

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DEL GEN GSTP1 Y DE LOS PATRONES DE METILACIÓN DE LOS GENES RASSF1, RAR β , GSTP1, APC Y CDH1 COMO POSIBLES BIOMARCADORES EN CÁNCER DE PRÓSTATA EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES DE ANTIOQUIA

ASESORES

JUAN JOSÉ BUILES GÓMEZ

ISABEL CRISTINA ORTIZ TRUJILLO

ESTUDIANTE

ANDREA JOHANNA MANRIQUE RINCÓN

UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

INSTITUTO DE BIOLOGÍA

MEDELLÍN,

2013

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. MARCO TEÓRICO	3
4. OBJETIVOS	18
General	18
Específicos	18
5. MÉTODOS	18
4.2 Criterios de inclusión	18
4.3 Criterios de exclusión	19
4.4 Obtención de muestras sólidas	19
4.5 Obtención de muestras líquidas	19
4.6 Criterios para la selección del método de extracción del ADN	19
4.7 Estandarización de los protocolos de extracción ADN	19
4.8 Cuantificación de ADN	20
4.9 Amplificación de STRs autosómicos	20
4.10 Conversión con Bisulfito	20
4.11 Reacción en cadena de la polimerasa	20
4.12 Electroforesis	21
4.13 Análisis de resultados	22
4.14 Análisis estadístico	22
5. RESULTADOS	22
5.1 Estandarización de métodos de extracción.	23
5.2 Patrones de metilación de los genes RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1	26
5.3 Polimorfismo del gen de la Glutation S Transferasa Pi-1	29
6. DISCUSIÓN	30
6.1 Estandarización de métodos de extracción.	30
6.2 Patrones de metilación de los genes RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1	31
6.3 Polimorfismo del gen de la Glutation S Transferasa Pi-1	33
7. CONCLUSIONES	34
8. REFERENCIAS	35

1. RESUMEN

El cáncer de próstata es una de las principales causas de muerte en hombres a nivel mundial. Dadas sus características biológicas y las dificultades para su detección temprana, se hace necesario encontrar nuevos biomarcadores que permitan una detección más eficaz con la finalidad de disminuir los índices de mortalidad. En este trabajo se analizaron los patrones de metilación de cinco genes APC, GSTP1, CDH1, RASSF1a y RAR β que están involucrados en diferentes etapas del desarrollo de esta enfermedad. Dado que la enzima GSTP1 es una de las más importantes en el transcurso de la enfermedad, también se determinó un polimorfismo que consiste en el cambio de una A por G en el nucleótido 313 y que resulta en una sustitución (Ile105Val) en el sitio de unión al sustrato de la GSTP1 que reduce la actividad catalítica de esta enzima. La comparación entre los patrones de metilación y el polimorfismo se realizó en 96 muestras de biopsias de la IPS Universitaria con diagnóstico de adenocarcinoma, hiperplasia o tejido benigno (normal). En este estudio se estandarizaron tres protocolos de extracción de ADN de muestras de orina y biopsia. En los pacientes diagnosticados con adenocarcinoma se encontró la frecuencia más alta de genes metilados en comparación con los pacientes que tenían hiperplasia benigna de próstata y tejido normal, siendo el gen de la GSTP1 el que presentaba la frecuencia más alta de metilación (38%), para estos pacientes. El 90% de los pacientes con adenocarcinoma eran heterocigotos (ile/val) para la enzima GSTP1. En conclusión, este estudio permitió la estandarización de métodos específicos de extracción de ADN a partir de biopsias embebidas en parafina y de muestras de orina, además, la utilización de biomarcadores útiles en el diagnóstico temprano del cáncer de próstata.

PALABRAS CLAVE: Adenocarcinoma, hiperplasia, bioindicador, epigenética, PSA.

2. ABSTRACT

Prostate cancer is a leading cause of death in men worldwide. Given their biological characteristics and difficulties in early detection, it is necessary to find new biomarkers to achieve a more effective detection in order to reduce mortality rates. In this paper we analyzed the methylation patterns of five genes APC, GSTP1, CDH1, RASSF1A and RAR β that are involved in different development stages of of this disease. Since the enzyme GSTP1 is one of the most important in the course of this disease, we also determined a polymorphism in the enzyme that consist in a change of A to G at nucleotide 313, resulting in a substitution (Ile105Val) at the site of substrate binding GSTP1, reducing the catalytic activity of this enzyme. Comparisons of the the methylation patterns and the polymorphism was performed on 96 samples of prostate biopsies from the Universitary IPS diagnosed with adenocarcinoma, benign hyperplasia, or benign tissue (normal). In this study three protocols for DNA extraction were standardized from urine and biopsy. In patients diagnosed with adenocarcinoma was found the highest frequency of methylated genes compared to patients with benign prostatic hyperplasia and normal tissue, the GSTP1 gene had the highest frequency of methylation (38%), for these patients. 90% of patients with adenocarcinoma were heterozygous (ile / val) for the enzyme GSTP1. In conclusion, this study allowed standardization of specific methods of DNA extraction from paraffin embedded biopsy and urine samples as well, the use of biomarkers is useful in the early diagnosis of prostate cancer.

KEYWORDS: adenocarcinoma, hyperplasia, biomarker, epigenetic, PSA.

3. MARCO TEÓRICO

Introducción

Según la Sociedad Americana de Cáncer, esta patología se puede definir como un conjunto de enfermedades caracterizadas por la división celular irregular, fuera de espacio, tiempo y control que puede ocurrir en cualquier tipo de célula (1). Siendo considerada una de las principales causas de muerte en todo el mundo (2).

Las células que se transforman presentan modificaciones que alteran sus procesos de división celular, cambios de tipo genético donde se evidencian alteraciones e inestabilidad cromosómicas, que resultan en mutaciones, generación de proteínas quiméricas, pérdida y ganancia completa de cromosomas, entre otras, y alteraciones epigenéticas que incluyen cambios en la metilación del Ácido Desoxirribonucleico (ADN), cambios en el código epigenético que hace referencia a las modificaciones en las histonas y alteración de los Ácidos Ribonucleotidos (ARNs) no codificantes, que van a influir principalmente en la expresión génica (3). Estas células, aparte de las alteraciones genéticas y epigenéticas, que conllevan al aumento en la división celular también presentan ausencia de apoptosis, diferenciación celular, metabolismo alterado, inmortalización y capacidad para invadir otros órganos (metástasis) (4).

El cáncer es una de las enfermedades más estudiadas en todo el mundo, especialmente su biología molecular, es por esto que se han realizado estudios de tipo genómico que han permitido determinar los principales genes que contribuyen a su desarrollo, bien sea por su presencia (oncogenes) o por su ausencia (genes supresores de tumores) (5, 6).

Genes supresores de tumores y oncogenes

En el desarrollo del cáncer muchos genes se ven afectados por alteraciones en la secuencia del ADN o en la metilación del mismo, sin embargo, los que más

contribuyen a su progresión son los oncogenes que promueven el desarrollo del tumor al cambiar o aumentar su actividad y los genes supresores de tumores que presentan insuficiencia o pérdida total en su función (7). Generalmente, en el desarrollo del cáncer se presenta activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores (8). Existen más de 250 oncogenes en nuestro genoma, algunos se encuentran inactivos en forma de protooncogenes que se activan cuando ocurren inserciones o mutaciones en su secuencia de ADN, la mayoría se derivan de retrovirus y su nombre se debe a que después de su activación o por una sobre expresión se produce cáncer (9). Por otro lado, los genes supresores de tumores se encuentran mutados en la mayoría de los cánceres heredados, estos genes son reguladores del ciclo celular y su ausencia estimula la división celular a pesar de la acumulación de mutaciones (4). La hipermetilación de estos genes, que está asociada con el silenciamiento de la transcripción, es reconocida como una característica fundamental en la patogénesis del cáncer (10).

Alfred Knudson en 1971 estudiando Retinoblastoma planteó la hipótesis de los dos golpes, que indica que se necesitan mutaciones en los dos loci de un gen involucrado en el ciclo celular para que se presente la enfermedad, posteriormente, se determinó que estos genes son los llamados supresores de tumores (7). Esta hipótesis tuvo gran acogida y actualmente, se ha extendido al terreno de la epigenética donde se considera que las alteraciones epigenéticas que modifiquen la expresión de los genes involucrados en cáncer (oncogenes y genes supresores de tumores) y en general el funcionamiento de la cromatina, van a ser un desencadenante para que se presente la enfermedad al alterar el funcionamiento de estos genes (11).

Epigenética y cáncer

La epigenética comprende los cambios heredables que se presentan en la expresión génica sin alterar la secuencia de ADN, éstos son llevados a cabo por medio de los mecanismos epigenéticos que incluyen modificación de histonas, RNAs no codificantes, metilación de ADN y remodelación de cromatina (12).

La unión entre cáncer y epigenética se estableció desde los estudios de metilación de ADN y la expresión génica en 1983 (13). Se ha encontrado un creciente número de cambios epigenéticos asociados con diversos oncogenes y genes supresores de tumores, al igual que mutaciones en numerosos genes de regulación epigenética, demostrando la participación de la epigenética en el cáncer (14).

Las modificaciones de las histonas tienen roles cruciales en el control de la actividad génica y la arquitectura nuclear. En ciertos residuos de las colas de las histonas se presentan patrones de modificaciones como metilación, acetilación, fosforilación, entre otros, que tienen el potencial de afectar la estructura y la integridad del genoma y de interrumpir patrones de expresión génica como se observa en cáncer (15).

Otro mecanismo epigenético son los RNAs no codificantes de los cuales los más estudiados son los micro RNAs (miRNAs), la desregulación de éstos en cáncer puede suceder a través de cambios epigenéticos (por ejemplo, hipermetilación de islas CpG en el caso del miR-200 familia 39) y alteraciones genéticas que pueden afectar la producción del transcrito primario de miRNA, su proceso de maduración y/o las interacciones con el blanco. Otros RNAs no codificantes que se ven desregulados en cáncer son los que tienen interacciones con proteínas PIWI (piRNAs), los componentes de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares (snoRNAs) y los RNAs no codificantes largos (lncRNAs) (16).

Metilación del ADN en humanos

La metilación del ADN se presenta generalmente en el carbono 5 de las citosinas en el contexto CpG. Aproximadamente entre el 3% y el 6% de las citosinas en el genoma normal humano están metiladas y las regiones ricas en CpG se conocen como islas CpG que se expanden desde la región terminal 5' (promotor, región no traducida y el primer exón) con tamaños entre 500 a 2000 pb. Estas islas se

encuentran en las áreas promotoras génicas en aproximadamente la mitad de los genes humanos conocidos (17–19). La metilación de ADN es llevada a cabo por las enzimas ADN metiltransferasas, la de mantenimiento (DNMT1) y las que metilan de novo las citocinas (DNAMT3a y DNAMT3b), todas indispensables para la regulación de la expresión génica de los genes (20)

Metilación en cáncer

Las primeras indicaciones de una unión entre epigenética y cáncer fueron derivadas de estudios de expresión génica y metilación en tejido normal y tejido con cáncer (21). En células normales los promotores de los genes que se deben expresar, se encuentran hipometilados, lo que corresponde con la transcripción de estos genes en presencia de los activadores transcripcionales, mientras que los promotores de genes que no se deben expresar, por que son genes de desarrollo, oncogenes o regiones altamente repetitivas se encuentran hipermetilados es decir silenciados transcripcionalmente (22).

En cáncer, en cambio, el silenciamiento de la transcripción de los genes supresores de tumores se encuentra asociado con una hipermetilación de las islas CpG lo que contituye un indicador típico de una célula cancerígena (23). En las células tumorales existe un estado de hipometilación del ADN genómico pero de hipermetilación en las islas CpG. La hipermetilación de estas áreas produce represión transcripcional debido a un cambio estructural de la cromatina, que la hace inaccesible a los factores de transcripción. Este fenómeno se ha observado en varios tipos de tumores donde se expresarían patrones de metilación específicos (19). Para estudiar los patrones de metilación existen diferentes técnicas (Figura 1). Cada una de ellas tiene diferentes ventajas y desventajas.

La secuenciación y pirosecuenciación son las técnicas más sensibles y permiten determinar el número de citocinas metiladas en una región o en todo el genoma, sin embargo son las de más alto costo.

