muestras de tejido prostático embebido en parafina disponibles en el banco de tejidos del Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL con diagnóstico de CaP de más de 5 años sin evidencia de metástasis (CaP no agresivo) y con diagnóstico de CaP metastásico (CaP agresivo).
- Tejido prostático fresco de personas que deseen participar en el protocolo y que tengan prescrito cualquiera de los siguientes procedimientos: BTR, RTUP o Prostatectomía radical

#### **3.2.2.2 Criterios de exclusión.**

Mala calidad de la muestra o que el paciente no desee seguir formando parte del protocolo.

### **3.2.3 Diseño del estudio.**

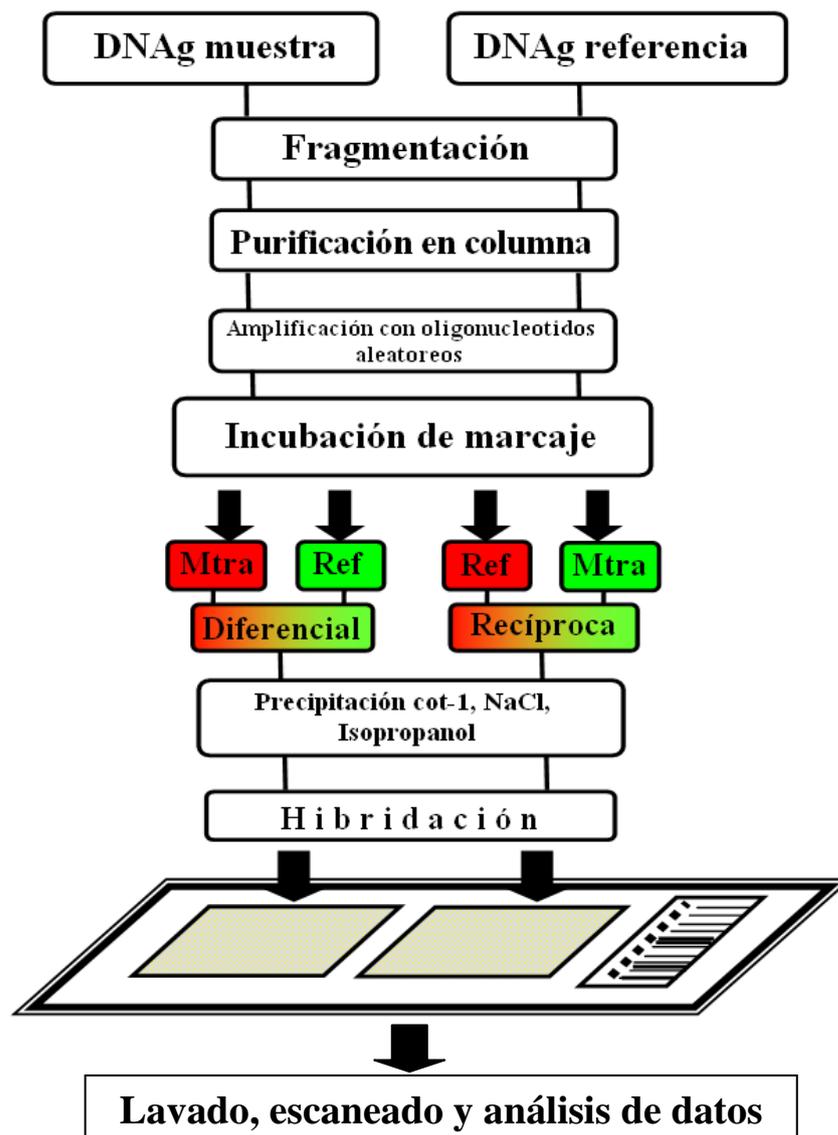
Este trabajo forma parte del protocolo "Identificación de Marcadores Proteicos y Genéticos para el Cáncer de Próstata" aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de la UANL con el número de registro BI04-001. Se realizaron dos tipos de estudios, cada uno conformado por dos grupos de muestras (casos y controles) los cuales se analizaron retrospectivamente (cáncer metastásico vs cáncer no metastásico) y prospectivamente (cáncer y no cáncer).



### 3.2.4 Análisis de aCGH.

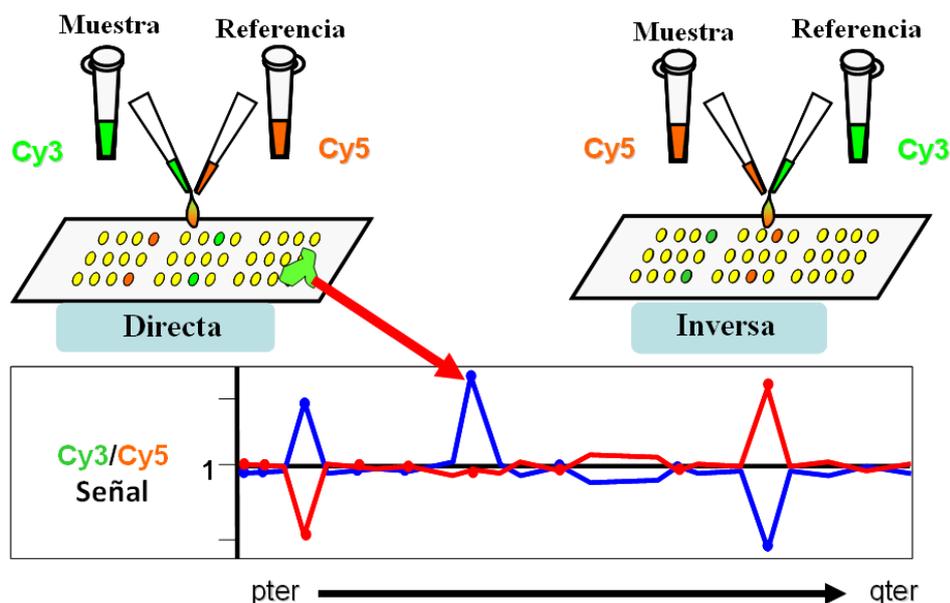
**3.2.4.1 Colección de muestras.** Se eligieron como muestras de trabajo 17 bloques con tejido prostático embebido en parafina, obtenidos de pacientes con CaP metastásico o agresivo (casos) y 21 bloques de pacientes con CaP, diagnosticado hace 5 años o más, sin evidencia de metástasis o no agresivo (controles). Se logró recolectar un total de 38 muestras, de las cuales debido a su calidad solo se pudieron procesar 23 (15 y 8, agresivo y no agresivo, respectivamente).

**3.2.4.2 Procesamiento de las muestras.** El procesamiento se realiza a cada una de las muestras por separado de la siguiente manera. El DNA genómico (DNAg) de la muestra es extraído utilizando el paquete comercial Maxwell® 16 FFPE LEV DNA purification kit de Promega y siguiendo las instrucciones del proveedor, posteriormente se mezcla con DNA genómico de referencia (DNA de mujer), luego se fragmenta y purifica, se marcan para luego hibridarlo en un chip de microarreglos, el cual está conformado por 3,052 clonas únicas (tres copias de cada clona en cada una de las dos subunidades del chip) diseñadas tanto para identificar loci asociados a CaP (donde se localizan genes como PTEN, TMPRSS2, MEN1 y c-MYC), como para tamizar desbalances en el número de copias con una resolución de 0.8 Mb en promedio (con una mediana de 346 kb) a lo largo de todo el genoma humano (Figura 12).



**Figura 12.** Procesamiento de muestras para aCGH (CDMX Array)

**3.2.4.3 Interpretación de resultados.** Una vez que las muestras son hibridadas en el chip, se realizan dos tipos de análisis para determinar la confiabilidad de los resultados, uno de intensidad y otro de calidad de la señal. Habiendo superado estas pruebas se realiza una discriminación de falsos positivos (aquellas señales que carezcan de señal recíproca), ya que la reacción se realiza de manera directa (diferencial) e inversa (recíproca) (Figura 13).



**Figura 13.** Ilustración de señales observadas en aCGH, la señal falsa positiva carece de señal recíproca y está indicada con una flecha roja.

La relación entre las intensidades de la señal muestra vs la señal de referencia es utilizada como índice de ganancia o pérdida de material genético para esa región en particular, luego se procede con el análisis bioinformático de agrupamiento tanto no supervisado como supervisado, para separar e identificar muestras con similar patrón de regiones ganadas y perdidas, posteriormente se analiza la posible asociación a CaP de los genes presentes en dichas regiones.

### 3.2.5 Búsqueda de TMPRSS2:ERG por PCR -TR.

**3.2.5.1 Colección de muestras.** En un periodo de tiempo comprendido desde Septiembre del 2009 y Junio del 2010 se recolectaron 71 muestras de tejido prostático fresco, obtenidas de 71 pacientes a los cuales se les realizaron BTR (48) o RTUP (23) en el Departamento de Urología del Hospital Universitario de la UANL. En ambos

casos las muestras fueron obtenidas al momento del procedimiento quirúrgico, embebidas en O.C.T. y almacenadas en congelación (-70°C) hasta el momento de su procesamiento. En las BTRs a cada paciente se le extrajeron 8 cilindros de tejido, de los cuales dos fueron empleados para este estudio y los 6 restantes fueron enviados al departamento de Anatomía patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL para su respectivo análisis histopatológico, obteniendo un total de 19 muestras positivas para CaP. En las RTUPs a cada paciente se le extrajo el tejido que el urólogo (encargado de la cirugía) consideró necesario según las características clínicas del paciente. Para este estudio se tomaron tres fragmentos de tejido (aproximadamente de 1g). El tejido restante, al igual que en las BTRs, fue enviado al Departamento de Anatomía Patológica y Citopatología del Hospital Universitario de la UANL para su posterior análisis histopatológico.

