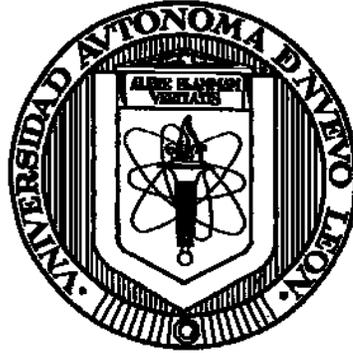


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



“POLIMORFISMO R462Q DEL GEN RNASEL, INFECCIONES VIRALES
CRÓNICAS Y CÁNCER DE PRÓSTATA”

Por

M. EN C. MARGARITA DE LA LUZ MARTÍNEZ FIERRO

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTORADO EN CIENCIAS con orientación terminal en
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Mayo, 2009

CONTENIDO.

	PÁGINA
CONTENIDO	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
ABREVIATURAS	v
RESUMEN	vii
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO.	
1.1	Introducción. 1
1.2	Antecedentes Generales. 2
1.2.1	Epidemiología del Cáncer de Próstata. 2
1.2.2	Descripción Anatómico-Patológica de la próstata. 6
1.2.2.1	Localización anatómica y descripción. 6
1.2.2.2	Estructura de la próstata. 7
1.2.2.3	Principales patologías de la próstata. 8
1.2.3	Cáncer de próstata. 9
1.2.3.1	Descripción e historia natural de la enfermedad. 9
1.2.3.2	Diagnóstico del CP. 9
1.2.3.3	Clasificación y Tratamiento. 11
1.2.3.4	Lesiones precursoras del CP. 15
1.2.3.5	Predisposición zonal de las lesiones de la próstata. 19
1.2.4	Factores de riesgo para CP. 21
1.2.4.1	Edad. 22
1.2.4.2	Grupo Étnico. 22
1.2.4.3	Dieta. 23
1.2.4.4	Historia Familiar. 24
1.2.4.5	Ambiente sexual. 28
1.2.4.6	Patógenos virales y CP. 29
1.3	Antecedentes Directos: Liga entre DNA virus, RNASEL y CP 33
1.4	Justificación del Estudio. 36

CAPÍTULO II. OBJETIVOS.

2.1	Objetivo General.	37
2.2	Objetivos Específicos.	37

CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1	Esquema General de la parte clínica.	38
3.2	Esquema General de la parte experimental de laboratorio.	38
3.3	Diseño del Estudio.	39
3.4	Criterios de selección de los participantes.	39
3.5	Pacientes y origen de las muestras.	40
3.6	Extracción de ácidos nucleicos.	41
3.7	Genotipificación del alelo R462Q de RNASEL.	41
3.8	Detección de secuencias virales.	42
3.9	Secuenciación y tipificación viral.	42
3.10	Métodos estadísticos.	44

CAPÍTULO IV. RESULTADOS.

4.1	Características generales de la población estudiada.	45
4.2	Genotipificación de la variante R462Q de RNASEL.	47
4.3	Detección de secuencias virales.	49
4.4	Relación R462Q de RNASEL, infección y CP.	53

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.

54

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.

59

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

60

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.

65

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Principales tres causas de mortalidad general 2007.	5
Tabla 2.	Principales tres causas de mortalidad en hombres 2007.	5
Tabla 3.	Principales tres causas de mortalidad en personas de 65 años y más 2007.	6
Tabla 4.	Principales tres causas de mortalidad en hombres de 65 años y más 2007.	6
Tabla 5.	Clasificación TNM.	13
Tabla 6.	Etapas del Cáncer de acuerdo a la clasificación TNM	13
Tabla 7.	Historia familiar y riesgo de CP.	25
Tabla 8.	Loci de susceptibilidad a cáncer de próstata hereditario.	26
Tabla 9.	Genotipificación.	41
Tabla 10.	Primers empleados en la etapa de tamizaje viral.	43
Tabla 11.	Lugar de nacimiento de la población de estudio.	45
Tabla 12.	Valores de APE de los grupos de estudio.	46
Tabla 13.	Distribución de genotipos de las muestras positivas para los diferentes virus.	52
Tabla 14.	Comparación entre genotipo vs CP.	53
Tabla 15.	Comparación entre genotipo vs Infección e infección vs CP.	53
Tabla 16.	Comparación entre las frecuencias genotípicas reportadas para el polimorfismo R462Q de RNASEL y las obtenidas en este estudio.	54
Tabla 17.	Comparación entre los diferentes estudios de tamizaje viral reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Tasas de Mortalidad para el 2002 según estadísticas del GLOBOCAN IARC.	2
Figura 2.	Sitios principales y estimaciones de nuevos casos de cáncer y muertes en Estados Unidos para el 2008.	3
Figura 3.	Distribución porcentual de las defunciones por cáncer de próstata según grupo de edad en México durante 1999.	4
Figura 4.	Localización anatómica de la próstata.	7
Figura 5.	Zonas de la próstata.	8
Figura 6.	Historia Natural del CP.	10
Figura 7.	Grado Gleason.	11
Figura 8.	Etapas del CP de acuerdo a la clasificación TNM.	14
Figura 9.	Modelo de progresión del CP.	20
Figura 10.	Ubicación y estructura del gen RNASEL.	27
Figura 11.	Ubicación y estructura del gen RNASEL.	28
Figura 12.	Mecanismo 2-5A/RNAsa L.	34
Figura 13.	Distribución por edades de los grupos de estudio.	46
Figura 14.	Diagnóstico histopatológico del grupo control.	47
Figura 15.	Grado Gleason.	47
Figura 16.	Amplificación de GAPDH.	48
Figura 17.	Distribución de genotipos de la población estudio.	48
Figura 18.	Diagrama De Finetti con parábola de Hardy Weinberg.	51
Figura 19.	Límites de detección de los métodos de tamizaje viral.	52
Figura 20.	Condiciones generales de reacción y geles representativos del tamizaje viral.	52
Figura 21.	PCR anidada para tamizaje de HCMV en muestras de tejido prostático.	53
Figura 22.	PCR anidada para tamizaje de HPV's en muestras de tejido prostático.	54

LISTA DE ABREVIATURAS

APE	Antígeno Prostático Específico.
ATP	Adenosín trifosfato.
BTR	Biopsia transrectal.
cm	Centímetros.
CP	Cáncer de Próstata.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
DNAc	DNA complementario.
dsRNA	RNA de doble cadena.
EBV	Virus Eptein Barr.
EtBr	Bromuro de Etidio.
g	Gramos.
HAA	Hiperplasia Adenomatosa Atípica.
HCMV	Citomegalovirus Humano.
HGPIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática de Alto Grado.
HHV-8	Herpesvirus tipo 8.
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna.
HPC1	Locus de susceptibilidad para cáncer de próstata familiar 1.
HPV	Papilomavirus Humano.
IFN	Interferón.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
Kb	Kilobases.

ml	Mililitro.
ng	Nanogramos.
PA	Atrofia Proliferativa.
pb	Pares de Bases.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa.
PhIP	2-amino-1-metil-6-p-fenilimidazol [4,5-b]piridina .
PIA	Atrofia Inflamatoria Proliferativa .
PIN	Neoplasia Intraepitelial Prostática.
Py	Poliomavirus.
RNA	Ácido ribonucleico.
RT	Retrotranscripción.
RTU	Resección Trans-uretral
TNM	Tumor Nódulo Metástasis.
TRD	Tacto rectal digital.
TSNTE	Triton, SDS, NaCl, Tris, EDTA.
XMRV	Virus Xenotrópico Relacionado al Virus de la Leucemia Murina.

RESUMEN

M. en C. Margarita de la Luz Martínez Fierro.

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de graduación: Mayo 2009.

Área de Estudios: Biología Molecular.

Candidato para el grado de Doctorado en Ciencias con Orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Número de páginas:

Título del estudio: “Polimorfismo R462Q del gen RNASEL, infecciones virales crónicas y cáncer de próstata”.

Introducción. Algunos reportes en la literatura han demostrado la presencia de diversas infecciones virales en tejido prostático. Recientemente el gamma retrovirus xenotrópico relacionado al virus de la leucemia murina (XMRV) fue identificado en el 40% de los pacientes con CP familiar con genotipo homocigoto para la mutación R462Q del gen RNASEL y en una baja frecuencia en pacientes heterocigotos u homocigotos normales para la mutación (1/66). No existen reportes de asociación entre R462Q y virus no-XMRV.