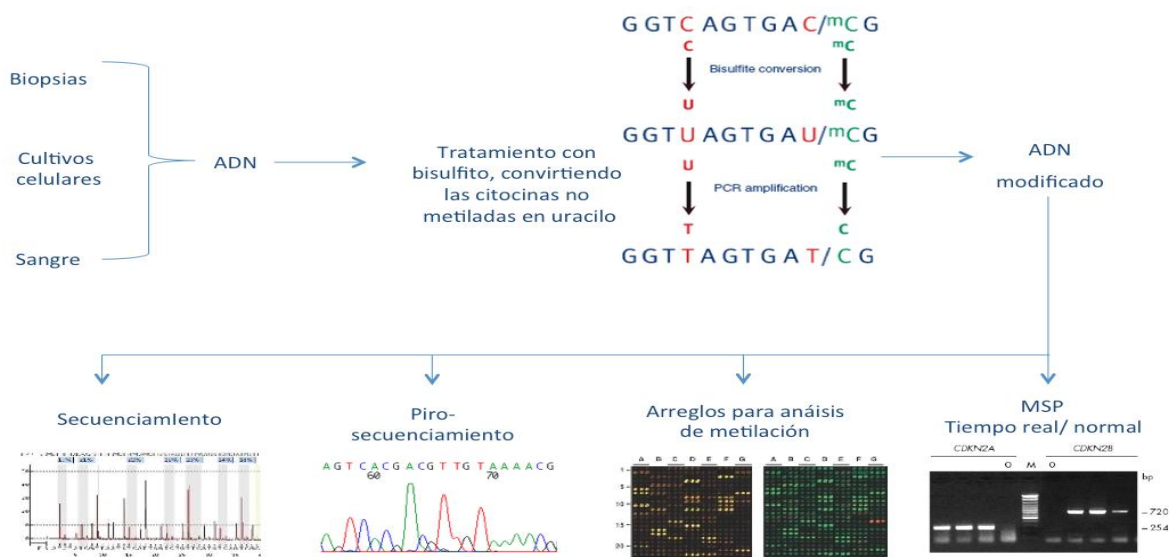


Figura 1. Métodos más usados para hacer análisis de metilación de ADN después de convertir las muestras con bisulfito.

Los microarreglos y la PCR metil específica analizan los dos posibles estados más severos de la metilación, hipometilación e hipermetilación. Los microarreglos son más costosos, pero permiten el análisis de varias secuencias de ADN al mismo tiempo, actualmente, son muy utilizados para diagnosticar cáncer de colon, donde se analizan paneles de hasta 50 genes para ver su estado de metilación. La PCR metil específica es la técnica más económica y consiste en la amplificación diferencial por la metilación de una secuencia. Para esta reacción se diseñan dos parejas de primers para ADN convertido con bisulfito uno para la secuencia que se encuentre totalmente hipermetilada y otro donde se encuentre totalmente desmetilada. Cada reacción se monta por separado y sólo se observará amplificación en regiones que estén totalmente metiladas o totalmente desmetiladas para el número de citosinas analizadas (24).

Epidemiología del cáncer

Al menos una persona de tres desarrollará cáncer y uno de cada cuatro hombres y una de cada cinco mujeres morirán por esta causa (25), esta es la razón principal por la que el cáncer se ha vuelto un problema de salud pública y se ha convertido en un reto bajar la incidencia y las tasas de mortalidad. Debido a sus

características celulares, el cáncer se puede presentar en diversos órganos pero su aparición va a depender de factores heredables y factores ambientales que son muy variables dependiendo de la población de origen del paciente, su estilo de vida e inclusive su ubicación geográfica (2).

El cáncer es una enfermedad de alta incidencia mundial, cerca de 12.7 millones de casos de cáncer y 7.6 millones de muertes por cáncer se estima ocurrieron en el año 2008 en todo el mundo (Figura 2) (26). Existen diferencias, sobre todo en la mortalidad, entre países desarrollados y países en desarrollo, esto se debe al acceso a la salud que va a influir en el diagnóstico temprano, el tratamiento adecuado y las condiciones de los pacientes (27).

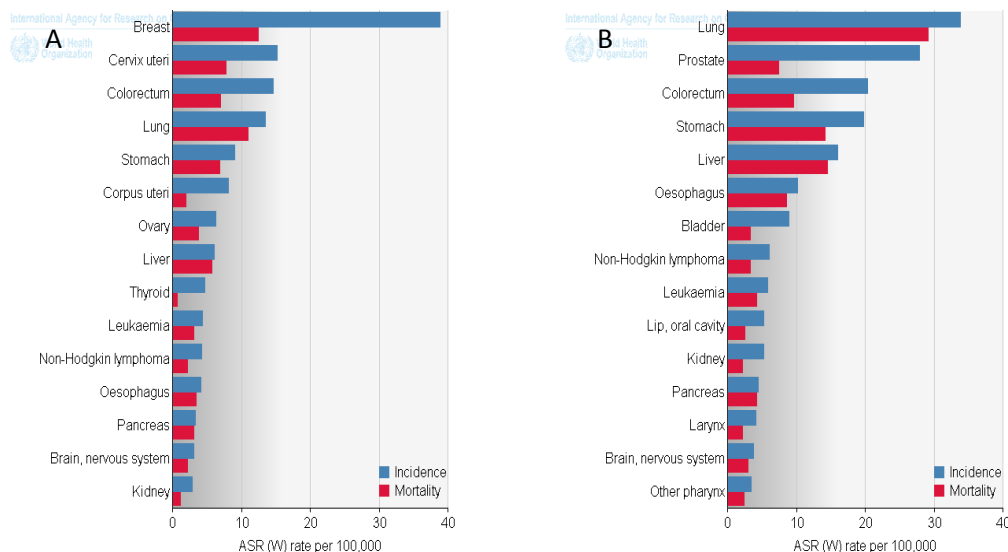


Figura 2. Incidencia y mortalidad mundial del cáncer para mujeres (A) y hombres (B) según GLOBOCAN, 2008 (26).

En el año 2010 el cáncer fue determinado como la segunda causa de muerte en Estados Unidos por el Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Center for Diseases Control) (28) y en Colombia el panorama no es diferente, de acuerdo con los registros del Instituto Nacional de Cancerología (INC) de Colombia, en el año 2010, se registraron 6.313 casos nuevos y 1.101

muerres; 488 hombres y 613 mujeres, principalmente por cáncer de estómago y próstata en hombres y de mama y de útero en mujeres (29).

Hiperplasia y cáncer de próstata

La próstata es una glándula de 3 cm, que forma parte del aparato urinario masculino, queda ubicada en frente del recto y debajo de la vejiga rodeando la uretra. Su estructura histológica consiste principalmente en dos capas, la basal y la luminal. Las células de la capa basal tienen poco citoplasma, poseen receptores de factores de crecimiento, carecen de receptores de andrógenos y expresan Bcl-2, una proteína muy importante para la vía intrínseca de la apoptosis. Las células basales son consideradas las células madre y una pequeña subpoblación presenta receptores de andrógenos, que se pueden diferenciar a células. Por otra parte, las células luminales expresan receptores de andrógenos y producen secreciones de marcadores como citoqueratina 8 y 18 (30,31). Cuando se presentan patologías en la próstata se realiza inicialmente la prueba del antígeno prostático sanguíneo (PSA), seguido por un tacto rectal y finalmente una biopsia de próstata (Figura 3), que es el paso decisivo donde de acuerdo a las características histológicas del tejido se determinará el diagnóstico.

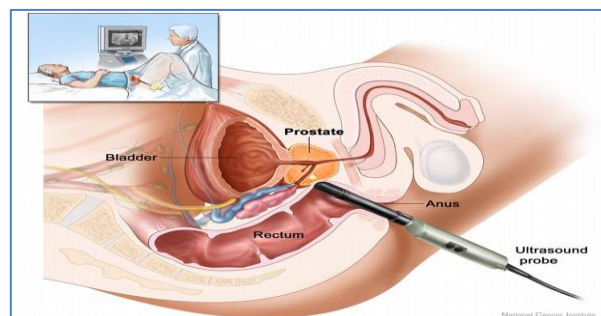


Figura 3. Esquema de la realización de una biopsia de próstata, se puede ver la ubicación de la glándula respecto al aparato genitourinario.

La próstata va aumentando de tamaño con la edad, muchas veces presentando un aumento mayor al esperado, lo que se conoce como Hiperplasia Benigna de Próstata (BPH). En la BPH la próstata aumenta su tamaño presionando la uretra haciendo que la vejiga comience a contraerse aún con pequeñas cantidades de orina, lo que puede causar incomodidad al paciente, no se considera una lesión pre-neoplásica y es un proceso común al envejecimiento (8). Si el diagnóstico no es normal, ni de hiperplasia, entonces se pueden presentar las siguientes lesiones pre cancerígenas (Figura 4); la primera lesión que aparece es la atrofia proliferativa inflamatoria (PIA), ésta es la precursora de la neoplasia intraepitelial prostática (PIN), que incluye células atípicas luminales con lamina basal y no evidencia de ruptura en la membrana basal, va de bajo (LGPIN) a alto grado (HGPIN), que generalmente es el que se reporta en patología. Después de esto la acumulación de alteraciones genómicas y epigenéticas resultan en la transformación cancerígena. Al iniciar el proceso de transformación a partir de dediferenciación glandular se evidencian cambios en la unión al sustrato, la expresión de receptores e invasión estromal (30). El cáncer de próstata puede ser clasificado como heredado o esporádico; heredado tiene en total un porcentaje de aparición de 85% y los análisis genéticos han mostrado una asociación con una

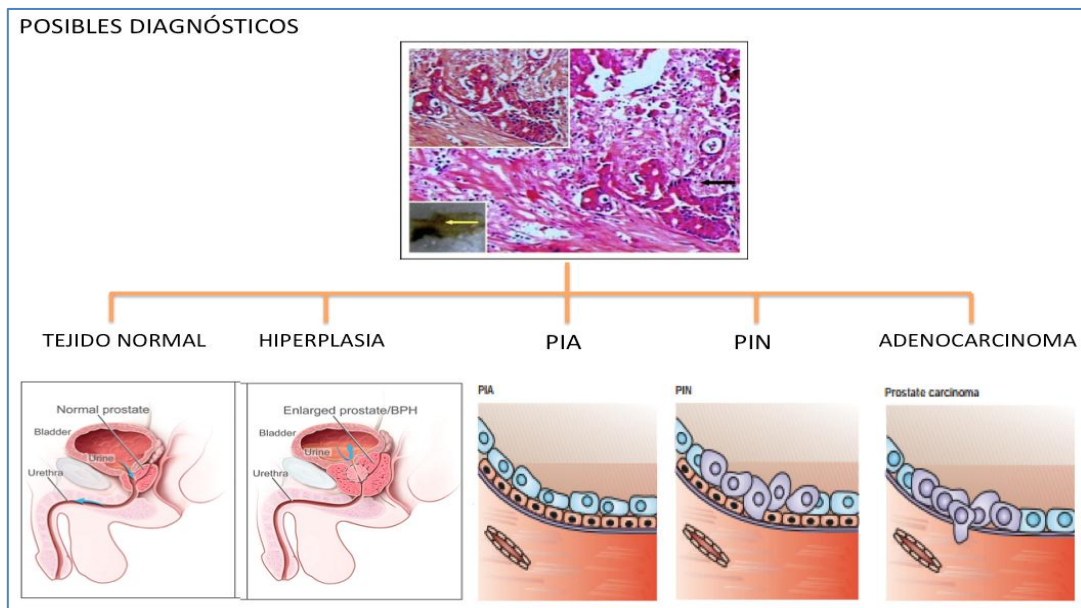


Figura 4. Esquema de los posibles diagnósticos que se pueden presentar en una biopsia de próstata.

herencia autosómica dominante, el esporádico en los cánceres de aparición temprana tiene un porcentaje de 43% (32).

Existe un modelo para clasificar el avance de la enfermedad basado en la pérdida progresiva de los patrones de la glándula, este sistema se conoce como el grado de Gleason y fue creado en 1966 por el doctor Gleason quien creó una estratificación de uno a cinco de acuerdo a los cambios de morfología del tejido, dividiéndose en una suma de dos números, que son los valores de evaluación de los dos tejidos más prevalentes en la muestra. Estos números van aumentando a medida que se presenta mayor desdiferenciación celular, presencia de angiogénesis y posibles células metastásicas (Figura 5) (33). Las alteraciones epigenéticas en el cáncer de próstata ocurren en los estadios tempranos de la transformación y continúan siendo detectables a través de la progresión e invasión metastásica de la enfermedad, lo que las hace potenciales biomarcadores para diagnóstico, identificación del estadio, pronóstico y estratificación de riesgo (34).