**3.2.5.2 Evaluación del tejido criopreservado.** De las 71 muestras recolectadas, 20 fueron positivas para CaP y 51 fueron negativas (Tabla III). Los tejidos criopreservados correspondientes a las 20 muestras positivas para CaP y 5 muestras negativas para CaP (tejido de estudio) fueron microseccionados en un criomicrotomo y evaluados por medio de microscopía por un histopatólogo, para confirmar la presencia de tejido tumoral, obteniendo un total 16 muestras positivas y 9 negativas para CaP.

<b>Característica</b>	<b>BTR</b>	<b>RTUP</b>	<b>Total</b>
<b>CaP positivas</b>	19	1	<b>20</b>
<b>CaP negativas</b>	29	22	<b>51</b>
<b>Total</b>	48	23	<b>71</b>

**Tabla III.** Resumen de muestras colectadas.



**3.2.5.3 Aislamiento de RNA.** Al tejido de estudio se le realizó la extracción de RNA utilizando el paquete comercial RNeasy mini kit de QIAGEN (Meryland), siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 1).

**3.2.5.4 Retrotranscripción.** Utilizando como templado de la reacción el RNA obtenido de cada uno de los tejidos por separado (30-50ng de RNA por reacción), se realizó la reacción de PCR utilizando el paquete comercial iScript cDNA Synthesis kit de Bio-Rad (Hercules, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor (anexo 2).

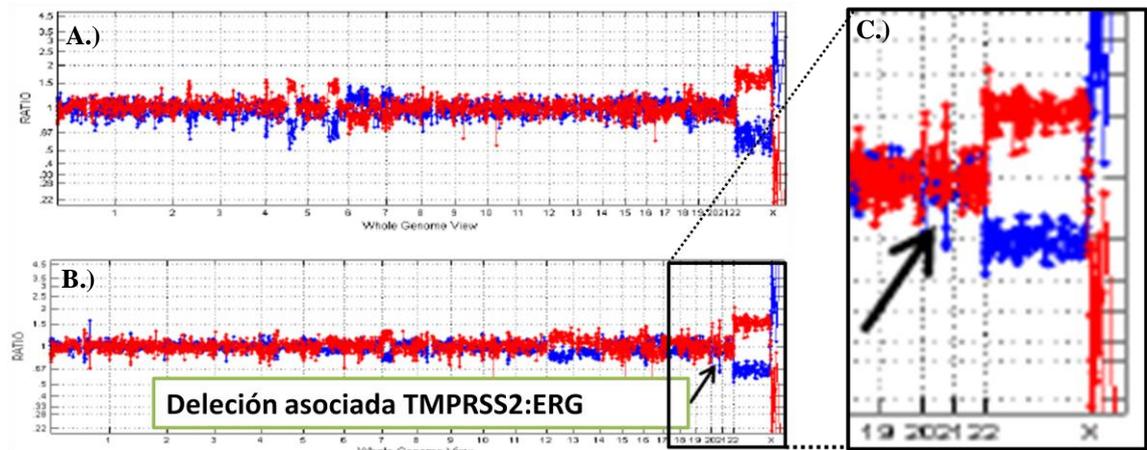
**3.2.5.5 PCR - TR.** Estas reacciones se realizaron utilizando como templado los cDNAs de los 25 tejidos de estudio por separado y los oligonucleótidos específicos de la fusión TMPRRS2:ERG T1/E4 descritos por Laxman y colaboradores en el 2006 <sup>(53)</sup> con el paquete comercial iQ<sup>TM</sup> SYBR<sup>®</sup> Green Supermix de BIO-RAD (Carlsbad, CA) siguiendo las instrucciones del proveedor. Como controles positivo y negativo se utilizó cDNA de la línea celular VCaP y de adipocitos humanos respectivamente.

## CAPÍTULO 4.

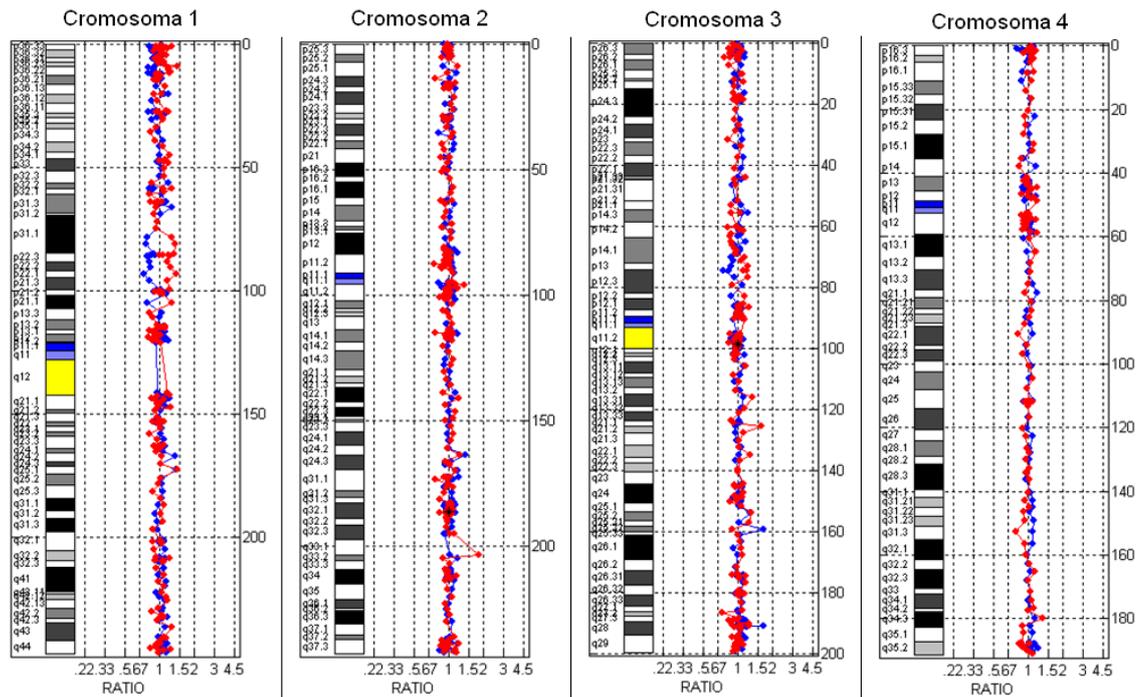
### RESULTADOS.

#### 4.1 ANÁLISIS DE aCGH

Se recolectaron un total de 31 muestras de DNA de tejido prostático embebido en parafina de pacientes diagnosticados con CaP agresivo (n = 18) y CaP no agresivo (n = 13). Debido a la integridad del DNA, el número final de muestras procesadas fue reajustado a un total de 15 muestras de CaP agresivo y 8 muestras de CaP no agresivo. El reporte del análisis cromosómico nos permitió apreciar gráficamente y de manera preliminar las ganancias y pérdidas de material genético en el genoma completo (Figura 14) y en cada uno de los cromosomas por separado (Figura 15) para cada una de las muestras procesadas.

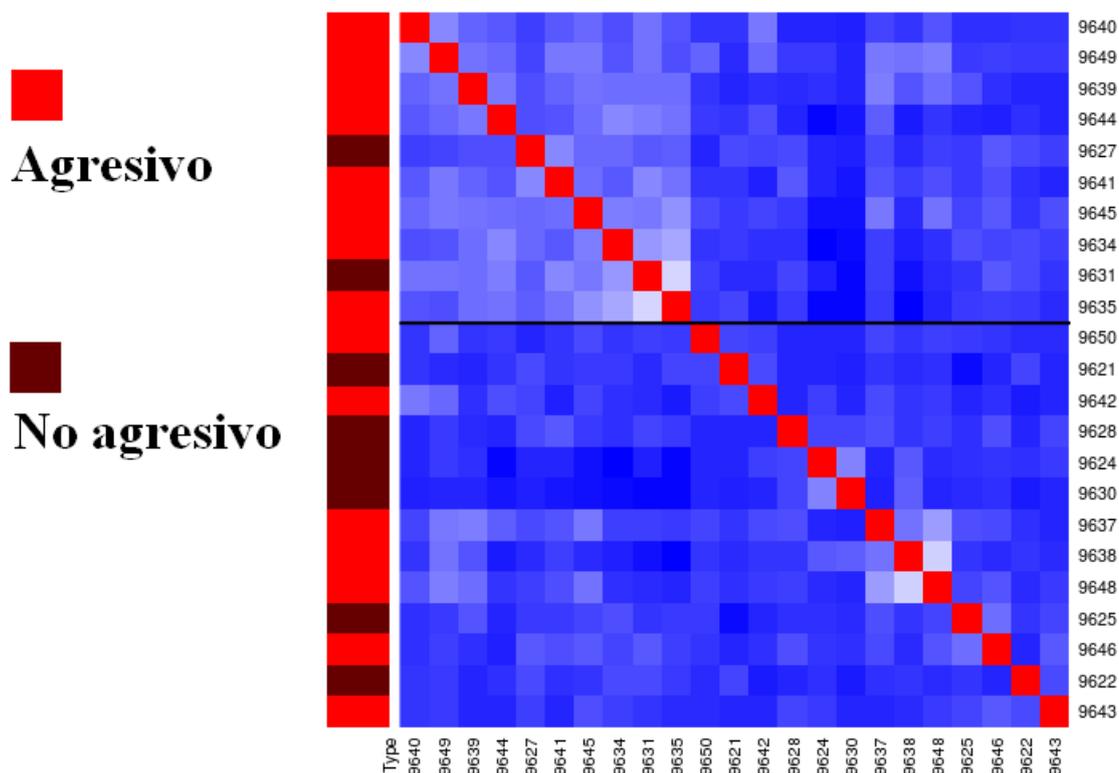


**Figura 14.** Graficas de ganancias y pérdida de material genético (perfil genómico) de dos muestras para ejemplificar la ausencia (A.) y presencia (B.) de la deleción asociada a la fusión TMPRSS2:ERG y ampliación de la región perdida (C.). En el eje de las abscisas se encuentran los cromosomas numerados y en el eje de las ordenadas el índice de ganancia y pérdida.