Objetivo. Determinar la prevalencia de virus potencialmente oncogénicos en tejido prostático tumoral y no tumoral, así como la frecuencia del polimorfismo R462Q en gen RNASEL y sus asociaciones simples y combinadas con cáncer de próstata.

Material y Métodos: DNA de 130 tejidos prostáticos fueron analizados para poliomavirus (BK, JC y SV40), Citomegalovirus (HCMV) y Papilloma virus (HPVs) mediante ensayos de PCR anidada. RNA de las mismas muestras fue retrotranscrito y sometido a amplificación para tamizaje del virus XMRV. Las muestras positivas fueron secuenciadas para la discriminación definitiva del virus. La genotipificación del alelo R462Q de RNase L fue obtenida mediante tecnología TaqMan. Las muestras positivas fueron secuenciadas y los tipos virales de HPV fueron determinados usando la prueba Linear Array HPV Genotyping Test.

Resultados: No se identificó la presencia de secuencias virales de los poliomavirus BKV, JCV ySV40 en ninguno de los 130 tejidos prostáticos analizados. Infecciones con los virus XMRV y HCMV fueron detectadas en 1 y 6 muestras control respectivamente. Secuencias de HPVs fueron detectadas en 11/55 casos (20.0%) y 6/75 (8.0%) controles. La infección por HPV significativamente incrementa el riesgo de CP en 3.244 veces ($P = 0.049$) entre la población estudiada (95% IC: 1.113-9.451).

Conclusión: No se encontró asociación entre la infección con los virus estudiados y el polimorfismo R462Q-CP; sin embargo los sujetos infectados con HPV tuvieron 6.653 veces más riesgo de tener CP comparado con hombres HPV negativos en la población mexicana estudiada ($P=0.002$).

DR. AUGUSTO ROJAS MTZ.
Director de tesis.

DRA. ROBIN J. LEACH.
Co-Director de tesis

DRA. ROCIO ORTÍZ LÓPEZ.
Co-Director de tesis.

**“POLIMORFISMO R462Q DEL GEN RNASEL, INFECCIONES VIRALES CRÓNICAS
Y CÁNCER DE PRÓSTATA”**

Aprobación de la tesis:

DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ.

Director de Tesis.

DRA. ROBIN J. LEACH

Co-Director de Tesis.

DRA. ROCÍO ORTÍZ LÓPEZ.

Co-Director de Tesis.

DRA. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ.

Comité de Tesis.

DRA. ANA MARÍA RIVAS ESTILLA.

Comité de Tesis.

DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO.

Subdirector de Estudios de Posgrado.

El presente trabajo se desarrolló 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,
bajo la Dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez y la
Co-Dirección de la Dra. Robin J. Leach y la Dra. Rocío Ortiz López.

DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ.
Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS. PARTE I.

Alguien dijo que en las tesis los agradecimientos debían de ser solo de una hoja.. supongo que fue porque esa persona nunca necesitó ayuda., así que discúlpenme por infringir la ley, prometo que esta es la última vez..

En especial a mi familia. . . por ser mi clave y motor..

A mi comisión de tesis:

Dr. Augusto Rojas Martínez. *Por aceptarme en su laboratorio, por impulsarme, a veces casi obligarme y en la mayoría de las ocasiones también por apoyarme, en todo este proceso que me permitió desarrollar a mi manera.*

Dra. Robin Leach. *Por permitirme permanecer una y otra vez en su laboratorio, prestarme sus equipos y confiar en que todo tenía que salir bien, pero sobre todo por darme una perspectiva diferente del concepto de acertividad.*

Dra. Rocío Ortiz López. *Por permitirme opinar, por facilitarme todo lo que en algún momento se requirió, por siempre estar presta a escuchar y lo más importante por ofrecer soluciones.*

Dra. Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez. *Por las llamadas de atención todas las veces que la gente se quejaba de mí o me acusaba de algo (casi siempre infundado), por defenderme en muchas otras ocasiones y por obligarme a que regresara al camino del bien cuando se requería.*

Dra. Ana María Rivas Estilla. *Por aceptar ser parte de mi comité de tesis, por sus consejos y adecuadas intervenciones en cada momento que se requerían.*

AGRADECIMIENTOS. PARTE II.

A los que facilitaron el vía crucis inicial y permitieron que esta historia tuviera un final feliz:

University of Texas Health Science Center at San Antonio.

-Leach's Lab: Korri Weldon, Joke Beuten, Yasmín Ench, Teresa Pais, Betsy Higgins.

-Urology Department: Ian Thompson, Dean Troyer, Rosario Mesa.

Universidad Autónoma de Nuevo León.

-Departamento de Urología: Dr. Lauro Gómez, Dr. Germán Calderón, residentes, enfermeras y secretarías.

-A la gran familia del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular: por la complicidad y la resistencia a la extinción.

Laboratorio de Terapia Génica: Valeria, Idelma, Dany, Víctor, Cristian, Laura, Sergio, Adriana, José, Rafa, Gissela.

Los amigos ancestrales: Michelle, Iram, Sofi, Jorge y Potter (los espero allá afuera...!!)

La new age: Idalia (mi contraparte en el mundo de los menonitas =), la Lola, Martha, Richard.

Los que pasaron a mejor vida: Edith, Mary Rocha, Karina, Ángel, Rafa..

UDM. Karina, Maribel, Mauricio, Michelle (otra vez?), Carlos, Víctor, Celia, Carmen Villalobos.

Alí, Lulú, Juany, Lupita, Irasema, Dennisse, Vicky, Ruth, Maribel..

A todos.. GRACIAS...

*Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)
por el apoyo económico recibido.*

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. INTRODUCCIÓN.

El incremento en la esperanza de vida de la población ha traído consigo el incremento de las enfermedades crónico-degenerativas entre las que destacan por su frecuencia los tumores malignos que ocupan en México el tercer lugar en la tabla de mortalidad general [1]. Dentro de las neoplasias malignas, el cáncer de próstata es el primer tipo de neoplasia más común, ocasionando el 15.68% de las muertes por cáncer en varones [2].

El cáncer de próstata es una enfermedad indolora y solo presenta síntomas de naturaleza obstructiva, generalmente en estudios ya asociados a algún grado de invasión. La etiopatogenia del CP es aún incierta; factores como el grupo étnico, dieta y factores genéticos, han sido estudiados como posibles factores de predisposición a CP, sin embargo su participación en la etiopatogenia de la enfermedad no ha sido claramente establecida [3, 4]. La asociación entre la actividad androgénica hormonal y CP ha sido ampliamente descrita, pues se conoce que los varones con disgenesia testicular o los sujetos castrados, no desarrollan esta neoplasia. Artículos recientes parecen apoyar la hipótesis de una asociación causal entre el factor infeccioso relacionado con la actividad sexual (enfermedades venéreas) y CP, sin embargo aun no está claro que agentes patógenos en particular estarían involucrados en la etiología de CP [5-7].

En el presente trabajo hemos decidido enfocarnos en un factor genético reconocido de susceptibilidad al CP, que también está asociado a mecanismos de resistencia antiviral, por lo que a continuación se abordarán las características de la enfermedad, los factores de riesgo, principalmente los de naturaleza genética y dentro de los de tipo ambiental una serie de agentes virales oncogénicos que reconocidamente infectan el tejido prostático de manera crónica.

1.2. ANTECEDENTES GENERALES.

1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA DEL CANCER DE PRÓSTATA.

- **MUNDO:** A nivel mundial, el CP es la cuarta neoplasia más común. Las tasas de incidencia y mortalidad varían en forma acentuada entre los países de manera similar a las variaciones observadas entre los distintos grupos étnicos dentro de los Estados Unidos. Las tasas de incidencia y mortalidad por lo general son más elevadas en los países occidentales que en los países en vías de desarrollo (figura 1). Los países escandinavos muestran tasas particularmente elevadas de diagnóstico y mortalidad por CP en comparación con los países europeos septentrionales, un ejemplo es la tasa de mortalidad por CP en Noruega que duplica la registrada en España: 24/100 mil frente a 13/100 mil. Los países asiáticos sobre todo Japón y China presentan una de las tasas más bajas de incidencia y mortalidad por CP en el mundo.