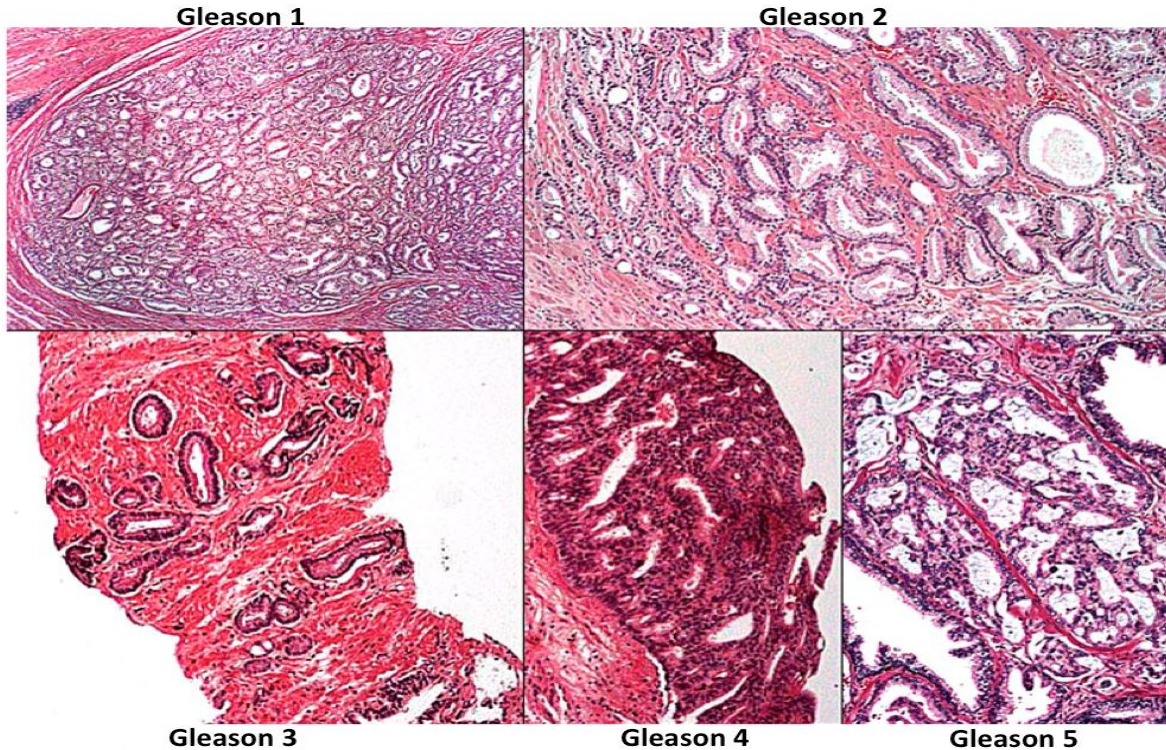


Figura 5. Muestras histológicas clasificadas según los 5 grados de Gleason (33).

El cáncer de próstata presenta problemas en su detección temprana, se diagnostica inicialmente por la medición del antígeno específico de próstata (PSA), un método que se utiliza desde 1944, fecha de aprobación por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) (35). Sin embargo, procesos comunes y no malignos como la hiperplasia benigna de próstata y la inflamación de la próstata presentan PSA elevado, limitando la especificidad en el diagnóstico de cáncer (36).

Dado que los primeros cambios que se presentan en las células cancerígenas de próstata son en general pérdida de cromosomas y presencia de mecanismos que conllevan a una disminución en la expresión génica y en particular al silenciamiento de genes por hipermetilación de promotores, los ensayos de detección de hipermetilación en determinados genes aparecen como una gran herramienta en este cáncer al poder ser usados como biomarcadores. Además, la característica de reversibilidad de los cambios epigenéticos, entre ellos la metilación, también aumentan las expectativas para el uso de éstos como blancos terapéuticos.

La habilidad para diagnosticar y tratar más eficientemente a los pacientes, usando medicamentos dirigidos a los defectos moleculares que están presentes en tumores particulares cambiará el manejo clínico del cáncer, en una forma más personalizada y eficiente (37,38). Los cambios en la metilación del ADN son un sello característico de los cánceres humanos, en el cáncer de próstata la hipermetilación de genes supresores de tumores y genes asociados al desarrollo y progreso de la enfermedad son una alteración común, detectables por técnicas como la PCR metil específica que permite amplificar diferencialmente el ADN de acuerdo a un patrón de metilación (39).

Factores de riesgo del cáncer de próstata

Los principales factores de riesgo en el cáncer de próstata incluyen:

- **Edad y ubicación geográfica:** el cáncer de próstata en hombres menores de 50 años representa el 0.1% de todos los pacientes afectados, entre los 50 y los 65 se encuentra el 15% de la población, mientras el resto de pacientes se ubica después de los 85., Sin embargo, cuando se hacen estudios en hombres de 40 años se han encontrado con mucha frecuencia lesiones cancerosas (40). En países como China, India y Japón se presenta este cáncer con una incidencia de 1.9 casos por 100.000 habitantes, en contraste, Estados Unidos presenta la incidencia más alta con 272 casos por 100.000 habitantes. Estudios poblacionales han mostrado que cuando hay migración desde Japón hasta Estados Unidos aumenta considerablemente el riesgo de padecer este tipo de cáncer (41).
- **Genético:** en 1960 se determinó que el riesgo de padecer cáncer de próstata aumentaba cuando se tenía un familiar de primer grado de consanguinidad afectado (42). Además, la población afro-descendiente sufre más frecuentemente de este cáncer en comparación con otras poblaciones (43), la incidencia de este cáncer en población afro-descendiente es 34% más alta, la mortalidad es dos veces mayor y el diagnóstico es menos favorable en comparación con la población de caucásicos (44).
- **Infección e inflamación:** la próstata está expuesta a agentes infecciosos vía urinaria y sexual, existe una asociación entre enfermedades de transmisión sexual, infecciones con citomegalovirus, herpes tipo 8, papiloma tipo 16 y hepatitis B y C y prostatitis y el desarrollo del cáncer. Existen oncovirus, como el XMRV, asociados al desarrollo del cáncer de próstata, una asociación que se encuentra en los tumores más agresivos (45).

- Andrógenos: afectan la proliferación del epitelio luminal, los más importantes son testosterona circulante y dihidrotestosterona en tejidos, su función es mediada por el receptor de andrógenos (AR) el cual cumple un papel determinante en la progresión del cáncer (40).
- Dieta y ejercicio: el alto consumo de grasa animal y de aminos heterocíclicas, con un bajo consumo de vegetales y de vitamina D, la obesidad por interacción entre la resistencia a la insulina e inflamación, el aumento de leptina, interleucina-6 (IL6) y el factor de necrosis tumoral aumentan el riesgo a desarrollar cáncer de próstata (46).
- Estilo de vida: el cigarrillo es una fuente de cadmio que aumenta el estrés oxidativo y los niveles circulantes de andrógenos. El alcohol tiene una relación dependiente de la dosis, para aquellos pacientes que consumen más de tres raciones de alcohol por día. Sin embargo, se ha detectado un efecto protector de 1 a 3 copas de vino a la semana (47).

Polimorfismo del gen de la GSTP1

Un polimorfismo A-G en el nucleótido 313 resulta en una sustitución aminoacídica (Ile105Val) en el sitio de unión al substrato en la GSTP1. La sustitución por la valina que es más hidrofóbica resulta en alteraciones en la actividad catalítica de la proteína (Figura 6). Este residuo está próximo al sitio de unión hidrofóbico para sustratos electrofílicos y se ha demostrado que la valina presenta actividad y afinidad alterada para este tipo de sustratos (48). Para realizar este análisis primero se realizó una amplificación del fragmento donde se puede encontrar la sustitución y posteriormente se digirió con la enzima de restricción por una hora a 37°C.

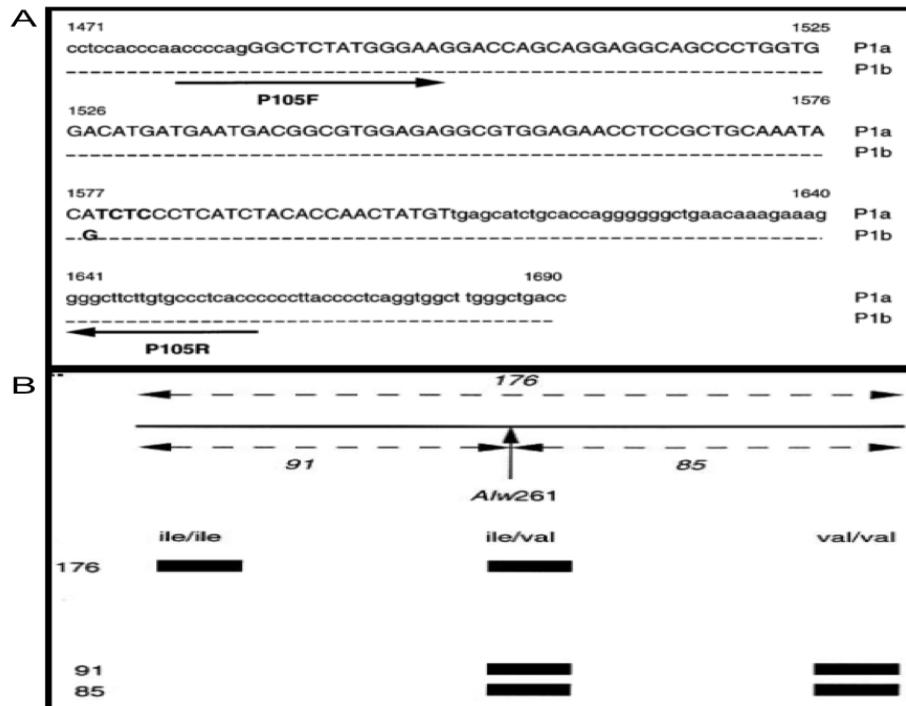


Figura 6. Secuencia del gen de la GSTP1 donde se encuentra el sitio de sustitución que establece el cambio de isoleucina a valina (A). Esquema de corte de la enzima de restricción Alw261 sobre el fragmento amplificado con los tres posibles resultados que se pueden obtener (B) (48).

Genes y patrones de metilación

Para hacer análisis de los patrones de metilación se seleccionan genes que se consideren susceptibles a presentar cambios en su expresión debido a un proceso patológico. En el caso de cáncer, los oncogenes y los genes supresor de tumores se han observado sobre-expresados y silentes, respectivamente (9). Estos estados se asocian con hipometilación e hipermetilación de las islas CpG en las regiones promotoras del mismo.

Los genes escogidos en este estudio (RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1) son genes supresores de tumores, seleccionados de acuerdo a una revisión de literatura donde se evidenciaba su rol en el desarrollo de la enfermedad

Glutathione S-transferase Pi-1 (GSTP1). Ubicado en el cromosoma 11q13.2. La región del promotor del gen de esta enzima de detoxificación (GSTP1) se encuentra hipermetilada en la mayoría (70→90%) de los carcinomas primarios, pero no en tejido prostático normal o hiperplasia benigna de la próstata (8, 39, 49). Los altos niveles de metilación en el promotor de la GSTP1 están asociados con el paso de PIN a carcinoma (50). Cuando este gen está silenciado, las células de la próstata se vuelven más vulnerables a alteraciones debido a las especies moleculares altamente reactivas que incluyen superóxido, peróxido de hidrógeno y óxido nítrico que son secretados por las células de PIA y pueden dañar el ADN de las células epiteliales (51).

La relación que surge entre la baja expresión de esta proteína y el desarrollo del cáncer, genera preguntas sobre si algunos polimorfismos pueden tener un efecto directo sobre todo el proceso de carcinogénesis, en los estudios se han encontrado resultados contradictorios que no han logrado reproducirse, por esta razón se analizaron no sólo los patrones de metilación de este gen, sino también los polimorfismos que presenta en su sitio catalítico, de tal forma que se pueda identificar las posibles relaciones existentes, no sólo para diagnóstico, sino también para pronóstico y estratificación del cáncer de próstata (52).

Adenomatosis Polyposis Coli (APC). Es un gen supresor de tumores, ubicado en el cromosoma 5q21, involucrado en la regulación negativa de la ruta WNT/h-catenina. APC fue inicialmente identificado en cáncer colorectal, pero está inactivado en varios cánceres, incluyendo próstata (6), inicialmente fue descrito debido a que mutaciones en este gen ocasionan la enfermedad autosómica dominante poliposis adenomatosa familiar (FAP) y a que mutaciones somáticas en este gen aparecen en cerca del 80% de los tumores esporádicos colorectales (53).

Ras Association Domain Family 1 isoform a (RASSF1a). Es un gen supresor de tumores ubicado en el cromosoma 3p21.3 que interactúa con Cdc20, un activador del complejo promotor de anafase, resultando en una inhibición de la

actividad de los complejos y evitando la progresión mitótica. Su expresión se correlaciona con actividad proapoptótica. La inactivación de este gen es observada frecuentemente en numerosos tumores sólidos y cánceres epiteliales como el de próstata (54,55), es uno de los genes que se ha encontrado metilado en la mayoría de cánceres humanos y se considera como uno de los primeros sucesos detectables en el proceso de tumorigénesis. RASSF1a contiene muchos dominios importantes para su papel como proteína supresora de tumores (56).