**Figura 15.** Graficas de ganancias y pérdida de material genético (perfil cromosómico) de los cromosomas 1, 2, 3 y 4 de una muestra aleatoria para ejemplificar la presentación gráfica de los datos preliminares arrojados por el sistema. En el eje de las abscisas se encuentra el índice de ganancia y pérdida y en el eje de las ordenadas las regiones cromosómicas.

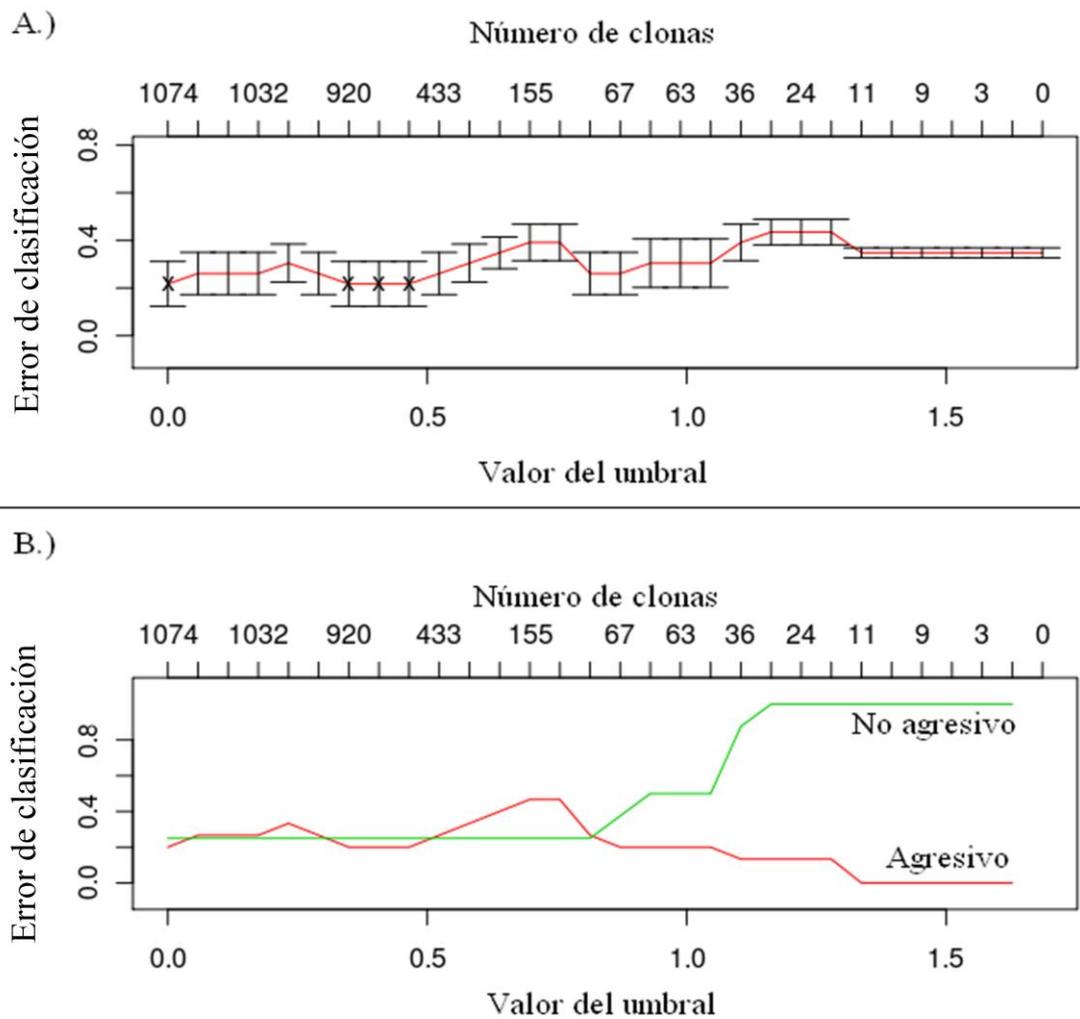
El valor umbral de ganancia y pérdida calculado es de 0.3 y -0.3 respectivamente para los autosomas y de 1.5 y -1.5 para los cromosomas sexuales. Los datos obtenidos (índice de ganancia o pérdida arriba del valor umbral) fueron sometidos a un análisis de agrupamiento no supervisado para dos grupos, el cual reveló una gran heterogeneidad en las muestras estudiadas (Figura 16).



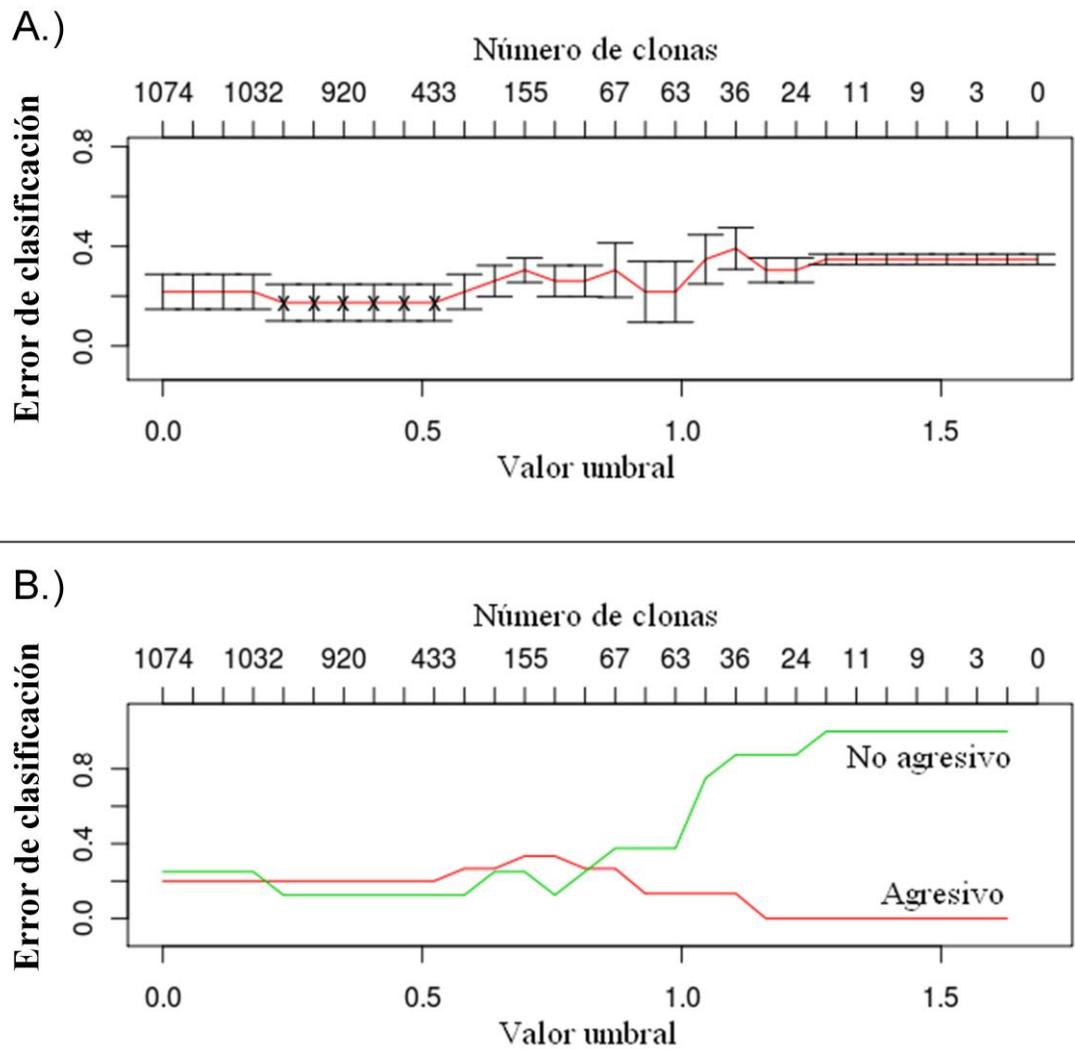
**Figura 16.** Gráfica del agrupamiento no supervisado (para dos grupos).

Posterior al agrupamiento no supervisado se realizó el agrupamiento supervisado y gracias a este se pudo desarrollar un perfil genómico de ganancia y pérdida de regiones, el cual clasifica una muestra de tejido prostático positivo para CaP como agresivo o no agresivo con un error de clasificación de 30% (Figura 21).

Para validar dicho perfil clasificador, se realizó una prueba de validación cruzada la cual consiste en separar todas las muestras de manera aleatoria (desordenarlas) y realizar una nueva corrida del programa en donde se corrobora el número de muestras y su clasificación dentro de cada grupo (agresivo o no agresivo), por lo tanto en cada corrida se puede tener cierta variación de los resultados. A continuación se observan dos ejemplos de resultados obtenidos de dos corridas características de cada uno de los extremos con respecto a la significancia estadística (figuras 17-20 y tablas IV y V).