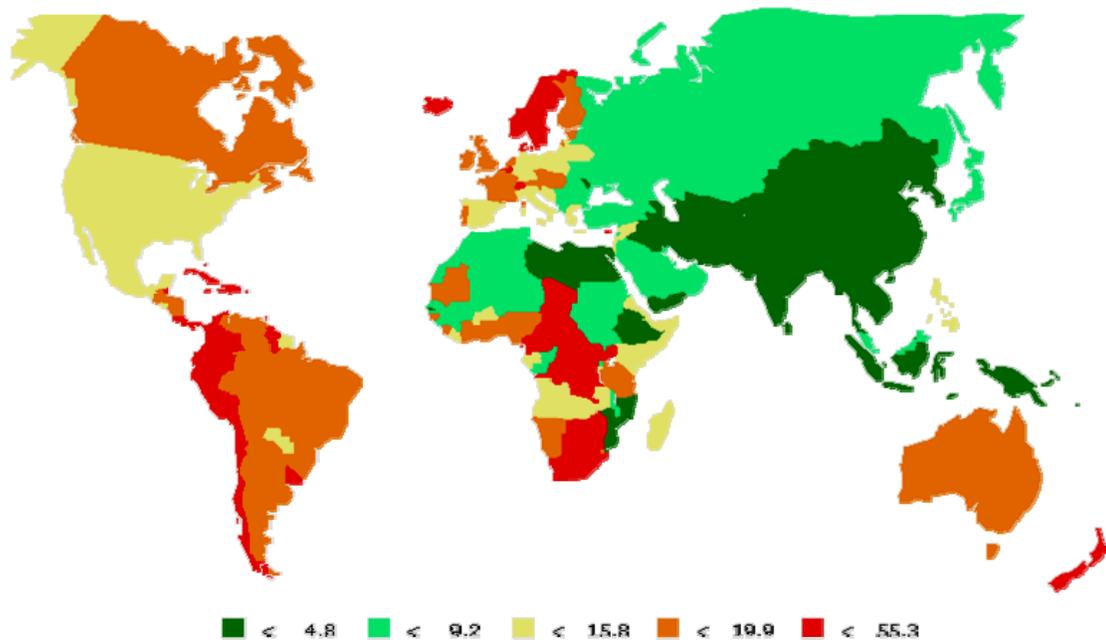


Figura 1. Tasas de Mortalidad para el 2002 según estadísticas del GLOBOCAN IARC.

Los estudios epidemiológicos indican que los varones de ascendencia africana tienen una incidencia elevada de CP en América. En Jamaica por ejemplo esta incidencia se estima en 305 por 100 mil habitantes.

- **ESTADOS UNIDOS.** Para el 2008, The American Cancer Society estimó que aproximadamente 565,650 Norteamericanos fallecieron a causa del cáncer, lo que representa más de 1500 personas al día (1 de cada 4 muertes). El cáncer es la segunda causa de muerte, después de las enfermedades del corazón [8]. La figura 2 muestra el número de nuevos casos y el número de muertes estimadas para el 2008 por los 10 tipos de tumores más frecuentes en Estados Unidos.

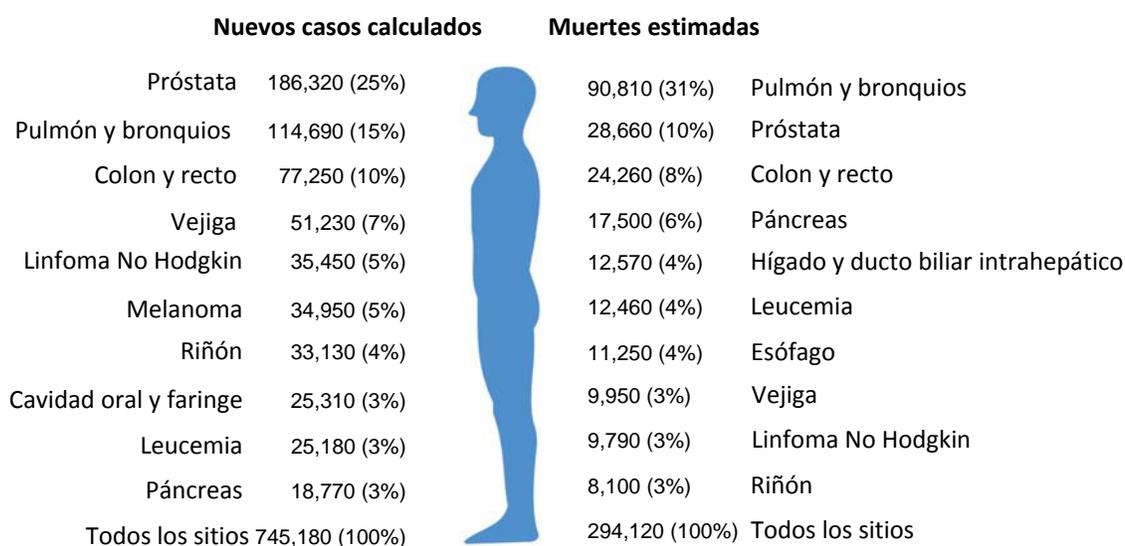


Figura 2. Sitios principales y estimaciones de nuevos casos de cáncer y muertes en Estados Unidos para el 2008.

En varones el CP representó el tipo de neoplasia más común ocasionando 28,660 muertes en esta población. Del 2001-2005 la mediana de la edad de diagnóstico de CP fue de 68 años y de 80 años la mediana de la edad de muerte por dicha enfermedad. La tasa de incidencia ajustada por edad y grupo étnico fue de 163 por 100 mil habitantes para todas las razas, de 93.8 para individuos de

origen asiático/pacífico, de 138 para hispanos, 156.7 para hombres blancos y de 248.5 para afroamericanos [9].

- **MÉXICO.** En nuestro país según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), durante el 2007, los tumores malignos representaron la tercera causa de muerte después de las enfermedades cardiovasculares y la Diabetes Mellitus (tablas 1 y 2) [2]. Según esta misma fuente, el número de fallecimientos en varones por tumores malignos fue de 31 mil 654, dentro de los cuales el CP representa la neoplasia maligna más frecuente, ocasionando un 15.68% de las muertes en este grupo de población (tabla 1).

El 89.38% de las muertes por CP se presentó en varones de 65 años y más (tablas 3 y 4), sin embargo a pesar de que para el 2007 no existen registros de defunciones por CP en otros grupos de edad, el comportamiento de las estadísticas se ha mantenido constante desde 1999 (figura 3) donde las variaciones en la mortalidad por CP en el grupo de varones de 65 años y más oscila entre el 87-89% [10].

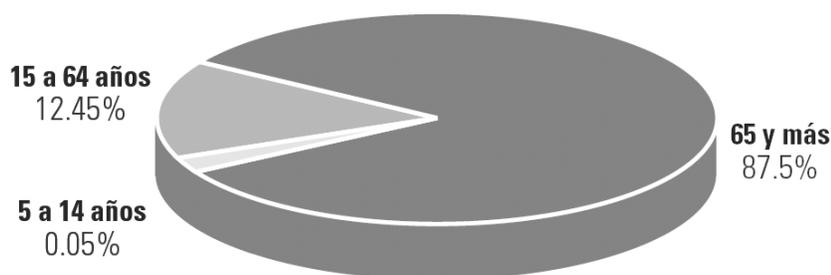


Figura 3. Distribución porcentual de las defunciones por cáncer de próstata según grupo de edad en México durante 1999.

Según el registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, la relación entre caso/defunción por CP, es de 3 casos por defunción en el grupo de edad de 45 a 64 años. Esta relación se ve igualada (1.1 caso/defunción) en el grupo de 65 años y más [11]. Los estados de la república que presentaron las tasas de mortalidad más elevadas son Michoacán, Nayarit y Durango con tasas de 25.4, 24.6 y 23.6 por cien mil habitantes, respectivamente. Sin embargo los estados con mayor número de casos de CP reportados son el Distrito Federal, Jalisco y Nuevo León con 1621, 660 y 471 casos, respectivamente [11].