Retinoic Acid Receptor β (RAR β). Ubicado en el cromosoma 3p24, el **RAR β** es un miembro de la súper familia de receptores nucleares de hormonas tiroideas y esteroideas. Este receptor se localiza en el citoplasma y en compartimentos subnucleares, se une al ácido retinoico, la forma biológicamente activa de la vitamina A, que actúa como intermediario de la señalización celular en procesos de morfogénesis embrionaria, crecimiento celular y diferenciación. Para este gen, se han encontrado alteraciones en los patrones de metilación en cáncer de próstata (54).

Cadherina 1 (CDH1). Ubicado en el cromosoma 16q22.1, es una glicoproteína de adhesión célula-célula dependiente de calcio, perteneciente a la familia de las cadherinas, se han asociado mutaciones y alteración en los patrones de metilación del gen CHD1 en diversos tipos de cánceres (gástrico, de mama, colorectal, tiroideo, ovárico y de próstata). La pérdida de la función parece contribuir a la progresión del cáncer por un incremento de la proliferación celular, de la invasión y de la metástasis (19).

Dados los problemas existentes con el diagnóstico del cáncer de próstata y su alta incidencia y mortalidad, decidimos estudiar los patrones de metilación de los genes mencionados y el polimorfismo de la GSTP-1 en muestras de pacientes con hiperplasia, tejido benigno y adenocarcinoma del Departamento de Antioquia.

4. OBJETIVOS

General

Determinar las diferencias que puedan existir entre los patrones de metilación de los genes RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1 y los polimorfismos del gen GSTP1 en muestras de biopsia, de un grupo de pacientes del Departamento de Antioquia con hiperplasia, adenocarcinoma de próstata y tejido benigno.

Específicos

- Estandarizar un método sencillo, rápido y económico para la extracción de ADN de muestras de biopsia y orina.
- Establecer las posibles diferencias entre los patrones de metilación de los genes RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1 por medio de conversión con bisulfito del ADN y PCR-metil específica en las muestras de biopsia de los pacientes con adenocarcinoma de próstata, hiperplasia de próstata y tejido benigno.
- Establecer los polimorfismos del gen GSTP1 para las muestras de biopsia de los pacientes con adenocarcinoma de próstata, hiperplasia de próstata y tejido benigno.

5. MÉTODOS

5.1 Población de estudio

96 pacientes de la IPS universitaria cuya biopsia ha sido diagnosticada como adenocarcinoma, hiperplasia o tejido benigno.

5.2 Criterios de inclusión

- Individuos sanos cuyos resultados de biopsia de próstata indican tejido benigno.
- Pacientes diagnosticados por biopsia con hiperplasia de próstata.

- Pacientes diagnosticados por biopsia con adenocarcinoma de próstata.

5.3 Criterios de exclusión

Individuos sometidos a tratamientos como quimioterapia, radioterapia, castración (química o física).

5.4 Obtención de muestras sólidas

Las muestras histológicas se obtuvieron a partir de micro disección de tejidos que fueron obtenidos por biopsias practicadas en la IPS Universitaria de la Universidad de Antioquia.

5.5 Obtención de muestras líquidas

Para los pacientes sanos se utilizó la primera orina del día dado que presenta un mayor número de células. Se centrifugó y del precipitado se extrajo el ADN.

5.6 Criterios para la selección del método de extracción del ADN

- Concentración de ADN
- Amplificación de STRs por PCR

5.7 Estandarización de los protocolos de extracción ADN

Para las muestras de orina se estandarizó un protocolo de extracción usando como referencia el micro método de extracción por Salting-Out (57), este método fue modificado aumentando los tiempos de centrifugación y evitando la adición de la solución A que contiene (sucrosa, tris HCL 5M, MgCl₂).

Para las muestras de biopsia embebidas en parafina se estandarizó un protocolo de desparafinización por calentamiento y centrifugación con agua, después de tres ciclos de este tratamiento el tejido quedó limpio y se realizó la extracción por CHELEX al 30% (Biorad ®).

5.8 Cuantificación de ADN

La cuantificación del ADN se realizó en un Nanodrop (Thermo Scientific ®) a 260nm.

5.9 Amplificación de STRs autosómicos

Se comparó para cada individuo la genotipificación de cuatro STRs autosómicos en las muestras epiteliales de la mucosa bucal (protocolo validado en el Laboratorio Genes Ltda.) y en las muestras de orina que fueron tomadas de individuos sanos (25). Una vez comprobado que en las muestras de orina se obtenía el mismo genotipo que en las muestras de células bucales obtenidas de pacientes sanos, se procedió a hacer una comparación entre las muestras de orina y las de biopsia de los pacientes de los que se obtuvo finalmente el mismo genotipo, confirmando el éxito en la extracción y amplificación.

5.10 Conversión con Bisulfito

Se realizó siguiendo las especificaciones para la conversión con bisulfito del kit EpiTech (Qiagen ®). El ADN extraído es primero tratado con bisulfito bajo un ciclo de calentamiento en el termociclador de cinco horas, posteriormente se realizan lavados y se procede a hacer la desulfonatación y elución. Como resultado todas las citosinas que se encontraban metiladas permanecen como citosinas y aquellas que se encontraban desmetiladas son convertidas en uracilo.

5.11 Reacción en cadena de la polimerasa

Ensayos de metilación. Para la PCR metil-específica, que consiste en utilizar dos parejas de primers para amplificar diferencialmente el mismo segmento del ADN convertido de acuerdo a la metilación del ADN, se utilizó un estuche de PCR múltiplex (2X Qiagen Multiplex PCR Kit), adicionando 0.5-5 ng de ADN en un volumen final de reacción de 10 µl. Todos los primers en la reacción de PCR tenían una concentración de 0.2 µM (Tabla 1). Las condiciones de amplificación fueron: pre-incubación por 15 min a 95°C; seguido por 10 ciclos de 30 s a 94°C, 90

s a 60°C, 60 s a 72°C y 20 ciclos de 30 s a 94°C, 90 s a 58°C, y 60 s a 72 °C; con una incubación final de 60 min en 72°C.

Tabla 1. Secuencias de primers para análisis de metilación de promotores en cáncer de próstata.

PROMOTOR		FORWARD	REVERSE	REFERENCE
RASSF1	METILADO	GGGTTTTGCGAGAGCGCG	GCTAACAAACGCGAACCG	(58-68)2)
	NO METILADO	GGTTTTGTGAGAGTGTGTTTAG	CACTAACAAACACAAACCAAAC	(58,61-64,66,67)1)
RAR β	METILADO	TCGAGAACGCGAGCGATTCCG	GACCAATCCAACCGAAACGA	(60,69-80)5)
	NO METILADO	TTGAGAATGTGAGTGATTGA	AACCAATCCAACCAAAACAA	(69,70,72,73,76-79)3)
GSTP1	METILADO	TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC	GCCCCAATACTAAATCAGCAGC	(58,60,79,81-96)4)
	NO METILADO	GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT	CCACCCCAATACTAAATCACAACA	(58,79,83-88,90-97)4)
CDH1	METILADO	GGTGAATTTTGTAGTTAATTAGCGGTAC	CATAACTAACCGAAAACGCCG	(60,95,98-103)2)
	NO METILADO	GGTAGGTGAATTTTGTAGTTAATTAGTGGTA	ACCCATAACTAACCAAAAACACCA	(95,98,99,101,103)2)
APC	METILADO	TATTGCGGAGTGCGGGTC	TCGACGAACTCCCGACGA	(59-61,93-96,104-111)7)
	NO METILADO	GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT	CCAATCAACAAACTCCCAACAA	(58,61,79,93-96,105,106,109,110)6)

Análisis de variantes del gen GSTP1. Para el análisis del polimorfismo se utilizó el kit de Thermo Maxima Hot Start Mix, con condiciones de amplificación de 95°C 5 minutos, 30 ciclos de 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, 94°C por 30 segundos y finalmente 72°C por 5 minutos. Se utilizaron los primers GSTP1-F ACCCCAGGGCTCTATGGGAA y GSTP1-R TGAGGGCACAAGAAGCCCCT y el producto amplificado fue digerido con la enzima de restricción Alw126 (BsmA-1 en la nueva nomenclatura) generando dos productos diferentes como se explicó en el marco teórico (112).

5.12 Electroforesis

La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida al 4% en cámara vertical y para evidenciar y analizar los amplificados se usó el método de tinción con Nitrato de Plata usado en el laboratorio Genes Ltda.

5.13 Análisis de resultados

Los geles fueron leídos teniendo en cuenta la escalera de peso molecular ILS 600 de Applied Biosystems de 1000pb y como control positivo para el análisis de metilación se utilizó el EpiTect control DNA set (Quiagen) que contiene ADN convertido con bisulfito totalmente metilado, ADN convertido con bisulfito totalmente desmetilado y ADN no convertido con bisulfito.

5.14 Análisis estadístico

Se calculó el índice de metilación, que corresponde a la relación entre el número total de genes metilados y el número total de genes analizados, con la finalidad de conocer los alcances totales de la metilación en el conjunto de genes estudiados.

Las poblaciones se compararon con un test exacto de Fisher con $p < 0.05$. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa R versión 3.0, el programa Arlequin versión 3.5 y el programa estadístico Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 13. Todos los datos epidemiológicos, clínicos y de laboratorio que puedan ser de interés en el análisis de los resultados, así como todos los datos arrojados por esta investigación fueron almacenados en una base de datos en Excel (Microsoft® office Excel).

6. RESULTADOS

6.1 Estandarización de los métodos de extracción de ADN de muestras de orina y biopsias.

La fase de desparafinización para las muestras de biopsia consistió de varios ciclos de calentamiento y centrifugación que removieron completamente la parafina del tejido. La concentración de ADN extraído de este tejido fue alta y su amplificación buena tanto para cada marcador autosómico como para las pruebas subsiguientes.

a) Concentración de ADN

El primer criterio de selección de los protocolos de extracción fue la concentración de ADN obtenida de las muestras de orina, citocepillos y biopsias de hombres sanos y pacientes (Figura 7) a una absorbancia de 260nm.

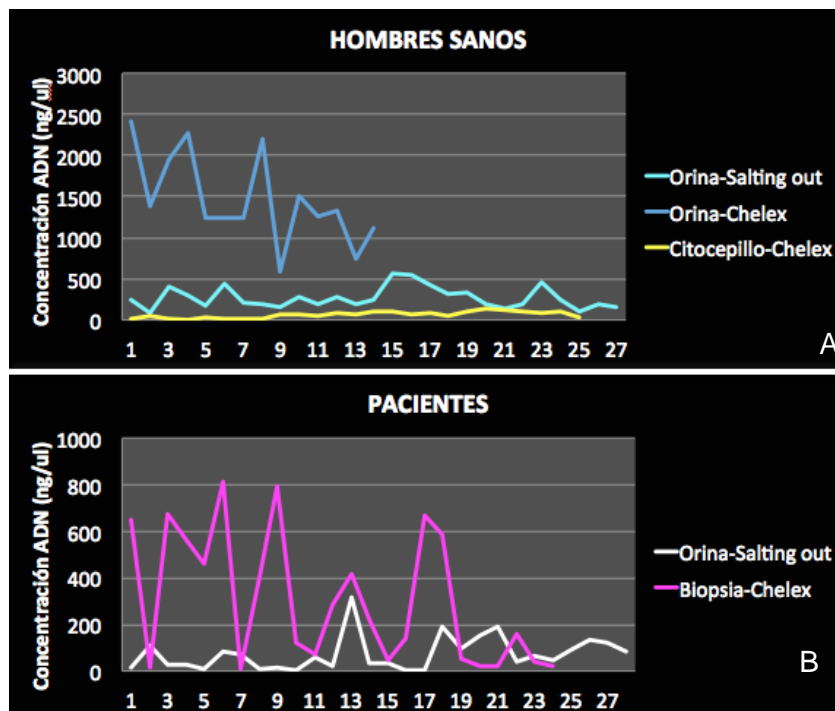


Figura 7 Concentración de ADN (ng/μl) en muestras de hombres sanos (A) y en muestras de pacientes (B).

Al comparar las concentraciones obtenidas de las diferentes muestras, se encontró que el ADN de las muestras de orina de hombres sanos y biopsias de próstata embebidas en parafina y extraídas con Chelex presentaron las concentraciones más altas. Las muestras con la concentración de ADN más baja fueron los citocepillos extraídos con Chelex y las orinas extraídas por Salting-Out (Figura 8).