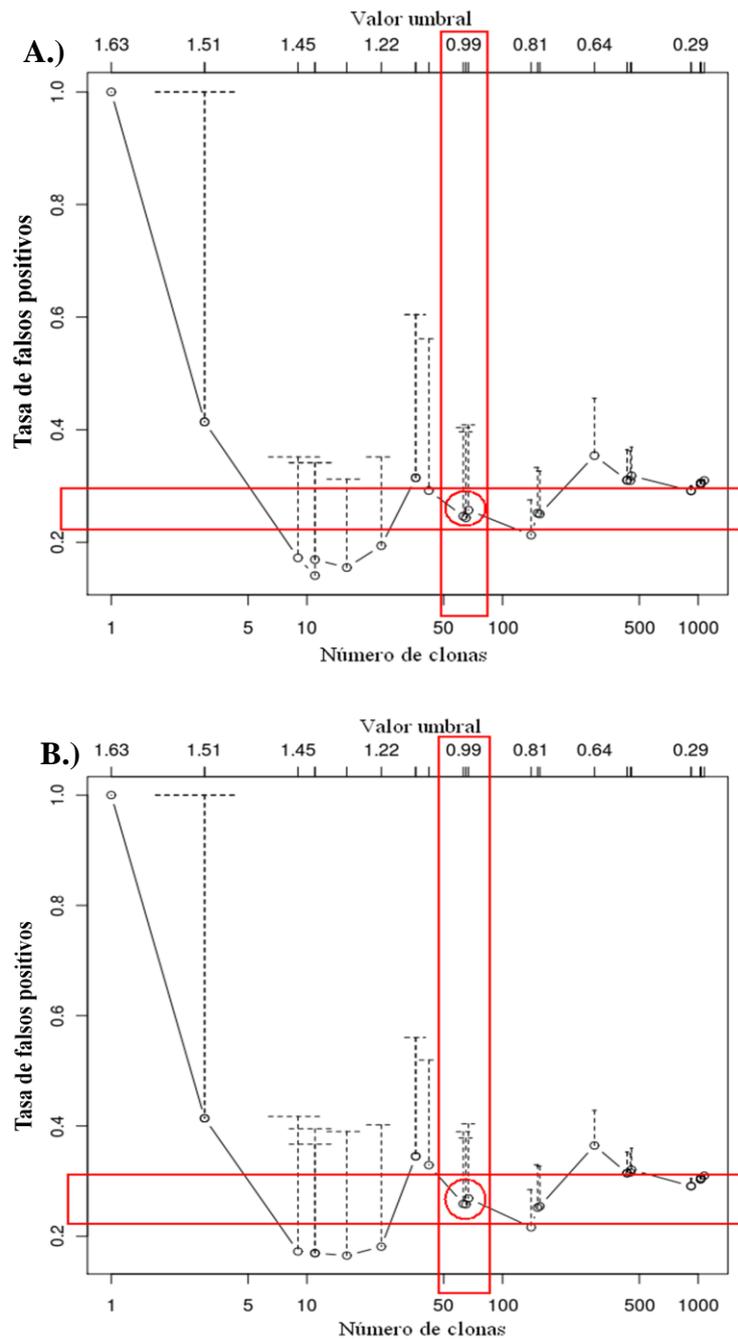


**Figura 17.** Error de clasificación de una corrida característica con poca o nula significancia estadística ( $p = 0.18$ ). Se observa el valor del error en relación al número de clonas empleadas para su clasificación. A) valor promedio entre los dos grupos (agresivo y no agresivo) y B) valor para cada uno de los grupos por separado.



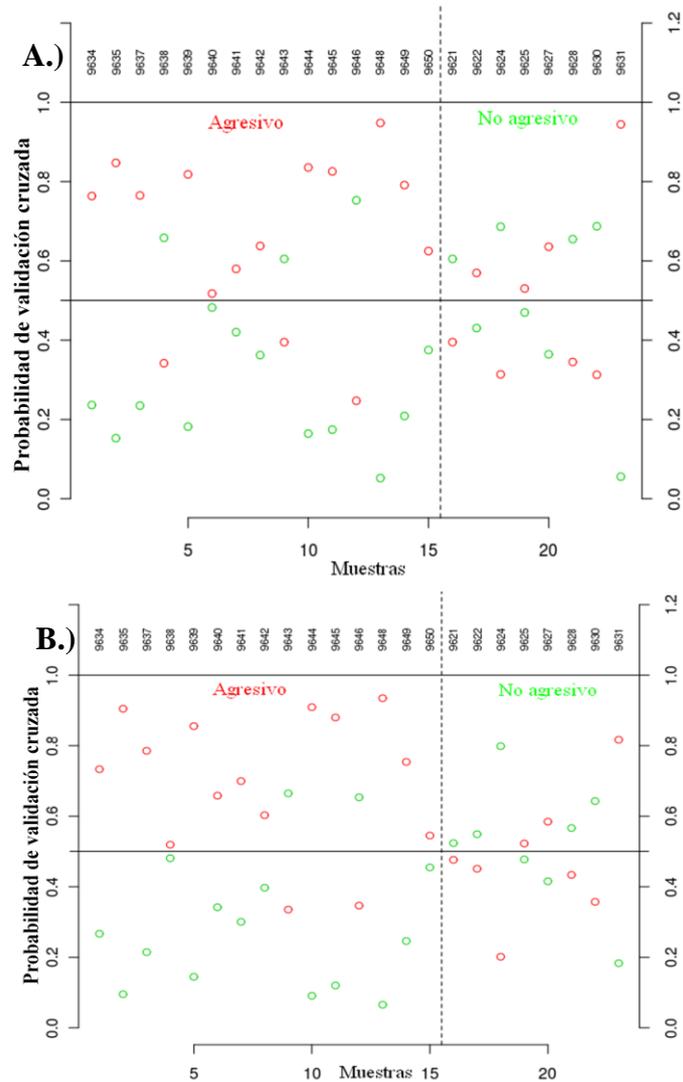
**Figura 18.** Error de clasificación de una corrida característica de significancia estadística ( $p=0.03$ ). Se observa el valor del error en relación al número de clonas empleadas para su clasificación. A) Valor promedio entre los dos grupos (agresivo y no agresivo) y B) valor para cada uno de los grupos por separado.

Las gráficas de error de clasificación muestran la tasa de error que se tendría al trabajar con cierto número de clonas, para este trabajo se decidió tomar como valor umbral 0.9 ya que era la cantidad mínima de clonas posibles (cerca de 65) con la menor tasa de error ( $< 0.3$ ) (Figuras 17 y 18).



**Figura 19.** Tasa de falsos positivos. A. corrida característica de poca o nula significancia estadística ( $p = 0.18$ ) y B. corrida característica de significancia estadística ( $p = 0.03$ ).

La probabilidad de incluir falsos positivos en cada corrida es  $< 30\%$  para ambos casos, teniendo en cuenta el valor umbral, y el número de clonas elegidos con anterioridad (Figura 19).



**Figura 20.** Probabilidad de predicción por medio de la validación cruzada de dos corridas, una característica de poca o nula significancia estadística (A) y la otra de significancia estadística (B).

Nuestro sistema clasificador calcula la probabilidad de que el CaP sea agresivo ( $P(\text{CaPa})$ ) y no agresivo ( $P(\text{CaPna})$ ) para cada uno de los pacientes, de esta forma si  $P(\text{CaPa}) > 0.05$  el paciente se clasifica como CaP agresivo y si  $P(\text{CaPna}) > 0.05$  el paciente se clasifica como CaP no agresivo donde  $P(\text{CaPa}) + P(\text{CaPna}) = 1$ . En las gráficas de validación cruzada (figura 20) se observan los pacientes con CaP agresivo

agrupados en el lado izquierdo de la gráfica, por ejemplo en la figura 20-B se encuentran las 15 muestras de CaP agresivo de las cuales nuestro clasificador detecta 13 muestras como CaP agresivo (color rojo) y 2 muestras como CaP no agresivo (color verde).

Las tablas de contingencia para cada uno de los ejemplos reflejan una de las diferencias más grandes encontradas (respecto a significancia estadística) entre dos corridas (Tablas IV y V).