En el estado de Nuevo León el número de casos de CP se ha mantenido en un rango de 385 a 612 del año 1999 al 2005, presentando su máximo en el año 2004. La tasa de mortalidad por cien mil habitantes de 17.1, ubican a Nuevo León en el 14vo. lugar a nivel nacional, sin embargo es el tercer estado de la república que reporta el mayor número de casos al año, precedido por el Distrito Federal y Jalisco [11].

Tabla 1. PRINCIPALES 3 CAUSAS DE MORTALIDAD GENERAL 2007.	
TOTAL	514420
Enfermedades del Corazón	87185
Diabetes Mellitus	70517
Tumores Malignos	65112

Tabla 2. PRINCIPALES 3 CAUSAS DE MORTALIDAD EN HOMBRES 2007.	
TOTAL	284910
Enfermedades del Corazón	45301
Diabetes Mellitus	33310
Tumores Malignos	31654
-Cáncer de la Próstata	4962
-Cáncer de tráquea Bronquios y Pulmón	4435

Tabla 3. PRINCIPALES 3 CAUSAS DE MORTALIDAD EN PERSONAS DE 65 AÑOS Y MÁS 2007.	
	TOTAL
Enfermedades del Corazón	64665
Diabetes Mellitus	42683
Tumores Malignos	35592
- Cáncer de Tráquea Bronquios y Pulmón	4569
- Cáncer de la Próstata	4435
- Cáncer de Hígado y de las Vías Intrahepáticas	3162

Tabla 4. PRINCIPALES 3 CAUSAS DE MORTALIDAD EN HOMBRES DE 65 AÑOS Y MÁS 2007.	
	TOTAL
Enfermedades del corazón	30761
Tumores Malignos	19120
- Cáncer de la próstata	4435
- Cáncer de Tráquea Bronquios y Pulmón	3086
- Diabetes Mellitus	18649

Tablas 1-4. Estadísticas vitales reportadas en México durante el año 2007. Fuente INEGI 2007.

1.2.2. DESCRIPCIÓN ANATOMO-PATOLÓGICA DE LA PRÓSTATA.

1.2.2.1. Localización anatómica y descripción.

La próstata es un órgano fibro-muscular retroperitoneal, que rodea el cuello vesical y la uretra y se halla desprovista de una cápsula delimitada (Figura 4). En el adulto normal la próstata pesa aproximadamente 20 g y tiene 3 cm de largo. [12]

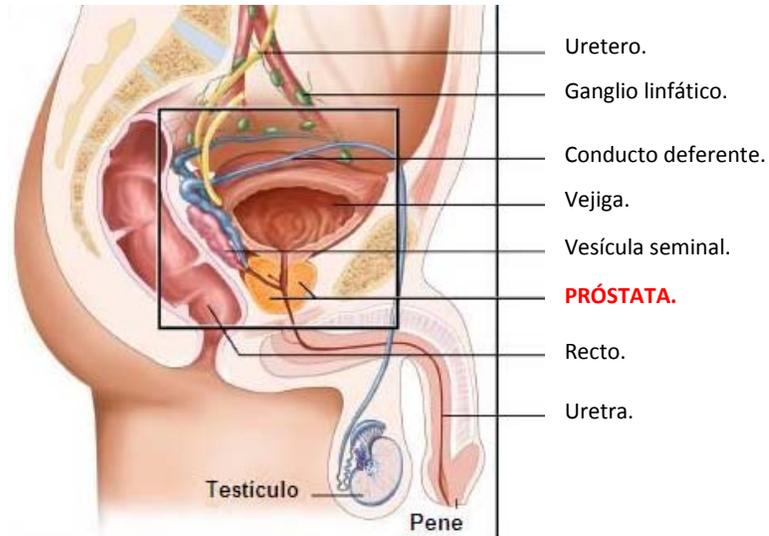


Figura 4. Localización anatómica de la próstata. El esquema muestra un corte de la región pélvica y la ubicación anatómica de la glándula prostática.

1.2.2.2. Estructura de la próstata.

Histológicamente, la próstata es un órgano túbulo-alveolar compuesto, que en un plano de sección presenta de pequeños a grandes espacios glandulares revestidos por epitelio. Las glándulas se hayan característicamente revestidas por dos capas de células: una capa basal de epitelio cúbico bajo, cubierto por una capa de células secretoras cilíndricas.

Todas las glándulas tienen una membrana basal y se hallan separadas por abundante estroma fibromuscular [12].

En el adulto, el parénquima prostático puede dividirse en cinco zonas o regiones biológica y anatómicamente distintas: zona central, región del estroma fibromuscular anterior, transicional, periférica y región glandular periuretral (figura 5) [13].

- a. Zona central.
- b. Zona fibromuscular.
- c. Zona transicional.
- d. Zona periférica.
- e. Región glandular periuretral.

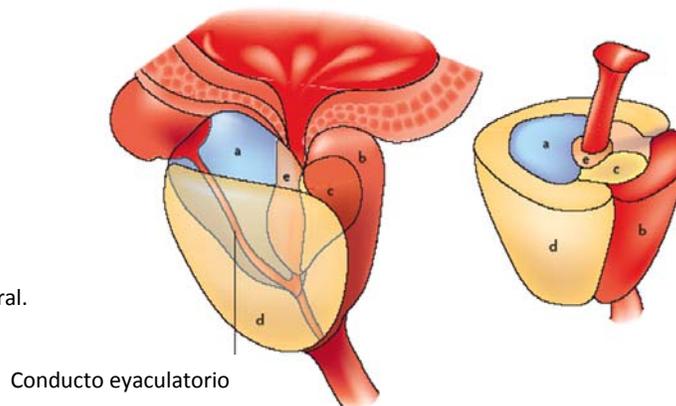


Figura 5. Zonas de la próstata. La próstata adulta normal contiene varias regiones diferentes que comprenden la zona central (a), fibromuscular (b), transicional (c), periférica (d) y la región glandular periuretral (e).

1.2.2.3. Principales patologías de la próstata.

Los tres procesos patológicos principales que afectan a la glándula prostática son *la inflamación* (bacteriana aguda o crónica, abacteriana crónica y granulomatosa), *el aumento nodular benigno* (hiperplasia prostática benigna, HPB) que afecta tanto los componentes epiteliales como mesenquimales de la próstata y *el cáncer*. No hay relación etiológica directa entre HPB y cáncer. Ambas patologías están relacionadas solo por su sitio anatómico de origen y la alta incidencia en hombres mayores de 40 años de edad [12, 14]. Mientras que los procesos inflamatorios han sido considerados como de menor significado clínico, los aumentos nodulares benignos son tan frecuentes en edades avanzadas, que tienden a considerarse como un proceso de envejecimiento “normal” [12]. El carcinoma prostático por su frecuencia y por sus consecuencias, es la patología prostática que más atención ha merecido a lo largo de varias décadas. A pesar de los grandes

esfuerzos enfocados en la detección oportuna y/o tratamiento de esta malignidad, el cáncer de próstata aún representa un grave problema de morbi-mortalidad a nivel mundial [4, 5, 15].

1.2.3 CÁNCER DE PRÓSTATA.

1.2.3.1. Descripción e historia natural de la enfermedad.

El CP consiste en un crecimiento descontrolado de las células prostáticas. Por su ubicación, este crecimiento presiona la vejiga y la uretra, lo que repercute en una dificultad para la salida normal de la orina, por lo que los principales síntomas del CP son de tipo obstructivo (figura 6) e incluyen: dificultad para orinar, volumen reducido de orina, poliuria (sobretudo en la noche), presencia de sangre en la orina, dolor en la eyaculación, y dolor en la zona superior de los muslos así como en la zona lumbar. Sin embargo el CP en sus etapas iniciales es asintomático [10].

En sus primeras etapas el CP sólo se limita a la próstata y no suele ser mortal; sin embargo en el 30% de los casos se comporta de manera agresiva y suele ocasionar mortalidad al diseminarse a otras partes del cuerpo [16], invadiendo primero la cápsula, posteriormente ganglios pelvianos y haciendo metástasis preferentemente a hueso (figura 8) [10].

1.2.3.2. Diagnóstico del CP.

La aproximación al diagnóstico y tratamiento del CP cambia a través del espectro de la enfermedad. Los algoritmos existentes están dirigidos hacia la determinación de si el cáncer es clínicamente significativo [14].