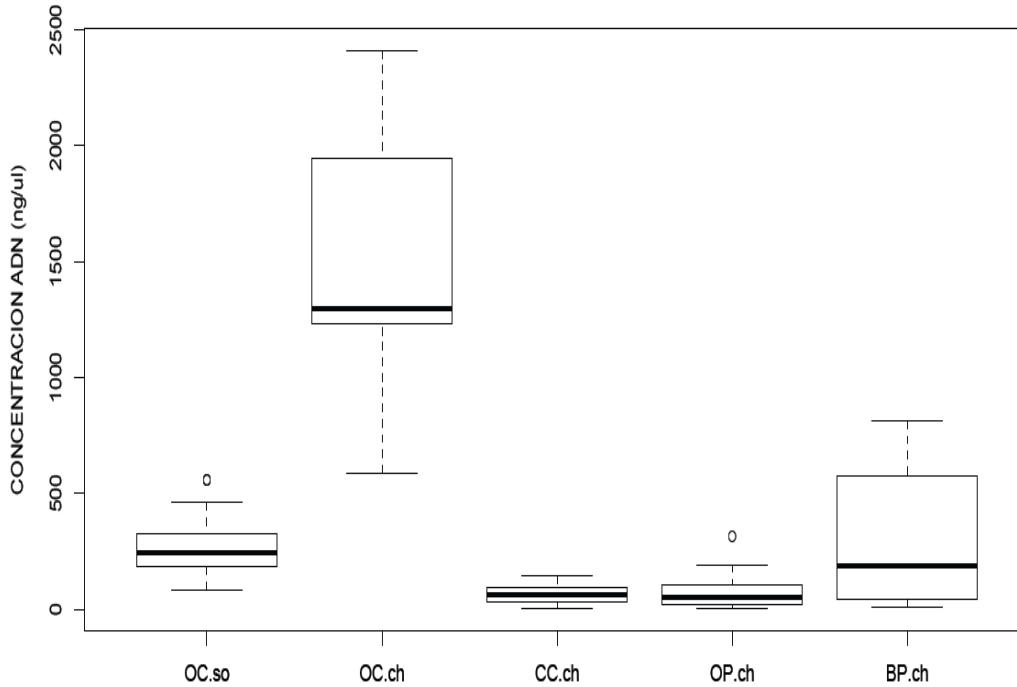


Figura 8. Concentración de ADN expresado en ng/ μ l para muestras de orina de controles (OC), citocepillos de controles (CC), orina de pacientes (OP) y biopsias de próstata de pacientes (BP), por los métodos de Salting Out (so) y Chelex (ch).

b) Amplificación de STRs autosómicos

Posterior a la cuantificación de ADN, se realizó una PCR de cuatro STRs autosómicos (CSF1PO, TPOX, TH01 y VWA) en geles de poliacrilamida al 4% teñidos con Nitrato de Plata. Las muestras que presentaron el mayor éxito de amplificación (entendido como el número de marcadores amplificados para todas las muestras sobre el total de marcadores) fueron los citocepillos (células bucales) con un 100%, y las que presentan el menor éxito de amplificación fueron las orinas con un 57%, ambas muestras extraídas con Chelex, (Tabla 2).

Tabla 2 Amplificación (A) del ADN para cada una de las muestras extraídas con los diferentes métodos.

Método de Extracción	Tipo de Muestra	Individuo	E.A (%)
CHELEX	Células bucales	Hombres Sanos	100
	Orina	Hombres Sanos	57
	Biopsias	Pacientes	64
SALTING OUT	Orina	Hombres sanos	78
	orina	Pacientes	62

E.A. Eficiencia en la amplificación

De acuerdo con estos resultados de concentración y de eficiencia en la amplificación se seleccionaron tres protocolos de extracción (Figura 9) que fueron utilizados para realizar la extracción del ADN de todas las muestras de este estudio a un muy bajo costo y sin la utilización de kits comerciales. Esta estandarización fue presentada como un poster en el XXIV Congreso de la Sociedad Internacional de Genética Forense (ISFG) en Viena, Austria en el año 2011; en el XII Congreso Nacional y en el VI Congreso Internacional de Genética Humana en Santa Marta en el año 2012. Actualmente, se encuentra en proceso de publicación como comunicación breve en la Revista Mexicana de Urología.

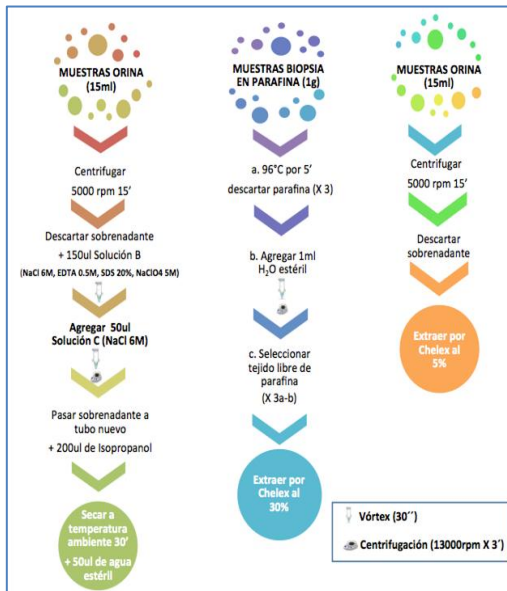


Figura 9. Protocolos seleccionados para la extracción de ADN de las muestras de orina y biopsias a partir de la modificación de los protocolos de Chelex y Salting Out utilizados en el Laboratorio Genes Ltda.

6.2 Patrones de metilación de los genes RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1.

De las 96 muestras analizadas, 39 (40.6%) muestras tenían diagnóstico de adenocarcinoma de próstata, 35 (36.4%) de hiperplasia y 23 (23.9%) fueron clasificadas como normales al no presentar diagnóstico de hiperplasia ni de adenocarcinoma, estos diagnósticos serán tomados de aquí en adelante como poblaciones para realizar los análisis.

Después de realizar la PCR metil específica se determinaron las frecuencias de metilación para cada uno de los genes estudiados en todas las poblaciones (Figura 10). La población que presentó la mayor frecuencia de genes metilados fue la de adenocarcinoma y la que presentó la menor frecuencia fue la población normal.

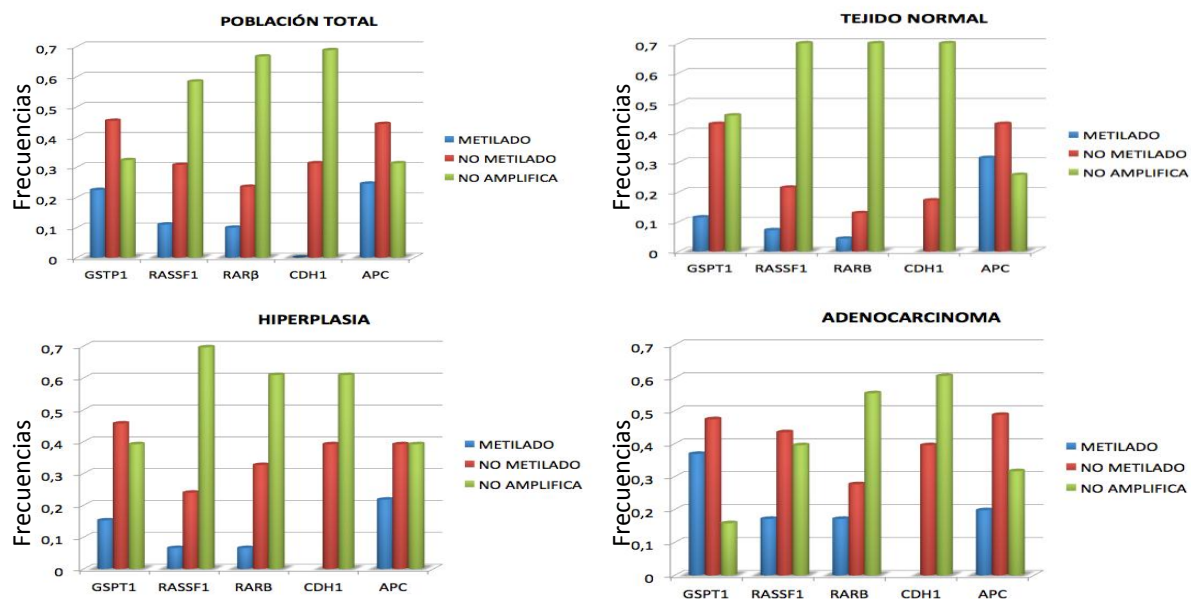


Figura 10. Frecuencias de metilación para los genes GSTP1, RASSF1a, RAR β , CDH1 y APC en las poblaciones total, normal, hiperplasia y adenocarcinoma.

Todas aquellas muestras que no mostraron amplificación para ninguno de los primers (metilado y no metilado) se consideraron como muestras “sin amplificación” para ese gen. En todos los genes se encontraron muestras que no

amplificaron. El porcentaje más alto de no amplificación se presentó para los genes RAR β y CDH1. Sin embargo, ninguna muestra presentó ausencia de amplificación para la totalidad de los marcadores.

Al analizar de forma conjunta los individuos de las poblaciones de hiperplasia y normales, se observó que los genes RASSF1, RAR β y CDH1 presentaron el porcentaje más alto de muestras que no amplificaron. Mientras los genes GSTP1 y APC se encuentran no metilados en la mayoría de las muestras de esta población (Figura 11).

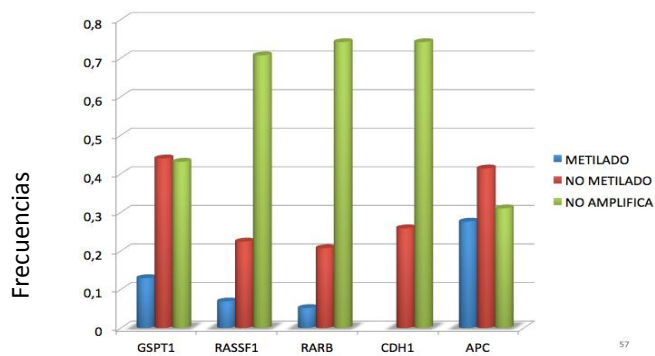


Figura 11. Frecuencias de metilación para los genes GSTP1, RASSF1a, RAR β , CDH1 y APC para la población normal más la de hiperplasia.

En la población con adenocarcinoma (Figura 12) se observó que entre el 55 y el 60% de los individuos no presentaron amplificación para los genes RAR β y CDH1. El resto de genes presentó una mayor frecuencia de metilación comparada con las poblaciones normales + hiperplasia. Además, tuvieron el mayor número de individuos que amplificaron ambos marcadores (metilados y no metilados).

El gen GSTP1 presentó el número más alto de muestras metiladas (36%) seguido por los genes RASSF1 (16%) y RAR β (15%). El gen CDH1 no se encuentra metilado para ninguna muestra en este estudio y el gen APC mantiene niveles altos de metilación y no metilación para todas las poblaciones.

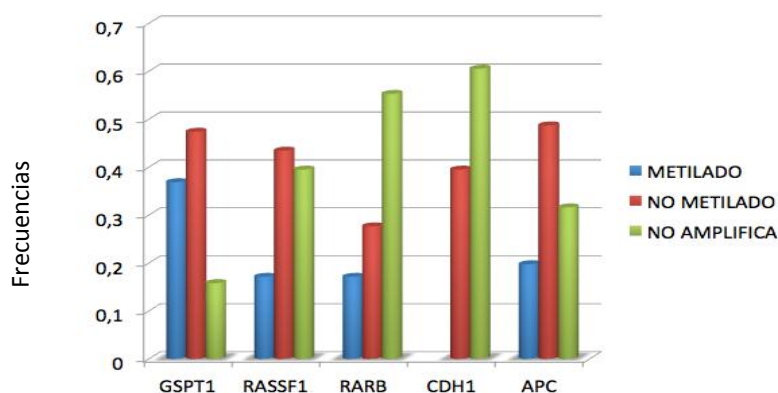


Figura 12. Frecuencias de metilación para los genes GSTP1, RASSF1a, RAR β , CDH1 y APC para la población con Adenocarcinoma.

Para determinar las diferencias entre poblaciones se realizó un test exacto de Fisher. Las poblaciones de hiperplasia y adenocarcinoma son las más diferentes entre sí, mientras que la población normal y la población con adenocarcinoma son las más similares (Tabla 3).

Tabla 3. Comparación de las poblaciones estudiadas a través del Test exacto de Fisher.