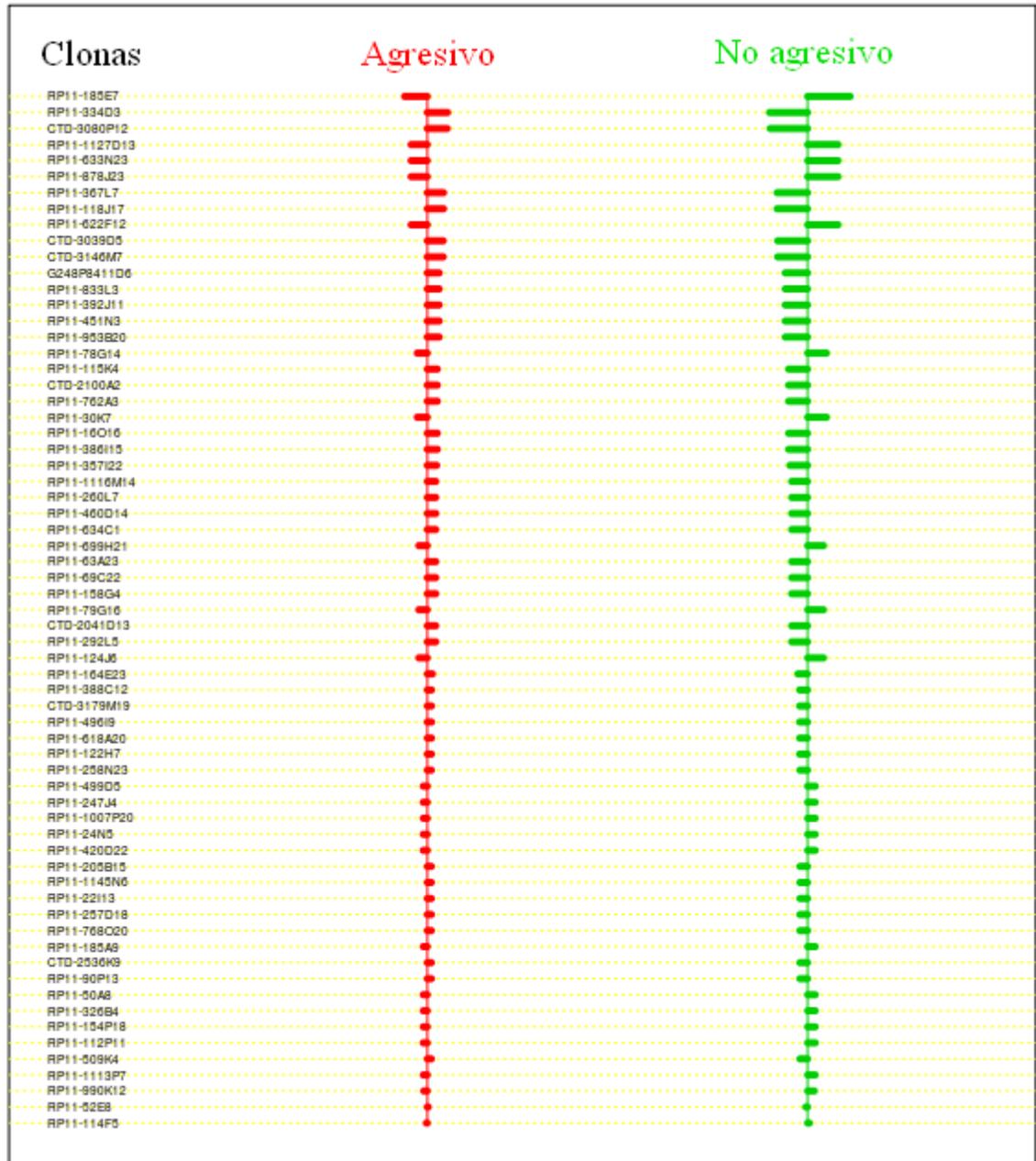
<b>P = 0.18</b>	<b>Agresivo</b>	<b>No agresivo</b>	<b>Real</b>
<b>Agresivo</b>	<b>12</b>	<b>3</b>	<b>15</b>
<b>No agresivo</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>Predicción</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>23</b>

**Tabla IV.** Tabla de contingencia de la corrida de poca o nula significancia estadística (P = 0.18).

<b>P = 0.03</b>	<b>Agresivo</b>	<b>No agresivo</b>	<b>Real</b>
<b>Agresivo</b>	<b>13</b>	<b>2</b>	<b>15</b>
<b>No agresivo</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	<b>8</b>
<b>Predicción</b>	<b>16</b>	<b>7</b>	<b>23</b>

**Tabla V.** Tabla de contingencia de la corrida característica de significancia estadística (P = 0.03).

En ambas corridas, el perfil de regiones (clonas) ganadas y perdidas para cada grupo fue el mismo, trabajando con un intervalo de confianza de 95% en todos los casos (Figura 21). Los genes localizados en cada clona (Anexo3) fueron estudiados, y se encontraron algunos previamente reportados relacionados a CaP (Tabla VI).



**Figura 21.** Perfil genómico característico de CaP agresivo (rojo) y CaP no agresivo (verde). Las barras horizontales para cada clona significan ganancia (hacia la derecha de su línea central) y pérdida (hacia la izquierda).

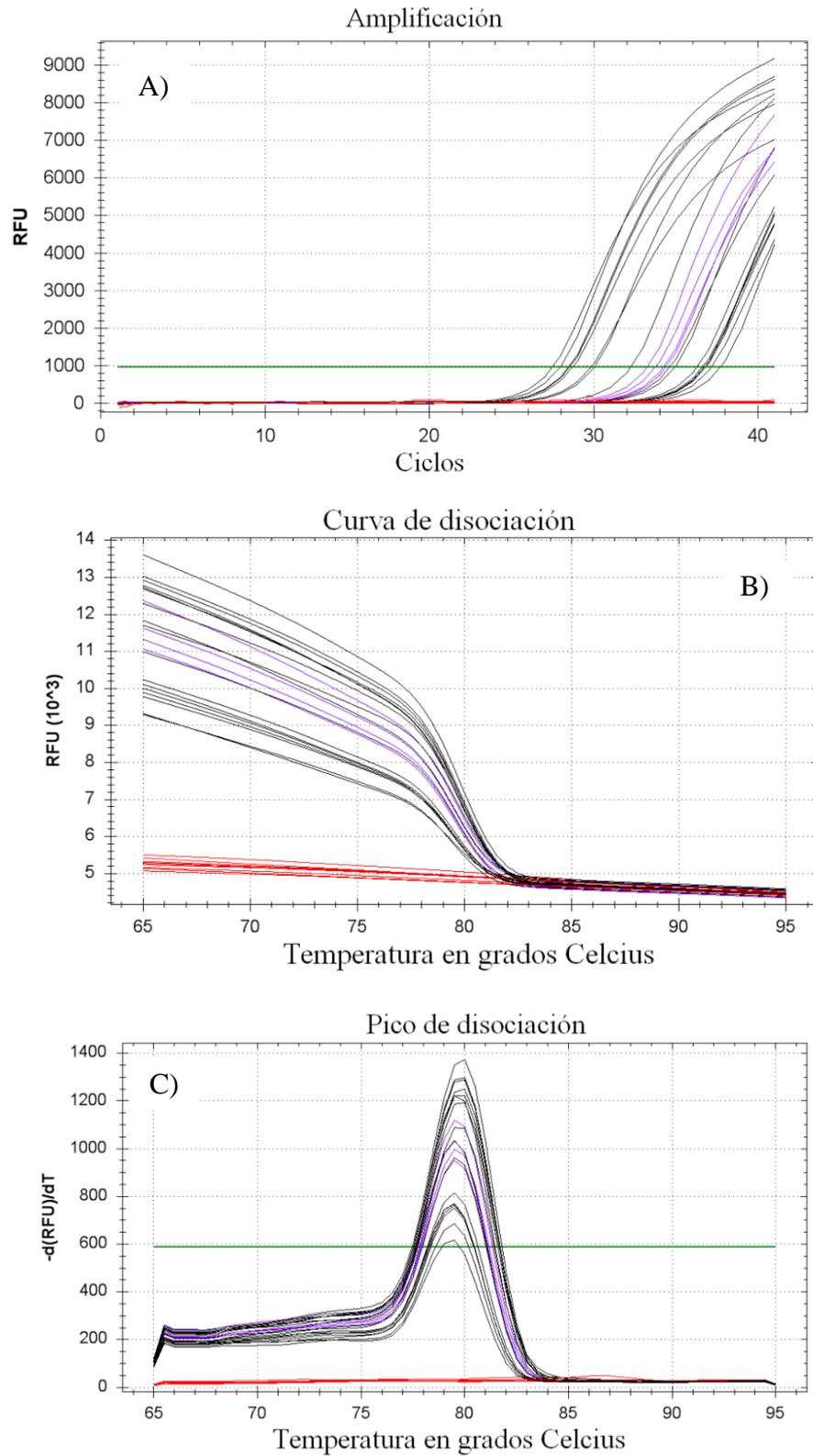
<b>Locus</b>	<b>Gen</b>	<b>Hallazgo</b>	<b>Referencia</b>
<b>5p15.33</b>	<b>TERT</b>	Ganancia asociada a CaP agresivo	Baird y cols, 2010; Marian y cols, 2010.
<b>8q24.21</b>	<b>MYC</b>	Ganancia asociada a CaP de mal pronóstico	Sun y cols, 2007; Ishkanian y cols, 2009.
<b>16p13.3</b>	<b>SSTR5</b>	Sobreexpresión asociada a CaP agresivo	Moricheti D y cols, 2010; Halmos G y cols, 2000
<b>18p11.31</b>	<b>EPB41L3</b>	Pérdida asociada a CaP agresivo	Wong SY y cols, 2007; Bernkopf DB y cols, 2008
<b>13q21.32-q21.33</b>	<b>DACH1</b>	Pérdida asociada a CaP agresivo	Wu K y cols, 2009.
<b>8q24.21</b>	<b>FAM84B,MYC</b>	Sobreexpresión asociada a CaP (SNIPs de susceptibilidad en 8q24)	Ghoussaini M y cols, 2008
<b>8q24.21</b>	<b>DDEF1</b>	sobre-expresión asociado a CaP agresivo	Lin D y cols, 2008
<b>8q22.3</b>	<b>PABPC1</b>	ganancia asociada a CaP agresivo	Van Duin M y cols, 2005

**Tabla VI.** Genes encontrados en este estudio con reportes previos de asociación a CaP.



#### **4.2 BÚSQUEDA DE TMPRSS2:ERG POR PCR - TR.**

Para este estudio de casos y controles se recolectaron un total de 25 muestras de tejido prostático fresco provenientes de pacientes diagnosticados histopatológicamente por BTR como CaP positivos (n =20 casos) y CaP negativos (n = 5 controles), como controles externos se usó la línea celular VCaP (control positivo) y células obtenidas de tejido adiposo humano (control negativo). El análisis por PCR en tiempo real evidenció la presencia de la fusión TMPRSS2:ERG en 15 (75%) de las muestras positivas para CaP (Figura 20 y tabla VII). De las muestras histopatológicamente negativas para CaP (n=5) la fusión TMPRSS2:ERG estuvo presente en dos muestras (Tabla VII). Los resultados obtenidos con los controles externos fueron, como se esperaba, una señal positiva para la línea celular VCaP y una señal negativa para las células de tejido adiposo humano (Figura 22 y tabla VII).



**Figura 22.** A) Gráfica de amplificación, B) curva de disociación y C) pico de disociación de las muestras analizadas por PCR en tiempo real para la presencia de la fusión Tmprss2:ERG (en color negro se observan las muestras positivas, en rojo las negativas y controles externos positivos en morado y negativos en rojo).