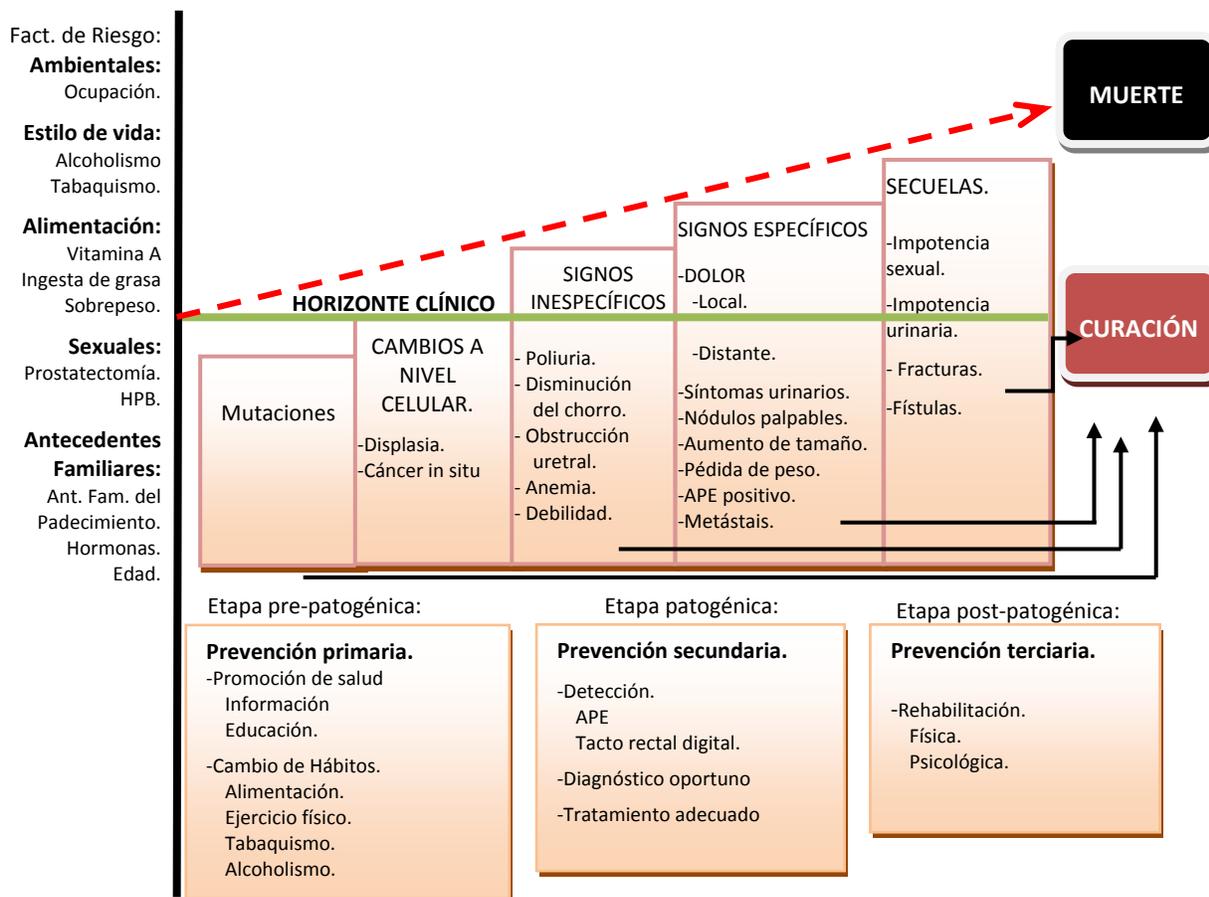


Figura 6. Historia Natural del CP. En la figura se resumen las diferentes etapas del CP, los cambios y signos que las acompañan, sus principales abordajes y se muestra una asociación con los diferentes factores de riesgo reconocidos para la enfermedad.

El antígeno prostático específico (APE) es una glicoproteína clasificada como serín-proteasa [17]. Se produce en el epitelio ductal y acinar y es secretado en el epitelio luminal. El tejido prostático normal produce mayor cantidad de APE por gramo que el CP y los tumores de próstata bien diferenciados, producen más APE que los pobremente diferenciados [14]. Se considera que el APE es órgano-específico pero no cáncer específico, puesto que sus niveles en sangre correlacionan entre otras cosas, con hiperplasia prostática benigna, el volumen de la próstata y la progresión del CP. Bajo condiciones patológicas, el APE entra a circulación a través de la ruptura de la membrana basal [18]. Los valores séricos de APE, se consideran como normales en un rango menor de 4.0

nanogramos (ng/ml), intermedios de 4.1-10.0 ng/ml y altamente sospechosos arriba de 10.0 ng/ml [10].

La identificación de un tacto rectal digital (TRD) sospechoso y/o un APE > 4.0 ng/ml son indicadores de biopsia prostática (BTR) que es considerado como estándar de oro para establecer el diagnóstico de la enfermedad. El tejido obtenido mediante BTR es evaluado mediante histopatología, lo que permite identificar y clasificar el grado de la enfermedad.

1.2.3.3. Clasificación y Tratamiento.

El tipo histológico más frecuente de CP es el adenocarcinoma y su grado de diferenciación es juzgado principalmente por la escala Gleason (figura 7)

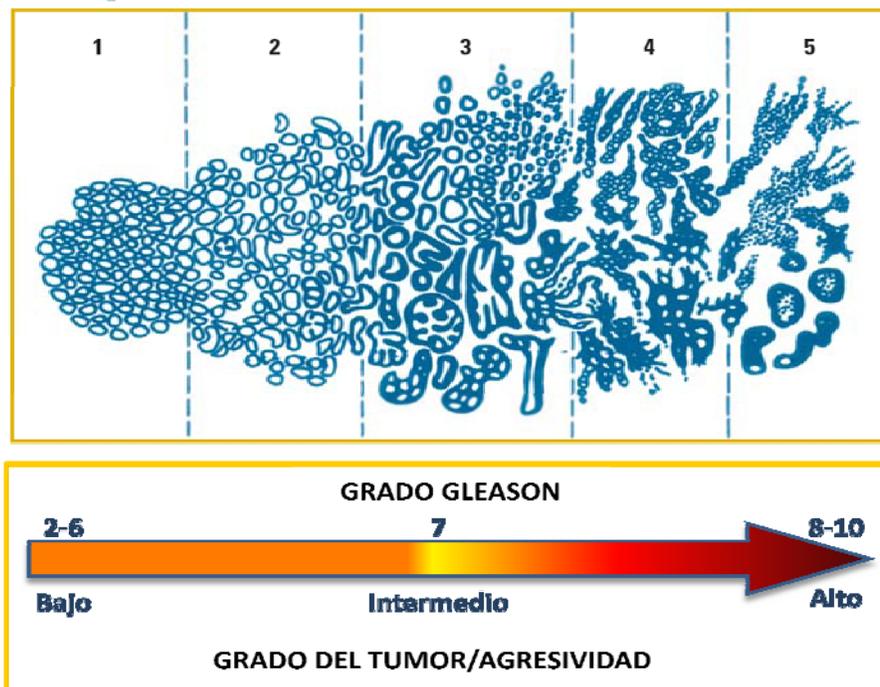


Figura 7. Grado Gleason. El grado Gleason describe el grado de similitud de las células tumorales y las células normales de la próstata. Mientras mayor sea la diferencia entre ellas, mayor grado Gleason y mayor grado de agresividad.

El grado Gleason evalúa los detalles en la forma/arquitectura de las células cancerosas. Existen 5 patrones de lesión diferentes dependiendo del grado de diferenciación y la pérdida de la arquitectura glandular (figura 7). El patrón 1 en el tumor es el más diferenciado (“menos malo”), con discreta deformación glandular y el patrón 5 es el más indiferenciado (“mayor malignidad”) con pérdida completa de la arquitectura glandular [14]. 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). Generalmente cuando se habla de grado Gleason se habla de agresividad de la enfermedad y aunque dos grados Gleason pueden tener el mismo valor entre sujetos, las características del tumor podrían ser diferentes [19]. Por ejemplo un CP con Gleason 7(3+4) es más probable que sea menos agresivo que un Gleason 7(4+3) aunque técnicamente se esté hablando del mismo grado Gleason.