	Poblaciones	Normal	Hiperplasia	Normal + Hiperplasia
GSTP1	Hiperplasia	0.95023	-	-
	Adenocarcinoma	0.11153	0.00867*	0.00567*
RASSF1	Hiperplasia	0.46847	-	-
	Adenocarcinoma	0.12571	0.02742*	0.01723*
RARβ	Hiperplasia	0.10509	-	-
	Adenocarcinoma	0.50194	0.02300*	0.06380
CDH1	Hiperplasia	0.08013*	-	-
	Adenocarcinoma	1.00000	0.04261*	0.18928
APC	Hiperplasia	0.38631	-	-
	Adenocarcinoma	0.83240	0.1424	0.3506

6.3 Polimorfismo del gen de la Glutation S Transferasa Pi-1 (GSTP1)

El polimorfismo detectado a partir de la digestión con la enzima Bmsa-1 presentó una alta frecuencia del alelo isoleucina en las poblaciones normal e hiperplasia. El alelo valina se encontró en mayor frecuencia en la población con adenocarcinoma con respecto a la población normal + hiperplasia (Figura 13).

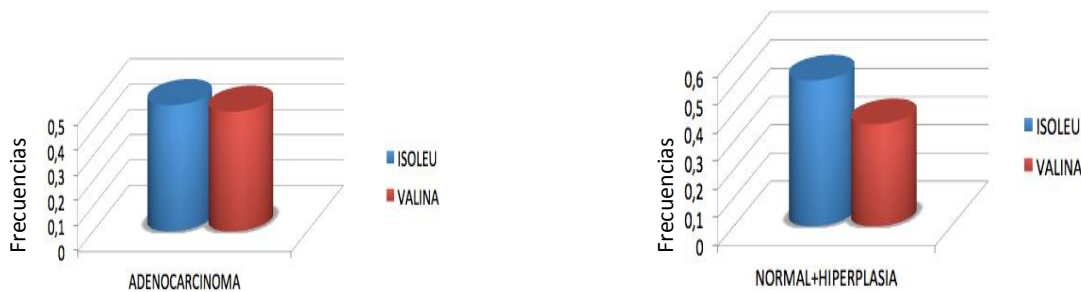


Figura 13. Frecuencia de los alelos isoleucina y valina para la población normales más hiperplasia y la población con adenocarcinoma.

Con respecto a los genotipos del polimorfismo del gen de la GSTP1, la población con adenocarcinoma presentó un mayor número de individuos heterocigotos isoleucina/valina (90%) y el menor número de homocigotos para isoleucina (5%). Para las poblaciones de hiperplasia + normal se encontraron valores de 70% para los heterocigotos y 30% para los homocigotos (Figura 14).

Es decir, que en la población de hombres con hiperplasia y hombres sanos se encuentra en menor proporción el alelo mutante en relación a los pacientes con adenocarcinoma, quienes presentan este alelo en mayor proporción y siempre en forma heterocigota.

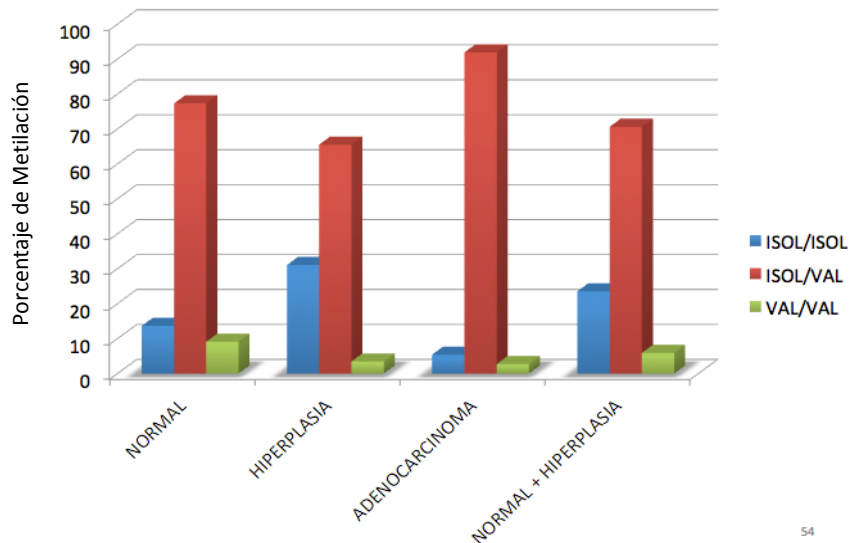


Figura 14. Porcentaje de individuos homocigotos para isoleucina (isol/isol), heterocigotos con un alelo de isoleucina y uno de valina (isol/val) y homocigotos para valina (val/val).

Respecto a la variación entre poblaciones solo se encontraron diferencias significativas entre la población de hiperplasia y adenocarcinoma ($p=0,012$) y normal + hiperplasia y adenocarcinoma ($p=0,037$).

7. DISCUSIÓN

7.1 Estandarización de métodos de extracción.

Los protocolos definitivos (Figura 3), sirvieron para la extracción de todas las muestras de este estudio. A pesar de que las muestras de orina extraídas con Chelex tuvieron la mayor concentración de ADN, con un promedio de 1300 ng/ μ l, presentaron el menor éxito de amplificación (57%), mientras que las muestras de células bucales extraídas con Chelex presentaron la menor concentración de ADN, con un promedio de 63 ng/ μ l, evidenciaron el mayor éxito de amplificación (100%). Por lo tanto, una concentración alta de ADN, como la detectada para este

estudio, no es una garantía de la buena calidad del mismo. Una posible explicación a estos hallazgos pudiera ser que el ADN se encuentre muy degradado, no ser todo de origen humano o contener partículas diferentes capaces de absorber a 260nm durante la cuantificación (113). Además, la orina puede estar contaminada con ADN bacteriano de difícil degradación que sumado a la anterior afecta negativamente la amplificación por PCR para los marcadores STRs utilizados (114).

Por otro lado, las muestras de biopsias son muestras complejas y debido a los procesos a los que son sometidas para sus análisis en patología las células sufren muchos daños, que impiden obtener ADN de buena calidad para realizar análisis en biología molecular. Además, muchos protocolos de desparafinización no logran remover completamente la parafina y ésta se convierte en un contaminante más de la muestra (115). La extracción de este tipo de muestras con el protocolo estandarizado en este trabajo no presentó estos problemas ya que se obtuvo una alta concentración de ADN disponible para la amplificación por PCR y para la conversión con bisulfito en el análisis de metilación.

7.2 Patrones de metilación de los genes RASSF1, RAR β , GSTP1, APC y CDH1

El resultado más frecuente para estas muestras es la ausencia de amplificación (metilado o no metilado) para alguno de los genes estudiados. Esto puede ser explicado gracias a que los primers no encuentran su secuencia complementaria, lo cual puede suceder por diversas causas:

- Las muestras tienen una metilación parcial que no permite su amplificación con los primers hipermetilados y no metilados. Estos primers no reconocen patrones de metilación intermedios entre totalmente metilado y no metilado. La metilación en islas es una situación común (116) que puede justificar la ausencia de amplificación.

- Las citosinas se encuentran en proceso de desmetilación. Durante este proceso sufren otras modificaciones diferentes a la metilación del carbono 5 que no son detectables por esta técnica (5-hidroximetilcitosina, 5-formilcitosina, 5-carboxilcitosina) (24, 117).
- Hay mutaciones en esta secuencia que impiden la complementariedad con los primers y que normalmente se presentan en tejido normal y afectado (118), éstas mutaciones pueden ser pequeñas o involucrar aberraciones cromosómicas grandes que se presentan a menudo en las células cancerígenas (119).

La metilación en muestras de tejido normal o de tejido hiperplásico para algunos de los genes estudiados puede deberse a falsos positivos dadas por una conversión con bisulfito incompleta o a procesos patológicos no registrados en el diagnóstico (120).

Cuando se realizaron las comparaciones de las frecuencias de metilación entre las poblaciones normal, hiperplasia y adenocarcinoma se encontraron diferencias significativas para adenocarcinoma e hiperplasia en cuatro de los cinco genes analizados, GSTP1 ($p=0.008$), RASSF1a ($p=0.027$), RAR β ($p=0.023$) y CDH1 ($p=0.042$). Entre las poblaciones con adenocarcinoma y Normales+hiperplásicos se obtuvo una diferencia significativa para los genes GSTP1 ($p=0.005$), RASSF1a ($p=0.017$); mientras que para el gen RAR β no hubo una diferencia significativa ($p=0.063$). Se observó que las diferencias son mayores al hacer la unión de estas poblaciones, sin embargo, se pierden las diferencias con los genes RAR β y CDH1. Esto se puede explicar por la gran cantidad de no amplificados para estos genes en todas las poblaciones.

EL gen APC no presenta diferencias significativas entre las tres poblaciones y el gen CDH1 no se encuentra metilado en ninguno de los individuos analizados en este estudio. Respecto al gen APC podemos ver que presenta altos niveles de los tres posibles resultados (metilados, no metilados y muestras que no amplifican),

esta variedad puede ser explicada por la presencia de otros factores genéticos e inherentes a la proteína que están involucrados en su función (121, 122). La explicación para que el gen CDH1 no se encuentre metilado es que la pérdida de su función está asociada a la pérdida de adhesión celular, la cual se presenta en un estado muy avanzado del cáncer, estas células metastásicas deberían presentar esta característica y las muestras de este trabajo son de tumor primario y en ninguno se reporta muestra de tejido metastásico (123). Además, es importante resaltar que existen otros marcadores epigenéticos que pueden estar alterando la expresión de estos genes.

La población con más porcentaje de metilados en los dos alelos es adenocarcinoma, indicando que es la población con más alteraciones en los genes supresores de tumores analizados, lo cual concuerda con otros reportes (49, 124, 125).

Al revisar las historias clínicas se encontró que los pacientes que se diagnosticaron como normales presentan una variedad de daños tisulares que incluyen PIA, razón por la cual pueden encontrarse este tipo de alteraciones en la metilación (112), para corroborar esta hipótesis, es necesario hacer una revisión más detallada de las historias clínicas y considerar otras variables como los niveles de PSA, daños tisulares, entre otras.

7.3 Polimorfismo del gen de la Glutathion S Transferasa Pi-1

Para el polimorfismo del gen GSTP1 se encontró que el alelo isoleucina fue el más frecuente para toda la población y se encontró en mayor frecuencia en estado homocigoto para las muestras de hiperplasia+normales y en estado heterocigoto para las muestras de adenocarcinoma. Se encontraron diferencias significativas entre hiperplasia y adenocarcinoma ($p=0.012$) y entre normales+hiperplasia y adenocarcinoma ($p=0.038$), estos resultados son similares a los encontrados por Kewel, Kim y Cotignola entre otros (126–128). De acuerdo a estos estudios la presencia de al menos un alelo de valina en las muestras puede ser un factor de

riesgo para el desarrollo de adenocarcinoma. Sin embargo, la asociación aún es débil y se requiere de una muestra mucho más grande.

8. CONCLUSIONES

Los métodos de extracción estandarizados pueden ser usados para extraer ADN de muestras de biopsias embebidas en parafina y muestras de orina. Este ADN puede ser usado para amplificación por PCR. Comparado con los kits comerciales, este método es muy económico y constituye una herramienta para los investigadores que quieran trabajar con este tipo de muestras.

Existen cambios en los patrones de metilación en los genes estudiados de los pacientes con adenocarcinoma comparados con las otras dos poblaciones de estudio. Este hallazgo puede constituirse como un biomarcador útil al momento de un diagnóstico y seguimiento de un tratamiento.

El análisis del polimorfismo de la GSTP1 puede estar correlacionado con el desarrollo del carcinoma de próstata, con el pronóstico y con la respuesta a los tratamientos. En la población con cáncer de próstata analizada en este estudio la mayoría de individuos (94%) se encontraban como heterocigotos para este gen, esto puede considerarse un factor de riesgo para el desarrollo del adenocarcinoma (129).

Finalmente, el estudio de nuevos biomarcadores para el cáncer de próstata se hace necesario dada su alta incidencia y mortalidad, lo ideal es encontrar maneras de analizar estos biomarcadores sin utilizar un método invasivo para promover el tamizaje oportuno y disminuir la mortalidad.