Muestra	Edad	Tipo	Antecedentes	Gleason	APE	C (t)	Altura del pico
10	62	Caso	NO	10 (5+5)	300	28.0	1374.50
11	74	Caso	NO	9 (4+5)	141.4	40.1	1374.50
13	82	Caso	NO	9 (4+5)	23.6	28.5	1297.89
19	69	Caso	NO	9 (4+5)	61.2	28.5	1289.30
7	67	Caso	padre	9 (5+4)	2573.0	27.5	1250.58
16	75	Caso	NO	7 (4+3)	23.3	30.1	1223.75
22	78	Caso	NO	8 (4+4)	10.6	32.2	1222.20
5	76	Caso	NO	7 (3+4)	11.0	28.7	1193.25
15	66	Caso	NO	9 (4+5)	171.6	29.8	1088.32
24	52	Caso	NO	Carcinoma	3.6	34.9	1035.78
14	63	Caso	NO	6 (3+3)	54.4	36.3	815.83
8	66	Caso	NO	9 (4+5)	76.0	36.7	771.07
17	60	Caso	NO	9 (5+4)	93.0	36.7	769.52
20	74	Caso	NO	9 (4+5)	109.4	36.6	762.87
5	76	control	NO	NA	9.5	31.1	686.45
9	66	Caso	NO	9 (4+5)	39.0	37.7	617.14
1	71	control	NO	NA	8.0	37.6	595.65
23	68	Caso	NO	8 (4+4)	29.0	NA	0.00
21	53	Caso	NO	7 (3+4)	5.7	NA	0.00
25	83	Caso	Hermano	6 (3+3)	5.2	NA	0.00
4	74	control	NO	NA	4.1	NA	0.00
18	78	Caso	NO	7 (4+3)	3.3	NA	0.00
12	66	Caso	NO	9 (4+5)	2.4	NA	0.00
2	63	control	NO	NA	2.3	NA	0.00
3	65	control	NO	NA	1.1	NA	0.00

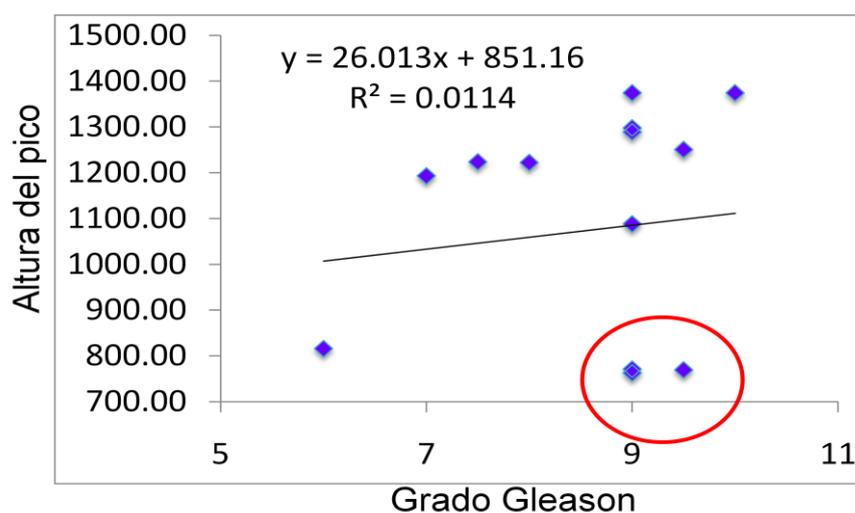
**Tabla VII.** Datos clínicos de las muestras procesadas para la búsqueda de la fusión TMPRSS2:ERG. Un total de 20 casos (color morado) y 5 controles (color rosa), ordenados de mayor a menor según la intensidad de la señal (altura del pico de disociación).

Con el propósito de correlacionar el grado Gleason con la intensidad de la señal (altura del pico), se tuvo que realizar un reajuste en el número de muestras, ya que era necesario prescindir de aquellas cuyos valores no fueran estadísticamente comparables, tales como los controles y la muestra número 24 ya que no poseen un valor de grado Gleason y aquellos casos en los que no se observó señal en la PCR en tiempo real (Tabla VIII).

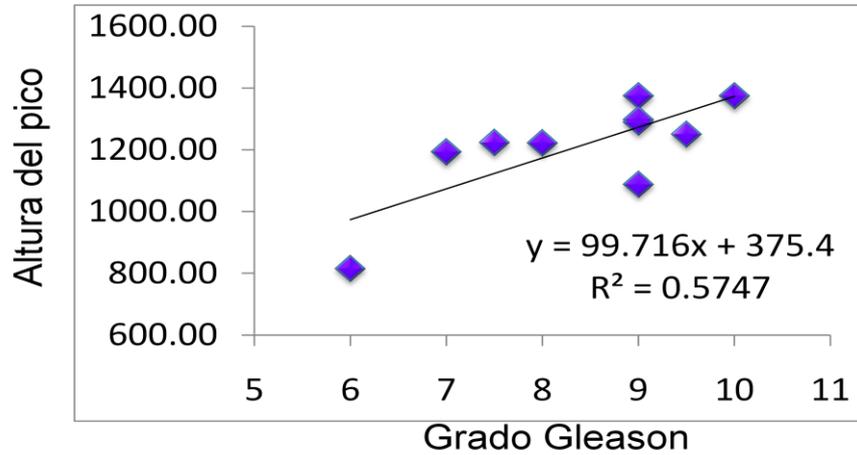
Gleason	Altura del pico
10 (5+5)	1374.50
9 (4+5)	1374.50
9 (4+5)	1297.89
9 (4+5)	1289.30
9 (5+4)	1250.58
7 (4+3)	1223.75
8 (4+4)	1222.20
7 (3+4)	1193.25
9 (4+5)	1088.32
6 (3+3)	815.83
9 (4+5)	771.07
9 (5+4)	769.52
9 (4+5)	762.87
9 (4+5)	617.14

**Tabla VIII.** Valores de grado Gleason y Altura del pico utilizados en el análisis de correlación.

Los datos obtenidos fueron graficados (Figura 23) en una curva de dispersión para corroborar su correlación lineal ( $R^2$ ) y se observó un grupo de datos que no siguen el mismo patrón de distribución (puntos encerrados en círculo rojo en la figura 23). Al eliminar dichos datos, la curva toma más peso estadístico (Figura 24).

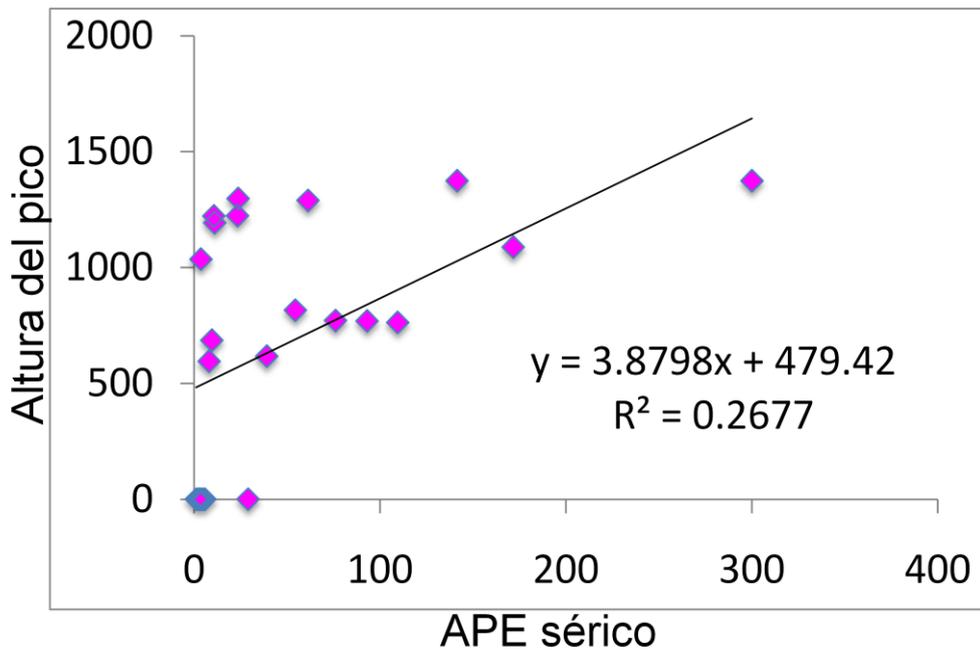


**Figura 23.** Relación entre grado Gleason y altura del pico. Los datos encerrados en el círculo rojo son aquellos que no siguen el mismo patrón de distribución.



**Figura 24.** Relación entre grado Gleason y altura del pico, eliminando los datos que no siguen el mismo patrón de distribución.

De igual forma se observa una tendencia ( $R^2 = 0.2677$ ) al realizar el análisis de correlación a los datos de APE y altura del pico. En este caso se graficaron 24 muestras, ya que el valor de APE en la muestra número 7 excedía el valor promedio por más de 10 desviaciones estándar (Figura 25).