Otra de las clasificaciones más ampliamente utilizadas es la clasificación Tumor Nódulo Metástasis (TNM). Este sistema está basado en la extensión del tumor (T), la extensión de la diseminación a los ganglios linfáticos (N) y la presencia de metástasis (M). Se añade un número a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y la extensión de la diseminación metastásica (tabla 5).

La evaluación inicial de la clasificación TNM, consiste en determinar el estadio local del tumor, ya sea, enfermedad intracapsular (T1-T2) o extra capsular (T3-T4) y tiene un impacto importante en la toma de decisiones para el tratamiento. Para muchos cánceres, entre ellos el de próstata, las combinaciones TNM corresponden a una etapa o estadio de cinco posibles. Una breve descripción de estas etapas y una representación gráfica se muestran en la tabla 6 y la figura 8 respectivamente.

Tumor primario (T)	
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
Ganglios linfáticos regionales (N)	
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)
Metástasis distante (M)	
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 5. Clasificación TNM. La estadificación TNM establece la extensión del tumor, diseminación a ganglios linfáticos y la metástasis; por ejemplo cáncer de próstata T2N0M0 significa que el tumor está localizado sólo en la próstata y no se ha diseminado a los ganglios linfáticos o a otras partes del cuerpo.

Etapa o estadio	Definición
Etapa 0	Carcinoma in situ (cáncer que está presente sólo en la capa de células en donde se inició).
Etapa I, Etapa II y Etapa III	Los números más altos indican enfermedad más extensa: tamaño mayor del tumor y/o diseminación del cáncer a ganglios linfáticos vecinos y/o a órganos adyacentes al tumor primario.
Etapa IV	El cáncer se ha diseminado a otro órgano.

Tabla 6. Etapas del Cáncer de acuerdo a la clasificación TNM. La combinación TNM da origen a 5 etapas posibles (0-IV), en las cuales se incluye el tamaño del tumor y la extensión de la diseminación y/o metástasis.

Una vez que el estado del paciente es identificado, se realiza un pronóstico de evaluación con fines terapéuticos, se consideran las opciones de tratamiento y se toma una decisión para ofrecer una intervención [14].

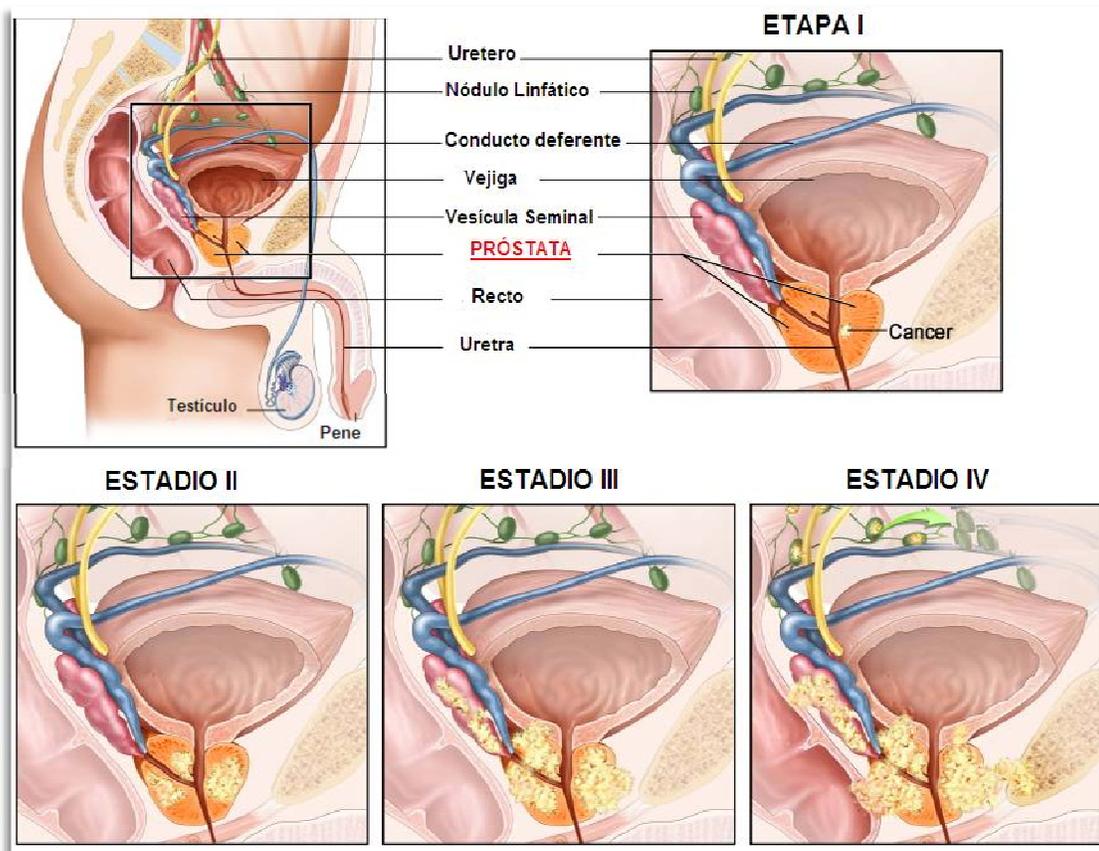


Figura 8. Etapas del CP de acuerdo a la clasificación TNM. Las etapas I y II representan un CP órgano confinado, mientras que en los estadios III y IV el CP presenta invasión a ganglios linfáticos y metástasis respectivamente.

El tratamiento depende de la clasificación TNM y de la edad del paciente. En términos generales, las personas con cáncer T1-T2 tempranos, localizados, que no han invadido la cápsula, deberán ser sujetos a prostatectomía radical. La sobrevida de estos pacientes es buena en general; es decir el 90% sobrevive a los 15 años con tratamiento precoz. Las complicaciones de la prostatectomía radical son la impotencia y la incontinencia urinaria. Si se diagnóstica un cáncer TNM etapa IV con metástasis a distancia, sólo se realiza tratamiento paliativo con supresión del estímulo hormonal. De estos pacientes un 10% muere antes del año con o sin tratamiento y otro 10% vive más de 10 años. El promedio de sobrevida con un TNM IV es dos a tres años. La radioterapia solo se usa a

nivel local con implantes en estadios TNM I o II. También se utiliza como tratamiento local de las metástasis de columna, pero sólo es paliativo [10].

1.2.3.4. Lesiones precursoras del CP.

Por varios años se ha considerado a la neoplasia intraepitelial prostática (PIN: siglas en inglés) y a la hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) como lesiones precursoras del CP. Sin embargo, hasta la fecha el PIN permanece como la única y bien probada condición pre-neoplásica con significancia clínica. La HAA, más que ser considerada una lesión pre-maligna, es considerada como un proceso glandular benigno de la zona de transición que simula a un adenocarcinoma acinar [20]. Otras lesiones como el PIN de bajo grado o la atrofia han sido sugeridas como lesiones pre-neoplásicas sin embargo las evidencias son mucho menos convincentes que las encontradas para el PIN. A continuación se presenta la descripción y las principales características de algunas de las lesiones consideradas como precursoras del CP.

A. Neoplasia Intraepitelial Prostática (PIN siglas en inglés).

Es una lesión que ha sido ampliamente aceptada como precursora del CP gracias a estudios histológicos, inmunohistoquímicos y genéticos. Se caracteriza por una transformación del epitelio de revestimiento secretor, de los ductos prostáticos y de los acinos [21]. Además de cambios en la arquitectura de las células epiteliales, la PIN se caracteriza por la existencia de cambios nucleares y por mantenimiento del epitelio basal [22]. Inicialmente se le clasificó en tres grados (I, II y III), sin embargo actualmente se ha agrupado como PIN de bajo grado (grado I) y PIN de alto grado (grado II y III) [21, 23], también abreviado como HGPIN (siglas en inglés). La clasificación en PIN de bajo o alto grado se realiza en base a las características citológicas de las células secretoras: en el PIN de

bajo grado el núcleo de las células está agrandado, varía en tamaño, su contenido de cromatina va de normal a sutilmente incrementado y los nucléolos son apenas visibles y de apariencia normal; mientras que en el PIN de alto grado las células poseen un núcleo prominente de tamaño muy uniforme, poseen un incrementado contenido cromatínico (que puede estar irregularmente distribuido) y un nucléolo prominente muy similar al de las células tumorales. La membrana de células basales está intacta en el PIN de bajo grado, mientras que se observa un incrementado grado de ruptura en el PIN de alto grado. De manera similar al adenocarcinoma, el citoplasma de las células en la mayoría de los casos de PIN de alto grado es positivo para α -methylacyl-CoA racemasa [21].