8. REFERENCIAS

1. Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. Nature reviews. Clinical oncology [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 May [cited 2012 Mar 8];7(5):251–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351699>
2. Colditz G a, Sellers T a, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? Nature reviews. Cancer [Internet]. 2006 Jan;6(1):75–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16372016>
3. Cao Y, DePinho R a, Ernst M, Vousden K. Cancer research: past, present and future. Nature reviews. Cancer [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Oct [cited 2012 Mar 12];11(10):749–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918542>
4. Schulz AW. Molecular biology of human cancers. Springer; 2005. p. 529.
5. Duffy MJ, Napieralski R, Martens JWM, Span PN, Spyrtos F, Sweep FCGJ, et al. Methylated genes as new cancer biomarkers. European journal of cancer (Oxford, England : 1990) [Internet]. Elsevier Ltd; 2009 Feb [cited 2012 Mar 25];45(3):335–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19138839>

6. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer research* [Internet]. 2001 Apr 15;61(8):3225–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11309270>
7. Knudson AG. CHASING THE CANCER DEMON. *Annual Reviews Genetics*. 2000;1–19.
8. Schulz AW. *Molecular biology of human cancers*. Springer; 2005. p. 529.
9. Isaacs W, Kainu T. Oncogenes and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Epidemiologic reviews* [Internet]. 2001 Jan;23(1):36–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11588853>
10. Herman JG, Baylin SB. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. 2003;
11. Iacobuzio-Donahue C a. Epigenetic changes in cancer. *Annual review of pathology*. 2009 Jan;4:229–49.
12. Iacobuzio C. Epigenetic changes in cancer. *Annual review of pathology* [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Mar 5];4:229–49. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18840073>
13. Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. 2004 Feb;4(2):143–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732866>
14. Dawson MA, Kouzarides T. Review Cancer Epigenetics : From Mechanism to Therapy. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;150(1):12–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
15. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* [Internet]. 2005 Apr [cited 2013 Jun 5];37(4):391–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15765097>
16. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nature reviews. Genetics* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011 Dec [cited 2012 Mar 9];12(12):861–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22094949>
17. Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2011.354>

18. Riggs AD, Xiong Z. Methylation and epigenetic fidelity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 2004 Jan 6;101(1):4–5. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=314126&tool=pmc-entrez&rendertype=abstract>
19. Szyf M. DNA methylation and cancer therapy. [Internet]. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*. 2003. p. 341–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744498>
20. Nakao M. Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin. *Gene* [Internet]. 2001 Oct 31;278(1-2):25–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11707319>
21. Dawson MA, Kouzarides T. Review Cancer Epigenetics : From Mechanism to Therapy. *Cell* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;150(1):12–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.013>
22. Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabunciyan S, Langmead B, Mcdonald OG, et al. Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature Publishing Group* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;43(8):768–75. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.865>
23. Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature reviews. Genetics* [Internet]. 2007 Apr [cited 2012 Mar 12];8(4):286–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17339880>
24. Bock C. Analysing and interpreting DNA methylation data. *Nature reviews. Genetics* [Internet]. Nature Publishing Group; 2012 Oct [cited 2013 May 21];13(10):705–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22986265>
25. Knowles MA, Selby PJ. Introduction to cellular and molecular biology of cancer. Oxford uni. 2005. p. 552.
26. Jemal A, Bray F, Ferlay J. *Global Cancer Statistics*. 2011;61(2):69–90.
27. Melissa. Center, Rebecca. Siegel AJ. *Global Cancer Facts & Figures 2nd. American Cancer Society Report*. 2008;(700).
28. Xu J, Kenneth D. *National Vital Statistics Reports Deaths : Preliminary Data for 2010*. 2012;60(4).

29. Cáncer en cifras [Internet]. [cited 2013 Jul 3]. Available from: <http://www.cancer.gov.co/contenido/contenido.aspx?catID=434&conID=790>
30. Schlag PM, Senn HJ, Ramon J, Denis L. Prostate cancer. 2007.
31. Shen MM, Abate-Shen C. Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & development* [Internet]. 2010 Sep 15 [cited 2013 May 23];24(18):1967–2000. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2939361&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
32. Carter BS, Beaty TH, Steinberg GD, Childs B, Walsh PC. Mendelian inheritance of familial prostate cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* [Internet]. 1992 Apr 15;89(8):3367–71. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=48868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
33. Shah RB. Current perspectives on the Gleason grading of prostate cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine* [Internet]. 2009 Nov;133(11):1810–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886716>
34. Koochekpour S. DNA methylome and the complexity of discovering prostate cancer biomarkers. *Asian journal of andrology* [Internet]. 2011 Sep [cited 2012 Jul 6];13(5):661–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21725333>
35. Makarov D V, Loeb S, Getzenberg RH, Partin AW. Biomarkers for prostate cancer. *Annual review of medicine* [Internet]. 2009 Jan [cited 2012 Mar 10];60:139–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18947298>
36. Kehinde EO, Sheikh M, Mojimoniyi O a., Francis I, Anim JT, Nkansa-Dwamena D, et al. High serum prostate-specific antigen levels in the absence of prostate cancer in Middle-Eastern men: the clinician's dilemma. *BJU International* [Internet]. 2003 Apr 16 [cited 2012 Jun 30];91(7):618–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1464-410X.2003.04199.x>
37. Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* [Internet]. Nature Publishing Group; 2010 May [cited 2012 Mar 8];7(5):251–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20351699>

38. Esteller M. Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. Annual review of pharmacology and toxicology [Internet]. 2005 Jan [cited 2012 Mar 21];45:629–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15822191>
39. Cairns P. Gene methylation and early detection of genitourinary cancer: the road ahead. Nature reviews. Cancer [Internet]. 2007 Jul [cited 2012 Mar 18];7(7):531–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17585333>
40. Patel AR, Klein E a. Risk factors for prostate cancer. Nature clinical practice. Urology [Internet]. 2009 Feb [cited 2013 Jun 5];6(2):87–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198622>
41. Quinn M, Babb P. Patterns and trends in prostate cancer incidence, survival, prevalence and mortality. Part I: international comparisons. BJU international [Internet]. 2002 Jul;90(2):162–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12081758>
42. Woolf M. An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate. Cancer. 1959;13.
43. McIntosh H. Why do African-American men suffer more prostate cancer? Journal of the National Cancer Institute. 1997;89(3).
44. Godley P a. Racial Differences in Mortality Among Medicare Recipients After Treatment for Localized Prostate Cancer. CancerSpectrum Knowledge Environment [Internet]. 2003 Nov 19 [cited 2013 Jun 27];95(22):1702–10. Available from: <http://jnci.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jnci/djg094>
45. Schlaberg R, Choe DJ, Brown KR, Thaker HM, Singh IR. XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [Internet]. 2009 Sep 22;106(38):16351–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2739868&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Hayes RB, Ziegler RG, Gridley G, Swanson C, Greenberg RS, Swanson GM, et al. Dietary Factors and Risks for Prostate Cancer among Blacks and Whites in the United States in the United States 1. 1999;25–34.
47. Patel AR, Klein E a. Risk factors for prostate cancer. Nature clinical practice. Urology [Internet]. 2009 Feb [cited 2012 Jun 25];6(2):87–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19198622>

48. Sundberg K, Johansson a S, Stenberg G, Widersten M, Seidel a, Mannervik B, et al. Differences in the catalytic efficiencies of allelic variants of glutathione transferase P1-1 towards carcinogenic diol epoxides of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Carcinogenesis* [Internet]. 1998 Mar;19(3):433–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9525277>
49. Bastian PJ, Ellinger J, Wellmann A, Wernert N, Heukamp LC, Müller SC, et al. Diagnostic and prognostic information in prostate cancer with the help of a small set of hypermethylated gene loci. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2012 Apr 22];11(11):4097–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15930345>
50. Henrique R, Jerónimo C, Teixeira MR, Hoque MO, Carvalho AL, Pais I, et al. Epigenetic heterogeneity of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: clues for clonal progression in prostate carcinogenesis. *Molecular cancer research : MCR* [Internet]. 2006 Jan [cited 2013 Jun 11];4(1):1–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16446401>
51. Dumache R, Miclea F, Bumbacila B, Puiu M. Roles of GSTP1 gene, in prostate cancer detection. *Jurnalul pediatriei*. 2009;XII(47):47–9.
52. Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, Howard GCW, Wolf CR. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase Pi locus and association with susceptibility to bladder , testicular and prostate cancer. 1997;18(4):641–4.
53. Fearhead NS, Britton MP, Bodmer WF, Hospital JR, Ox O. The ABC of APC. 2001;10(7).
54. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Zo S, Farinas AJ, Minna JD, et al. Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features 1. 2002;514–9.
55. Yegnasubramanian S. Hypermethylation of CpG Islands in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer. *Cancer Research* [Internet]. 2004 Mar 15 [cited 2012 Apr 19];64(6):1975–86. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/0008-5472.CAN-03-3972>
56. Gordon M, Baksh S. RASSF1A: Not a prototypical Ras effector. *Small GTPases* [Internet]. 2011 Jan [cited 2013 Jun 11];2(3):148–57. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3136945&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

57. Miller SA, Dykes D., Polesky H. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research*. 1988;16(3):55404.
58. Chen KM, Stephen JK, Raju U, Worsham MJ. Delineating an Epigenetic Continuum for Initiation, Transformation and Progression to Breast Cancer. 2011;1580–92.
59. Sonobe M, Manabe T, Wada H, Tanaka F. Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma. *British journal of cancer* [Internet]. 2005 Aug 8 [cited 2012 Jul 26];93(3):355–63. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2361570&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
60. García P, Manterola C, Araya JC, Villaseca M, Guzmán P, Sanhueza A, et al. Promoter methylation profile in preneoplastic and neoplastic gallbladder lesions. *Molecular carcinogenesis*. 2009 Jan;48(1):79–89.
61. Lam T, Tong JH, To K, Chan A, Liew C, Lai PB, et al. Correlative Analysis of DNA Methyltransferase Expression and Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Hepatocellular Carcinoma. 2006;278:271–7.
62. Kim H, Kwon YM, Kim JS, Lee H, Park J-H, Shim YM, et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004 Jun;22(12):2363–70.
63. Rasti M, Tavasoli P, Monabati A, Entezam M. Association between HIC1 and RASSF1A promoter hypermethylation with MTHFD1 G1958A polymorphism and clinicopathological features of breast cancer in Iranian patients. *Iranian biomedical journal* [Internet]. 2009 Oct;13(4):199–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946345>
64. Negraes PD, Favaro FP, Camargo JL V, Oliveira MLCS, Goldberg J, Rainho C a, et al. DNA methylation patterns in bladder cancer and washing cell sediments: a perspective for tumor recurrence detection. *BMC cancer* [Internet]. 2008 Jan [cited 2012 Dec 12];8:238. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2527332&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
65. Liu L, Yoon J-H, Dammann R, Pfeifer GP. Frequent hypermethylation of the RASSF1A gene in prostate cancer. *Oncogene* [Internet]. 2002 Oct 3 [cited 2012 Apr 9];21(44):6835–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12360410>

66. Liao X, Siu MK-Y, Chan KY-K, Wong ES-Y, Ngan HY-S, Chan QK-Y, et al. Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis. *International journal of cancer. Journal international du cancer* [Internet]. 2008 Jul 15 [cited 2013 Jan 9];123(2):296–302. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18404674>
67. Wang T, Liu H, Chen Y, Liu W, Yu J, Wu G. Methylation associated inactivation of RASSF1A and its synergistic effect with activated K-Ras in nasopharyngeal carcinoma. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR* [Internet]. 2009 Jan [cited 2013 Jan 9];28:160. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2809060&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
68. Tian Y, Hou Y, Zhou X, Cheng H, Zhou R. Tumor Suppressor RASSF1A Promoter : p53 Binding and Methylation. 2011;6(2).
69. Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC cancer* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Jan 9];5:44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1131894&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
70. Ee WONJUNL, Hu BAOTINGZ. M ODULATION OF THE R ATE OF E NZYMATIC DNA M ETHYLATION BY. 2005;29208:325–37.
71. Yaqinuddin A, Qureshi S a, Qazi R, Abbas F. Down-regulation of DNMT3b in PC3 cells effects locus-specific DNA methylation, and represses cellular growth and migration. *Cancer cell international* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Jan 9];8:13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2564899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
72. Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. 2003;3:1866–71.
73. Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* [Internet]. 2003 Mar 27 [cited 2013 Jan 9];22(12):1866–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660822>

74. Zou C, Youssef EM, Zou C, Carey TE, Lotan R. Differential effects of chromosome 3p deletion on the expression of the putative tumor suppressor RAR β and on retinoid resistance in human squamous carcinoma cells. 2001;6820–7.
75. Song S, Lippman SM, Zou Y, Ye X, Ajani J a, Xu X-C. Induction of cyclooxygenase-2 by benzo[a]pyrene diol epoxide through inhibition of retinoic acid receptor-beta 2 expression. *Oncogene* [Internet]. 2005 Dec 15 [cited 2013 Jan 9];24(56):8268–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16170369>
76. Jha AK, Nikbakht M, Parashar G, Shrivastava A, Capalash N, Kaur J. Original Article Reversal of Hypermethylation and Reactivation of the RAR β Gene by Natural Compounds in Cervical Cancer Cell Lines. 2010;200:195–200.
77. Lamy a, Métayer J, Thiberville L, Frébourg T, Sesboüé R. Re: Promoter methylation and silencing of the retinoic acid receptor-beta gene in lung carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute* [Internet]. 2001 Jan 3;93(1):66–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11136849>
78. Kim H, Kwon YM, Kim JS, Lee H, Park J-H, Shim YM, et al. Tumor-specific methylation in bronchial lavage for the early detection of non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* [Internet]. 2004 Jun 15 [cited 2013 Jan 9];22(12):2363–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15197197>
79. Gutiérrez MI, Siraj AK, Khaled H, Koon N, El-Rifai W, Bhatia K. CpG island methylation in Schistosoma- and non-Schistosoma-associated bladder cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2004 Oct;17(10):1268–74.
80. Arafa M, Kridelka F, Mathias V, Vanbellinghen J-F, Renard I, Foidart J-M, et al. High frequency of RASSF1A and RAR β 2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology* [Internet]. 2008 Nov [cited 2013 Jan 9];53(5):525–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783461>
81. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T. Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer science* [Internet]. 2003 Jul;94(7):589–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12841866>