**Figura 25.** Relación entre grado APE sérico y altura del pico.

## CAPÍTULO 5.

### DISCUSIÓN.

En el estudio retrospectivo realizado a tejido prostático embebido en parafina se encontraron diversos rearrreglos cromosómicos (ganancia y pérdida de material genético) de los cuales algunos cuentan con reportes previos de asociación a CaP. Nosotros nos enfocamos en resaltar aquellos loci que nuestro sistema clasificador considera importantes en la distinción entre CaP agresivo y no agresivo (perfil clasificador, Figura 21). Por ejemplo se encontraron ganancias de material genético en las regiones 5p15.33, 8q24.21, 16p13.3, 8q22.3 (loci de los genes TERT, MYC, SSTR5 y PABPC1 respectivamente) que nuestro sistema clasificador considera fuertemente asociadas a CaP agresivo, lo cual concuerda con lo postulado por Baird y cols en el 2010 <sup>(34)</sup> quienes proponen la existencia de una asociación entre variaciones en el locus del gen TERT y predisposición al CaP y otros tipos de cáncer. Por otro lado, en un estudio realizado por Marian y cols. en el 2010 <sup>(35)</sup> también se propone la relación entre la actividad enzimática de la telomerasa y su participación en el crecimiento de células iniciadoras de tumor, las cuales quedan como remanentes durante los diferentes tipos de tratamiento antitumoral en CaP agresivo. Se observó también que la ganancia y pérdida más común en todas las muestras fue en la región 8q y 8p respectivamente, lo cual concuerda con el análisis combinado realizado por Sun y cols en el 2007 <sup>(19)</sup> donde estudiaron 41 reportes de aCGH, sumando un total de 872 muestras de tumor primario de CaP. En este estudio al igual que en el nuestro se destacó la participación del gen MYC en la agresividad tumoral, asociación descrita posteriormente por Ishkanian y cols en 2009 <sup>(20)</sup> quienes en un estudio realizado a 24 pacientes con CaP de riesgo intermedio

observaron una amplificación en la región 8q21.3-24.3 (locus del oncogen c-MYC) en aquellos tumores de comportamiento más agresivo. En el año 2000, Halmos G y cols<sup>(36)</sup> demostraron la aplicabilidad de la somatostatina como adyuvante en la terapia antitumoral en CaP de alto riesgo de recurrencia posterior a la prostatectomía radical en pacientes con CaP y observaron una relación entre la sobreexpresión del gen SSTR5 y el CaP agresivo. Posteriormente en un estudio de expresión, Moricheti D y cols en el 2010<sup>(37)</sup> también observaron la sobreexpresión (aumento en la expresión media) del gen SSTR5 en el grupo de CaP agresivo y una de las hipótesis de dicha sobreexpresión es que podría ser causada por la ganancia de material genético en la región donde se localiza este gen (16p13.3), hipótesis que concuerda con nuestro hallazgo de ganancia en dicha región asociada a CaP agresivo. Algunos autores han propuesto genes como marcadores de progresión tumoral en CaP. Tal es el caso de van Duin M y cols<sup>(38)</sup> quienes en el 2005 analizaron las ganancias y pérdidas más frecuentes dentro del cromosoma 8 y su relación con el CaP y observaron un total de 16 genes relacionados a esta patología de los cuales tres genes se encontraban fuertemente relacionados con la presentación más agresiva del CaP, dichos genes fueron PDP, localizado en 8q22.1 (95 Mb), PABPC1, localizado en 8q22.3 (102 Mb) y KIAA0196, localizado en 8q24.13 (126 Mb); de los cuales destacamos al gen PABPC1 debido a que la ganancia en la región 8q22.3 es (según nuestro clasificador) característica de CaP agresivo. No solo existen reportes de regiones ganadas asociadas a CaP. En el 2007 Wong SY y cols<sup>(39)</sup> postuló a la proteína 4.1B como regulador negativo (supresor) de la progresión del CaP y de la metástasis, por lo tanto una subexpresión de dicha proteína estaría relacionada (positivamente) con la progresión tumoral del CaP, hipótesis que apoyaría un año más tarde Bernkopf DB y cols<sup>(40)</sup> quienes propusieron que una regulación positiva del gen EPB41L3 favorecería considerablemente el tratamiento de CaP, especialmente en CaP

agresivo. Dichos datos reafirman nuestro hallazgo de pérdida en la región 18p11.31 (locus del gen EPB41L3) asociada a CaP agresivo. Otro gen de importancia debido a su participación en el CaP es el gen DACH1, el cual fue reportado en el 2009 por Wu K y cols <sup>(41)</sup> quienes lo postulan como inhibidor de la síntesis de DNA en células tumorales en CaP, por lo tanto una subexpresión de dicho gen causada por una pérdida de material en la región donde este se localiza, evitaría el control del crecimiento tumoral a este nivel y favorecería de esta manera la progresión tumoral. En nuestro estudio encontramos dicha pérdida (13q21.32-q21.33) y fue catalogada como característica de CaP agresivo. En el 2009 Mera H y cols <sup>(42)</sup> describieron el efecto antitumoral directo de la condromodulina-1 (ChM1), proteína codificada por el gen LECT1 (CHM1) cuya localización es 13q14-21 región que en nuestro análisis aparece como pérdida característica de CaP agresivo.

Los tres cambios con mayor fuerza discriminatoria entre CaP agresivo y no agresivo fueron las ganancias (para CaP agresivo) en 16p13.3 y 5p15.33, loci de los genes LMF1, SOX8, SSTR5, C1QTNF8 y SLC6A19, SLC6A18, TERT, CLPTM1L, respectivamente y la pérdida (para CaP agresivo) en 13q21.1, locus de los genes LECT1, PCDH8, OLFM4 y PCDH1, los cuales estamos estudiando para confirmar su participación en el CaP debido a que en la literatura solo se encuentran reportados relacionados a CaP los genes anteriormente mencionados (TERT, LECT1 y SSTR5) por lo tanto deben realizarse estudios posteriores de dichas alteraciones con métodos de mayor resolución para corroborar la participación de dichos genes en el progreso tumoral del CaP. Estos métodos moleculares aumentaran nuestra habilidad para identificar las alteraciones en el número de copias con mayor exactitud, especialmente las alteraciones de menor tamaño, y podrán contribuir valiosamente en el

descubrimiento de genes supresores de tumor y oncogenes en CaP. Por lo anterior podemos inferir que a pesar del alto grado de heterogeneidad del CaP, existen ciertas regiones de pérdida y ganancia dentro del genoma que se pueden asociar con su agresividad. Para confirmar dichos hallazgos y establecer genes como biomarcadores de progreso tumoral es recomendable aumentar la resolución del método de análisis así como el número de muestra, la limitación principal del presente estudio.

Respecto a la búsqueda de la fusión TMPRSS2:ERG en tejido prostático fresco nuestros resultados (15 positivas de 20 totales, 75%) concuerdan con lo descrito por Tomlins SA y cols en el 2005 <sup>(21)</sup> (23 positivas de 29 totales, 79%) quien describió por primera vez dicha fusión y desde entonces tanto la prevalencia como el valor pronóstico de la fusión TMPRSS2:ERG en CaP han sido examinados en múltiples estudios con cierta discrepancia en los resultados. A pesar de que la fusión TMPRSS2:ERG ha sido reportada comúnmente con una prevalencia entre 40 -50% en tumores de próstata, el rango ha variado entre 25-60% (Nam y cols, 2007; Setlur y cols, 2008; Sun y cols, 2008; Yoshimoto y cols, 2008; Hofer y cols, 2009; Mosquera y cols, 2009) <sup>(43-48)</sup>. Las técnicas usadas para la detección de la fusión TMPRSS2:ERG, nuevos productos potenciales de la fusión y la diferencia genética entre la población de los cohortes pueden contribuir para dicha discrepancia. Esto es reforzado por el descubrimiento de Mosquera y cols en el 2009 <sup>(48)</sup> quienes proponen que la población caucásica posee una prevalencia menor de la fusión TMPRSS2:ERG y esto puede explicar el 22.6% de prevalencia observado por Setlur y cols en el 2008 <sup>(44)</sup> en un cohorte Sueco de 455 casos de CaP. Independientemente de la causa de la variación en la prevalencia, estudios posteriores son necesarios para definir dicho parámetro. De igual forma el valor pronóstico de la fusión TMPRSS2:ERG ha sido tema de discusión, ya que unos autores afirman que la presencia de dicha fusión confiere un peor pronóstico (Nam y cols, 2007;



Attard y cols 2008; Clark y cols, 2008)<sup>(43,49,50)</sup> y otros niegan esta relación (Gopalan y cols, 2009)<sup>(51)</sup>. Estas discrepancias pueden explicarse de una manera similar a los factores que afectan la prevalencia (raza/etnicidad del cohorte, técnica de detección de la fusión) y también están sujetas al momento específico en el que se realiza el estudio (recurrencia bioquímica y supervivencia general). La complejidad que contribuye al discordante valor pronóstico de la fusión TMPRSS2:ERG fue mencionada por FitzGerald y cols en el 2008<sup>(52)</sup> quienes reportaron que la presencia de la fusión TMPRSS2:ERG no resulta en una reducción de la supervivencia en los pacientes con CaP, pero la combinación entre presencia de la fusión y amplificación del gen fusionado confiere un peor pronóstico. Este estudio no demuestra una relación directa bien establecida entre las variantes grado Gleason y APE con la altura del pico (intensidad de la señal), sin embargo se observa una tendencia que podría tomar fuerza estadística aumentando el número de muestras analizadas.

## **CAPÍTULO 6.**

### **CONCLUSIÓN.**

Este trabajo marca el inicio de una clasificación del CaP basada en perfiles genómicos y abre las puertas a futuras investigaciones para definir biomarcadores de progreso y pronóstico tumoral y de esta forma confirmar el papel real que la fusión TMPRSS2:ERG desempeña en el tejido tumoral en pacientes con CaP en nuestra población, ya que es el primer trabajo de este tipo realizado en una población mestiza. De igual forma al ser el primer análisis de microarreglos genómicos en cohortes clínicamente bien establecidos (CaP agresivo y no agresivo) en nuestra población, nos permite comparar resultados con aquellos trabajos realizados en poblaciones caucásicas y de esta forma establecer diferencias y/o similitudes cruciales para un mejor abordaje de esta patología.

El principal logro de este trabajo fue la caracterización global inicial de las alteraciones genómicas presentes en tejido prostático tumoral con lo cual se pudo desarrollar lo que consideramos hoy en día el primer perfil genómico clasificador de CaP capaz de distinguir un tumor no agresivo de uno agresivo con una tasa de error de clasificación de 0.3, con el fin de hacer el diagnóstico más preciso y de esta manera ajustar las modalidades terapéuticas a las necesidades del paciente mejorando así su calidad de vida.

## Referencias

1. Organización Mundial de la Salud "OMS", World Health Organization "WHO". [En línea]. Disponible (<http://www.who.int/en/>). 13 de Julio de 2010.
2. Organización Mundial de la Salud "OMS", World Health Organization "WHO". [En línea]. Disponible (<http://www.who.int/topics/cancer/en/index.html>) 20 de Julio de 2010.
3. Organización Mundial de la Salud "OMS". World Health Organization "WHO". International Agency for Research on Cancer "IARC". [En línea]. Disponible (<http://www.iarc.fr/>). 8 de Agosto de 2010.
4. GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [En línea]. Disponible (<http://globocan.iarc.fr>) 10 de Agosto de 2010.
5. Dennis LK y cols, **Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed**, *Endocrine-related cancer*, 2003, 10(2):225-59.
6. Hayes RB y cols, **Sexual behavior, STDs and risks for prostate cancer**, *Br J cancer*, 2000, 82(3):718-25.
7. Fernandez L y cols, **Sexual behavior, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba**, *Int J Epidemiol*, 2005, 34(1):193-7.
8. Vincent T DeVita TSL, Steven A Rosenberg, **Cancers of the Genitourinary System: Cancer of the Prostate In: *Cancer: Principles & Practice of Oncology*** Edited by Ronald A DePinho RAW, 7th edn: Wolters Kluwer Lippincott Williams and Wilkins.
9. Meng FJ y cols, **The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate**, *Cancer Epidemiol Biomarkers*, 2002, 11(3):305-9.



10. St. John Providence Health System, [En línea]. Disponible (<http://www.stjohnprovidence.org/VanElslander/CancerTreatment/ProstateCancer/>). 3 de Agosto de 2010.
11. Instituto Nacional del Cáncer, [En línea]. Disponible (<http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/prostata/Patient/page2>), 11 de Septiembre de 2010
12. Instituto Nacional de Estadística e Informática "INEGI". [En línea]. Disponible (<http://www.inegi.org.mx/>) 25 de Julio de 2010.
13. Dirección General de Epidemiología, Dirección de Vigilancia Epidemiológica de Enfermedades No Transmisibles, [En línea]. Disponible (<http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>) 11 de septiembre de 2010.
14. du Manoir S y cols, **Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization.** Hum. Genet, 1993, 90(6):590-610.
15. Kallioniemi A y cols **Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors.** Science, 1992, 258(5083):818-21.
16. Pinkel D y cols, **Array comparative genomic hybridization and its applications in cancer,** Nature Genetics, 2005, 37 Suppl:S11-7.
17. Yano S y cols, **Accuracy of an array comparative genomic hybridization (CGH) technique in detecting DNA copy number aberrations: comparison with conventional CGH and loss of heterozygosity analysis in prostate cancer,** Cancer Genet Cytogenet, 2004, 150(2):122-7.
18. Holcomb IN y cols, **Comparative Analyses of Chromosome Alterations in Soft-Tissue Metastases within and across Patients with Castration-Resistant Prostate Cancer,** Cancer Res, 2009, 69(19):7793-802.

19. Sun J y cols, **DNA Copy Number Alterations in ProstateCancers: A Combined Analysis of Published CGH Studies**, Prostate, 2007, 67(7):692-700.
20. Ishkanian AS y cols, **High-Resolution Array CGH Identifies Novel Regions of Genomic Alterationin Intermediate-Risk Prostate Cancer**, Prostate, 2009, 69(10):1091-100.
21. Tomlins SA y cols, **Recurrent Fusion of TMPRSS2 and ETS transcription factor genes in prostate cáncer**, Science, 2005, 310(5748):644-8.
22. Aftar DE y cols. **Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia**, Cancer Res, 2001, 61(4):1686-92.
23. Petrovics G y cols, **Frequent overexpression of ETS-related gene-1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome**, Oncogene, 2005, 24(23):3847-52.
24. Seth A y cols, **ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer**, Eur J Cancer, 2005, (16):2462-78.
25. Yoshimoto M y cols, **Three-color FISH analysis of TMPRSS2/ERG fusions in prostate cancer indicates that genomic microdeletion of chromosome 21 is associated with rearrangement**, Neoplasia, 2006, 8(6):465-9.
26. Tu JJ y cols, **Gene fusions between TMPRSS2 and ETS family genes in prostate cancer: frequency and transcript variant analysis by RT-PCR and FISH on paraffin-embedded tissues**, Mod Pathol, 2007, 20(9):921-8.
27. Perner S y cols, **TMPRSS2:ERG fusion-associated deletions provide insight into the heterogeneity of prostate cancer**, Cancer Res, 2006, 66(17):8337-41.
28. Mehra R y cols, **Heterogeneity of TMPRSS2 gene rearrangements in multifocal prostate adenocarcinoma: molecular evidence for an independent group of diseases**, Cancer Res, 2007, 67(17):7991-5.

29. Tomlins SA y cols, **TMPRSS2:ETV4 gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer**, Cancer Res, 2006, 66(7):3396-400.
30. Clark J y cols, **Diversity of TMPRSS2-ERG fusion transcripts in the human prostate**, Oncogene, 2007, 26(18):2667-73.
31. Liu W y cols, **Multiple genomic alterations on 21q22 predict various TMPRSS2/ERG fusion transcripts in human prostate cancers**, Genes Chromosomes Cancer, 2007, 46(11):972-80.
32. Wang J y cols, **Expression of variant TMPRSS2/ERG fusion messenger RNAs is associated with aggressive prostate cancer**, Cancer Res, 2006, 66(17):8347-51.
33. Narod SA y cols, **Fusion in the ETS gene family and prostate cancer**, Br J Cancer, 2008, 99(6):847-51.
34. Baird DM y cols, **Variation at the TERT locus and predisposition for cancer**, Expert Rev Mol Med, 2010, 12:e16.
35. Marian CO y cols, **The effects of telomerase inhibition on prostate tumor-initiating cells**, Int J Cancer, 2010, 127(2):321-31.
36. Halmos G y cols, **High expression of somatostatin receptors and messenger ribonucleic acid for its receptor subtypes in organ-confined and locally advanced human prostate cancers**, J Clin Endocrinol Metab, 2000, 85(7):2564-71.
37. Moricheti D y cols, **Immunohistochemical expression and localization of somatostatin receptor subtypes in prostate cancer with neuroendocrine differentiation**, Int J Immunopathol Pharmacol, 2010, 23(2):511-22.
38. van Duin M y cols, **High-resolution array comparative genomic hybridization of chromosome arm 8q: evaluation of genetic progression markers for prostate cancer**, Genes Chromosomes Cancer, 2005, 44(4):438-49.

39. Wong SY y cols, **Protein 4.1B suppresses prostate cancer progression and metastasis**, Proc Natl Acad Sci U S A. 2007, 104(31):12784-9.
40. Bernkopf DB y cols, **Potential role of EPB41L3 (protein 4.1B/Dal-1) as a target for treatment of advanced prostate cancer**. Expert Opin Ther Targets, 2008, 12(7):845-53.
41. Wu K y cols, **The cell fate determination factor dachshund inhibits androgen receptor signaling and prostate cancer cellular growth**, Cancer Res, 2009, 69(8):3347-55.
42. Mera H y cols, **Chondromodulin-1 directly suppresses growth of human cancer cells**, BMC Cancer, 2009, 9:166.
43. Nam RK y cols, **Expression of the TMPRSS2:ERG fusion gene predicts cancer recurrence after surgery for localized prostate cancer**, British journal of cancer, 2007, 97(12):1690-5.
44. Setlur SR, **Estrogen-dependent signaling in a molecularly distinct subclass of aggressive prostate cancer**, J Natl Cancer Inst, 2008, 100(11):815-25.
45. Yoshimoto M, **Absence of TMPRSS2.ERG fusions and PTEN losses in prostate cancer is associated with a favorable outcome**, Mod Pathol, 2008, (12):1451-60.
46. Sun C y cols, **TMPRSS2-ERG fusion, a common genomic alteration in prostate cancer activates C-MYC and abrogates prostate epithelial differentiation**. Oncogene, 2008, 27(40):5348-53.
47. Hofer MD y cols, **Genome-wide linkage analysis of TMPRSS2-ERG fusion in familial prostate cancer**, Cancer Res, 2009, 69(2):640-6.
48. Mosquera JM y cols, **Prevalence of TMPRSS2-ERG fusion prostate cancer among men undergoing prostate biopsy in the United States**, Cancer Res, 2009, 15(14):4706-11.

49. Attard G y cols, **Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer**, *Oncogene*, 2008, 27(3):253-63.
50. Clark JP y cols, **Performance of a single assay for both type III and type VI TMPRSS2:ERG fusions in noninvasive prediction of prostate biopsy outcome**, *Clin Chem*, 2008, 54(12):2007-17.
51. Gopaland A y cols, **TMPRSS2-ERG gene fusion is not associated with outcome in patients treated by prostatectomy**, *Cancer Res*, 2009, 69(4):1400-6.
52. FitzGerald LM y cols, **Association of TMPRSS2-ERG gene fusion with clinical characteristics and outcomes: results from a population-based study of prostate cancer**, *BMC Cancer*, 2008, 8:230.
53. Laxman y cols, **Noninvasive Detection of TMPRSS2:ERG Fusion Transcripts in the Urine of Men with Prostate Cancer**, *Neoplasia*, 2006, 8(10):885-8.