82. Pongtheerat T, Pakdeethai S, Purisa W, Chariyalertsak S, Petmitr S. Promoter methylation and genetic polymorphism of glutathione S-transferase P1 gene (GSTP1) in Thai breast- cancer patients. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* [Internet]. 2011 Jan;12(10):2731–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22320983>
83. Gao P, Yang X, Xue Y-W, Zhang X-F, Wang Y, Liu W-J, et al. Promoter methylation of glutathione S-transferase pi1 and multidrug resistance gene 1 in bronchioloalveolar carcinoma and its correlation with DNA methyltransferase 1 expression. *Cancer* [Internet]. 2009 Jul 15 [cited 2013 Jan 9];115(14):3222–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19484794>
84. Kang GH, Lee S, Lee HJ, Hwang KS. Aberrant CpG island hypermethylation of multiple genes in prostate cancer and prostatic intraepithelial neoplasia. *The Journal of pathology* [Internet]. 2004 Feb [cited 2013 Jan 1];202(2):233–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14743506>
85. Gonzalez-Gomez P, Bello MJ, Arjona D, Alonso ME, Lomas J, De Campos JM, et al. Aberrant CpG island methylation in neurofibromas and neurofibrosarcomas. *Oncology reports* [Internet]. 2003;10(5):1519–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12883734>
86. Lam T, Tong JH, To K, Chan A, Liew C, Lai PB, et al. Correlative Analysis of DNA Methyltransferase Expression and Promoter Hypermethylation of Tumor Suppressor Genes in Hepatocellular Carcinoma. 2006;278:271–7.
87. Sunami E, Shinozaki M, Sim M-S, Nguyen SL, Vu A-T, Giuliano AE, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast cancer research : BCR* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Jan 9];10(3):R46. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2481494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
88. Rogers CG, Gonzalgo ML, Yan G, Bastian PJ, Chan DY, Nelson WG, et al. High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection. *The Journal of urology* [Internet]. 2006 Nov [cited 2013 Jan 9];176(5):2280–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070312>
89. Arafa M, Kridelka F, Mathias V, Vanbellinghen J-F, Renard I, Foidart J-M, et al. High frequency of RASSF1A and RARb2 gene promoter methylation in morphologically normal endometrium adjacent to endometrioid adenocarcinoma. *Histopathology* [Internet]. 2008 Nov [cited 2013 Jan 9];53(5):525–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18783461>

90. Lakshmi SVV, Naushad SM, Reddy CA, Saumya K, Rao DS, Kotamraju S, et al. Oxidative stress in coronary artery disease: epigenetic perspective. *Molecular and cellular biochemistry* [Internet]. 2012 Nov 17 [cited 2012 Dec 3];203–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23160801>
91. Kim YT, Park SJ, Lee SH, Kang HJ, Hahn S, Kang CH, et al. Prognostic implication of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in adenocarcinoma of the lung. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* [Internet]. 2005 Nov [cited 2013 Jan 9];130(5):1378. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16256792>
92. Carraway HE, Wang S, Blackford A, Guo M, Powers P, Jeter S, et al. Promoter hypermethylation in sentinel lymph nodes as a marker for breast cancer recurrence. *Breast cancer research and treatment* [Internet]. 2009 Mar [cited 2013 Jan 9];114(2):315–25. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3422075&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
93. Zambrano P, Segura-Pacheco B, Perez-Cardenas E, Cetina L, Revilla-Vazquez A, Taja-Chayeb L, et al. A phase I study of hydralazine to demethylate and reactivate the expression of tumor suppressor genes. *BMC cancer* [Internet]. 2005 Jan [cited 2013 Jan 9];5:44. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1131894&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
94. House MG, Guo M, Iacobuzio-donahue C, Herman JG. Molecular progression of promoter methylation in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN) of the pancreas. 2003;24(2):193–8.
95. Furuta J, Umebayashi Y, Miyamoto K, Kikuchi K, Otsuka F, Sugimura T, et al. Promoter methylation profiling of 30 genes in human malignant melanoma. *Cancer science* [Internet]. 2004 Dec;95(12):962–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15596045>
96. Primer MS, Primer MA, Primer US. Supplementary Table 2 . PCR Primers and conditions MSP Primers Real-time RT / PCR primers ChIP primers. :55–6.
97. Hong SH, Kim HG, Chung WB, Kim EY, Lee JY, Yoon SM, et al. DNA hypermethylation of tumor-related genes in gastric carcinoma. *Journal of Korean medical science* [Internet]. 2005 Apr;20(2):236–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21308683>
98. Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, et al. Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* [Internet]. 2003 Mar 27 [cited 2012 Jul

24];22(12):1866–71. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12660822>

99. Hoebeeck J, Michels E, Pattyn F, Combaret V, Vermeulen J, Yigit N, et al. Aberrant methylation of candidate tumor suppressor genes in neuroblastoma. 2008;
100. Tamura G, Yin J, Wang S, Fleisher a S, Zou T, Abraham JM, et al. E-Cadherin gene promoter hypermethylation in primary human gastric carcinomas. *Journal of the National Cancer Institute*. 2000 Apr;92(7):569–73.
101. Zhou S, Li Y, Huang F, Zhang B, Yi T, Li Z, et al. Live-attenuated measles virus vaccine confers cell contact loss and apoptosis of ovarian cancer cells via ROS-induced silencing of E-cadherin by methylation. *Cancer Letters* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012;318(1):14–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.10.038>
102. Arzenani MK, Zade AE, Ming Y, Vijverberg SJH, Zhang Z, Khan Z, et al. Genomic DNA hypomethylation by histone deacetylase inhibition implicates DNMT1 nuclear dynamics. *Molecular and cellular biology*. 2011 Oct;31(19):4119–28.
103. Yanagawa N, Tamura G, Oizumi H, Takahashi N, Shimazaki Y, Motoyama T. Promoter hypermethylation of tumor suppressor and tumor-related genes in non-small cell lung cancers. *Cancer science* [Internet]. 2003 Jul;94(7):589–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12841866>
104. Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, Endoh Y, Sakata K, Jin Z, et al. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. *Oncogene*. 2000 Jul;19(32):3642–6.
105. Yaqinuddin A, Qureshi S a, Qazi R, Abbas F. Down-regulation of DNMT3b in PC3 cells effects locus-specific DNA methylation, and represses cellular growth and migration. *Cancer cell international* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Jan 9];8:13. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2564899&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
106. Chim CS, Pang R, Fung TK, Choi CL, Liang R. Epigenetic dysregulation of Wnt signaling pathway in multiple myeloma. 2007;57:2527–36.
107. Sunami E, Shinozaki M, Sim M-S, Nguyen SL, Vu A-T, Giuliano AE, et al. Estrogen receptor and HER2/neu status affect epigenetic differences of tumor-related genes in primary breast tumors. *Breast cancer research : BCR* [Internet]. 2008 Jan [cited 2013 Jan 9];10(3):R46. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2481494&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

108. G LZ, J VL, C FO, S ER, E CB, V MP, et al. de análisis de Hierarchical clustering. 2007;17–25.
109. Dong SM, Lee EJ, Jeon ES, Park CK, Kim K-M. Progressive methylation during the serrated neoplasia pathway of the colorectum. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* [Internet]. 2005 Feb [cited 2013 Jun 5];18(2):170–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15389252>
110. Rogers CG, Gonzalgo ML, Yan G, Bastian PJ, Chan DY, Nelson WG, et al. High concordance of gene methylation in post-digital rectal examination and post-biopsy urine samples for prostate cancer detection. *The Journal of urology* [Internet]. 2006 Nov [cited 2013 Jan 9];176(5):2280–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17070312>
111. Enokida H, Shiina H, Urakami S, Igawa M, Ogishima T, Li L-C, et al. Multigene methylation analysis for detection and staging of prostate cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 2005 Sep 15 [cited 2012 Apr 19];11(18):6582–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166436>
112. Beer TM, Evans a J, Hough KM, Lowe B a, McWilliams JE, Henner WD. Polymorphisms of GSTP1 and related genes and prostate cancer risk. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases* [Internet]. 2002 May 3 [cited 2012 Jul 6];5(1):22–7. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/sj/pcan/4500549>
113. Kim C-S, Kim JH, Kang D, Hong Y-C, Yoo K-Y. Gene amplification using DNA from human spot urine samples. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP* [Internet]. 2006;7(2):318–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839230>
114. Beermann A, Ghanjati F, Hermanns T, Poyet C, Pereira J, Fischer J, et al. Methods for Separate Isolation of Cell-Free DNA and Cellular DNA from Urine-Application of Methylation-Specific PCR on both DNA Fractions. 2011;15–7.
115. Djavan B, Kazzazi A, Dulabon L, Margreiter M, Farr A, Handl MJ, et al. Diagnostic Strategies for Prostate Cancer. *European Urology Supplements* [Internet]. European Association of Urology; 2011 May [cited 2012 Dec 6];10(3):e26–e37. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1569905611000340>

116. Ioshikhes IP, Zhang MQ. Large-scale human promoter mapping using CpG islands. *Nature genetics* [Internet]. 2000 Sep;26(1):61–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10973249>
117. Wu SC, Zhang Y. Active DNA demethylation : Nature Publishing Group [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2010;11(9):607–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm2950>
118. Baylin SB, Jones P a. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2011 Oct [cited 2013 May 21];11(10):726–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307543&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
119. Loeb L a. Human cancers express mutator phenotypes: origin, consequences and targeting. *Nature reviews. Cancer* [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2011 Jun [cited 2013 May 22];11(6):450–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21593786>
120. Gonzalgo ML, Pavlovich CP, Lee SM, Nelson WG. Prostate cancer detection by GSTP1 methylation analysis of postbiopsy urine specimens. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* [Internet]. 2003 Jul;9(7):2673–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12855646>
121. Worm J, Christensen C, Gr K, Tulchinsky E, Guldberg P. Genetic and epigenetic alterations of the APC gene in malignant melanoma. 2004;5215–26.
122. Chen Y, Li J, Yu X, Li S, Zhang X, Mo Z, et al. ARTICLE APC gene hypermethylation and prostate cancer : a systematic review and meta-analysis. *European Journal of Human Genetics* [Internet]. *Nature Publishing Group*; 2013;(22):1–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2012.281>
123. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Zo S, Farinas AJ, Minna JD, et al. Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features 1. 2002;514–9.
124. Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Zo S, Farinas AJ, Minna JD, et al. Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features Aberrant Promoter Methylation Profile of Prostate Cancers and Its Relationship to Clinicopathological Features 1. 2002;514–9.

125. Bastian PJ, Yegnasubramanian S, Palapattu GS, Rogers CG, Lin X, De Marzo AM, et al. Molecular biomarker in prostate cancer: the role of CpG island hypermethylation. *European urology* [Internet]. 2004 Dec [cited 2012 Dec 6];46(6):698–708. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15548435>
126. Kweekel DM, Koopman M, Antonini NF, Van der Straaten T, Nortier JWR, Gelderblom H, et al. GSTP1 Ile105Val polymorphism correlates with progression-free survival in MCRC patients treated with or without irinotecan: a study of the Dutch Colorectal Cancer Group. *British journal of cancer* [Internet]. 2008 Oct 21 [cited 2013 Jun 11];99(8):1316–21. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2570506&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
127. Kim S, Lee K, Park S, Yoo K, Noh D, Choe K, et al. Genetic Polymorphism of Glutathione S-transferase P1 and Breast Cancer Risk. 2004;37(5):582–5.
128. Cotignola J, Leonardi DB, Shahabi a, Acuña a D, Stern MC, Navone N, et al. Glutathione-S-transferase (GST) polymorphisms are associated with relapse after radical prostatectomy. *Prostate cancer and prostatic diseases* [Internet]. 2013 Mar [cited 2013 Jun 11];16(1):28–34. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3626169&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
129. Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, Jero C, Oliveira J, Jose M, et al. I105V Polymorphism and Promoter Methylation of the GSTP1 Gene in Prostate Adenocarcinoma I105V Polymorphism and Promoter Methylation of the GSTP1 Gene in. 2002;445–50.