Evidencias clínico-morfológicas que asocian a HGPIN y CP.

Existen diversas evidencias que ligan al PIN de alto grado con el CP, dentro de las más importantes se encuentran las siguientes:

- Al igual que el CP, la incidencia del PIN incrementa con la edad.
- La frecuencia, severidad y extensión del PIN incrementa cuando se asocia con CP.
- El HGPIN como el CP son lesiones focales que afectan principalmente a la zona periférica de la glándula prostática;
- Desde el punto de vista morfológico puede observarse una transición entre HGPIN y carcinoma prostático y
- El HGPIN comparte alteraciones genéticas con el CP.

Evidencias genéticas y moleculares que asocian a HGPIN y CP.

- Las tasas de muerte y proliferación celular son elevadas en HGPIN y CP comparadas con las encontradas en próstatas normales.
- El HGPIN y el CP son fenotípica y morfométricamente similares.
- Algunas alteraciones genéticas y moleculares son comunes en ambas lesiones.
- La membrana de células basales está interrumpida en HGPIN y ausente en CP.
- La tasa de neovascularización es elevada tanto en HGPIN y CP, comparada con próstatas normales.

B. Hiperplasia Adenomatosa Atípica (HAA).

También llamada adenosis, adenosis atípica, hiperplasia acinar atípica o hiperplasia atípica. La hiperplasia adenomatosa atípica (HAA) consiste en una proliferación acinar constituida por glándulas de pequeño a mediano calibre, que forman un nódulo bien circunscrito, frecuentemente situado en la zona transicional. Su arquitectura es similar a un adenocarcinoma bien diferenciado (Gleason 1 y 2). A diferencia de éste, la HAA se caracteriza por la ausencia de agrandamiento nuclear y nucleolar significativo y la presencia de la membrana basal fragmentada [21, 24]. Ambas características pueden ser demostradas por inmuno-tinción para citoqueratinas de alto peso molecular (34βE12) o p63 [21]. Es importante mencionar que el empleo de HAA está restringido a una lesión bien definida que ocurre en la zona de transición en asociación con hiperplasia nodular y no debe ser empleada para describir otros tipos de proliferaciones glandulares tales como atrofia lobular, hiperplasia postatrófica o adenosis esclerosante [24]. Hallazgos recientes de alteraciones moleculares, incluyendo inmuno-reactividad para p504S, un biomarcador para CP, sugieren que al menos un subgrupo de casos de HAA pueden estar relacionados a CP de la zona de

transición, sin embargo no existen datos clínicos que corroboren el potencial maligno de esta lesión [24].

C. Atrofia Inflamatoria Proliferativa (PIA, siglas en inglés).

La atrofia de la próstata se define como una reducción en el volumen de glándulas y estroma pre-existentes y presenta dos patrones: difusa y focal. La atrofia difusa resulta de una disminución en los andrógenos circulantes e involucra la próstata completa de manera casi uniforme, mientras que la atrofia focal no está relacionada con la disminución de andrógenos y se presenta como “parches” de epitelio atrófico rodeado de epitelio de apariencia normal [25].

El término de atrofia inflamatoria proliferativa fue propuesto por De Marzo AM et al en 1999 para designar focos discretos de epitelio glandular proliferativo con apariencia morfológica de una atrofia simple o hiperplasia postatrófica que se encuentra en asociación con inflamación [25]. Histológicamente, la mayoría de las lesiones que contienen infiltrados inflamatorios tanto agudos como crónicos están asociadas con epitelio atrófico o epitelio atrófico focal [13]. Comparado con el epitelio normal y mientras la mayoría de las lesiones de atrofia focal han sido consideradas quiescentes, existe una fracción incrementada de células epiteliales que proliferan en dichas lesiones (PIA) [25, 26]. Sin embargo, no todas las lesiones atróficas de la próstata muestran un incremento en células inflamatorias y es por ello que se ha propuesto el término de “Atrofia Proliferativa” (PA siglas en inglés) para esas lesiones [27].

Atrofia Inflamatoria Proliferativa y CP.

En el epitelio de una próstata normal, la mayoría de las células en división celular se encuentran principalmente en el compartimento basal (figura 6). Se ha identificado que las células de PIN y

adenocarcinoma poseen un fenotipo secretor, por lo que se ha postulado que las células blanco de transformación neoplásica en la próstata son aquellas con un fenotipo intermediario entre secretor y luminal [25, 27]. Interesantemente las células atróficas no quiescentes poseen marcadores intermediarios entre células basales y lumbinales.

Algunos de los cambios moleculares y genéticos que se han observado en HGPIN y CP también han sido documentados en PIA: por ejemplo *NKX3.1*, *CDKN1B* (codifica para p27) y *PTEN* son regulados a la baja en lesiones atróficas focales. Esos genes son altamente expresados en epitelio normal y su expresión se encuentra disminuida o ausente en PIN y PC. Además las alteraciones en p53 y el receptor de andrógenos (RA) así como pérdidas en el cromosoma 8p y ganancia en 8q24 son alteraciones también frecuentes en PIA, PIN y CP [21]. Por otro lado, diversos estudios morfológicos han observado transiciones entre epitelio atrófico y adenocarcinoma, así como áreas de PIA y/o PA con HGPIN [13, 27, 28].

Considerando lo anterior, se ha sugerido que la PIA sea considerada una lesión precursora del CP y con base a esto se ha propuesto un modelo de progresión del CP considerando la hipótesis “Del daño y la regeneración” (figura 9).

1.2.3.5. Predisposición zonal de las lesiones de la próstata.

A pesar de que se conoce una predisposición zonal del CP, también es conocido que la frecuencia de malignidad en las diferentes zonas de la próstata no es proporcional al tejido glandular presente [13]. La predisposición zonal de los diferentes tipos de lesiones que ocurren en la próstata queda de manifiesto con las siguientes observaciones:

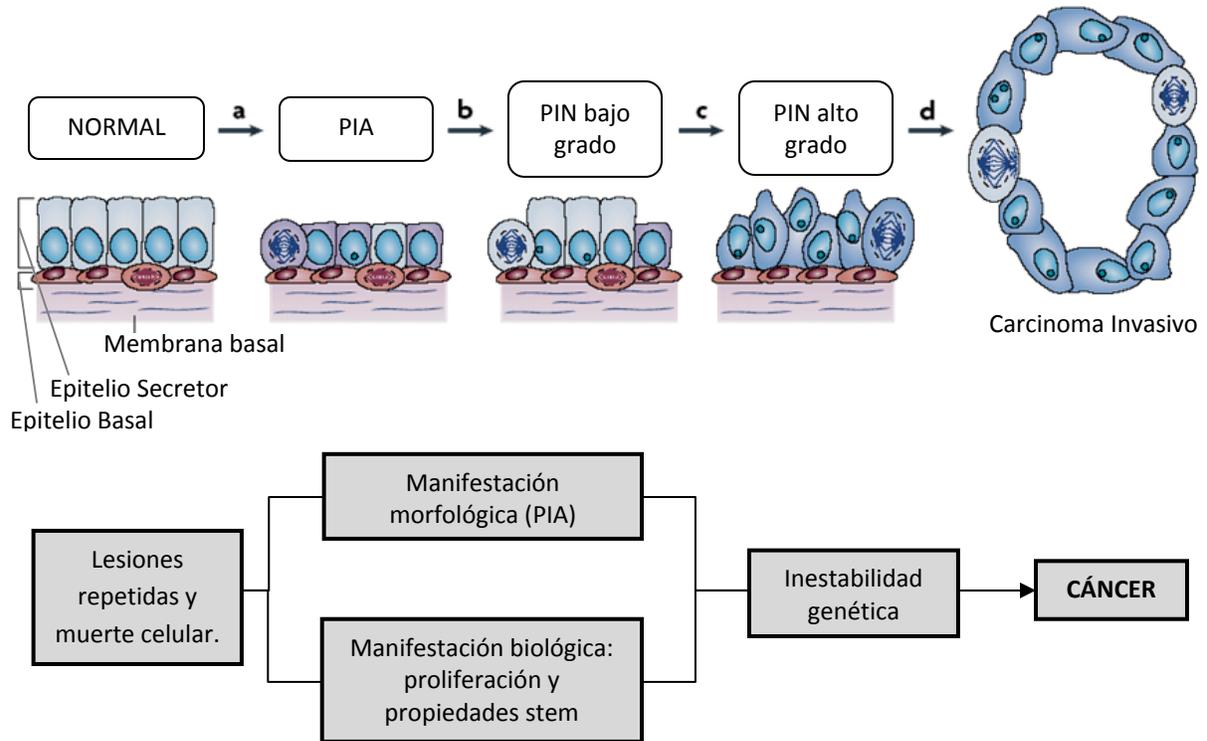


Figura 9. Modelo de progresión del CP. La infiltración de células inflamatorias causada por infecciones repetidas, dieta y/o autoinmunidad, ocasiona especies reactivas de oxígeno y en consecuencia daño al DNA, lesión celular y muerte, lo que promueve la regeneración celular del epitelio. La manifestación morfológica es la atrofia focal o PIA y la manifestación biológica es un incremento en la proliferación celular e incremento masivo en las células epiteliales que poseen fenotipos intermediarios entre células basales y luminales. En este grupo de células (que contienen algunas propiedades stem) ocurren alteraciones somáticas (metilación de GSTP1 y acortamiento de telómeros). Esos cambios pueden incrementar la inestabilidad genética e iniciar la formación de un HGPIN. En un escenario inflamatorio y de exposición a daño celular en células con funciones de vigilancia comprometida se generan cambios adicionales, tales como rearrreglos cromosómicos, resultando en la inactivación de la familia ETS, la activación de MYC, pérdida de PTEN y NK3.1 entre otros, promoviendo la formación del CP.

- El 68% de los tumores se desarrollan en la zona periférica, muy pocos tumores se desarrollan en la zona central (8%) y alrededor del 24% en la zona transicional [10]. Tanto los tumores grandes y pequeños que se encuentran en la zona periférica se encuentran asociados a PIN, mientras que los de la zona de transición tienden a ser de bajo grado y se asocian más frecuentemente a HAA y menos frecuentemente están asociados a PIN. Los

tumores que se desarrollan en la zona periférica son detectados mediante DRE, mientras que los tumores que se desarrollan en las zonas central y transicional se valoran mejor mediante ecografía [10, 14].

- La mayoría de las lesiones de HPB se desarrollan en la zona de transición mientras que la inflamación que se encuentra en esta zona generalmente está asociada a nódulos de hiperplasia y a atrofia.
- La inflamación aguda puede encontrarse tanto en la zona periférica, como en la zona de transición; la inflamación localizada en la zona periférica ocurre con atrofia en la mayoría de los casos.
- Los diversos patrones de atrofia acompañados de PIN o con pequeñas lesiones de carcinoma son más prevalentes en la zona periférica, con menor frecuencia en la zona de transición y en muy pocas ocasiones ocurren en la zona central [10, 12, 14].

1.2.4. Factores de riesgo para CP.

La etiología del CP permanece aún incierta; además de la edad, historia familiar y grupo étnico, existen pocos factores de riesgo bien establecidos para esta enfermedad. Factores relacionados a la dieta, conducta sexual, agentes infecciosos, factores “maduracionales” y condiciones y/o procedimientos médicos han sido sugeridos recientemente como factores de riesgo potenciales para CP, pero su participación en la etiopatogenia de la enfermedad no ha sido claramente establecida [29]. En los párrafos siguientes se describen brevemente los principales factores de riesgo para CP, así como los principales estudios que los respaldan.

1.2.4.1. Edad.

De acuerdo a las estadísticas de mortalidad en grupos de 65 años y más y a diversos estudios realizados en especímenes de autopsias y donadores de órganos [30-32], la edad es el factor de riesgo para CP mejor conocido y aceptado.

En búsqueda de cambios tempranos asociados a CP Sakr *et al* (1993), evaluaron 152 glándulas prostáticas provenientes de hombres jóvenes en edades entre los 10 y 49 años de edad, encontrando una frecuencia de 0%, 9%, 20 y 44% de PIN y 0%, 0%, 27% y 34% de CP en pacientes en la segunda, tercera, cuarta y quinta década de edad, respectivamente [30]. En búsqueda de CP incidental, Yin *et al* (2007) analizaron 340 próstatas de donadores de órganos de 1-81 años de edad y reportaron un 0%, 0%, 23.4%, 34.7% y 45.5% de CP en sujetos de <39, 40-49, 50-59, 60-69 y de 70-80, respectivamente [32]. De manera general se ha encontrado una asociación significativa entre la incidencia de adenocarcinoma, HGPIN y adenocarcinoma con HGPIN y con la edad.

En México, como se mencionó previamente, según la distribución porcentual de las defunciones por CP por el grupo de edad durante 1999 (figura 3), la proporción de muertes por CP se vio incrementada conforme aumenta la edad de los individuos [10]. Dicho aumento significa que un individuo que pertenece al grupo de edad de 15 a 64 años tiene un riesgo adicional del 75% de morir por CP al cumplir los 65 años de edad. Estos datos dejan de manifiesto el factor de riesgo que representa la edad en la adquisición de CP.

1.2.4.2. Grupo Étnico.

Existe una predisposición diferencial para CP entre los diferentes grupos étnicos. Tal es el caso de los hombres de raza negra que poseen el doble de riesgo de contraer CP comparado con los hombres euro-americanos y cuando poseen historia familiar de CP su riesgo se incrementa 6.4

veces más. De manera adicional, se ha reportado que el CP es más agresivo en hombres de raza negra que en hombres de otros grupos étnicos [33]. Las diferencias en la mortalidad entre los diferentes grupos étnicos es un factor que deja clara la participación del factor racial en el desarrollo del CP, por ejemplo: en Estados Unidos las tasas de mortalidad para hombres negros con CP localizado, regional, distante y sin clasificar son de 1.9, 1.5, 2.4 y 2.0 veces que sus homólogas en hombres blancos, respectivamente.

Por otro lado como se mencionó previamente los países asiáticos presentan las tasas de mortalidad por CP más bajas reportadas alrededor del mundo. En Estados Unidos las tasas de mortalidad ajustadas por edad demuestran que los hombres de origen asiático poseen una tasa de mortalidad más baja (93.8), seguidos por los hispanos (138), hombres de raza blanca (156.7) y por último por los afroamericanos (248.5), quienes poseen la tasa de mortalidad más elevadas en ese país [9].

1.2.4.3. Dieta.

La marcada variación en incidencia y mortalidad de CP a través de regiones geográficas y grupos étnicos y los cambios en los valores de riesgo observados en grupos inmigrantes, sugiere que la dieta y/o estilo de vida afectan el desarrollo de CP [34, 35]. En Estados Unidos, se ha observado un riesgo incrementado para CP en la primera generación de inmigrantes chinos y japoneses, lo cual sugiere que la dieta podría influenciar la conversión de tumores latentes en clínicamente significantes [36].

Algunos componentes de la dieta que se ha observado que confieren un riesgo incrementado para CP incluyen el consumo de productos animales, en particular carnes rojas y grasas saturadas [34, 37]. Los componentes de las carnes rojas que pudieran promover el desarrollo de CP no han sido

identificados, sin embargo se sabe que las altas temperaturas generadas al cocinar dichos productos directamente sobre la flama, en parrillas o parrillas de carbón, forman aminas aromáticas poli-cíclicas y carcinógenos aromáticos hidrocarbonados poli-cíclicos. Una de las aminas heterocíclicas carcinogénicas, el 2-amino-1-metil-6-p-fenilimidazol [4,5-b]piridina (PhIP) causa CP en roedores [34, 37].

Los componentes de la dieta que pueden tener un papel protector contra el desarrollo de CP incluyen antioxidantes como licopeno y beta caroteno, vitamina A y retinol, vitamina C y vitamina E. De la misma manera, los fito-estrógenos derivados de la soya y cereales, así como la vitamina D y el selenio pueden conferir protección contra el CP [37].

1.2.4.4. Historia Familiar.

Desde 1960 se ha propuesto agregación familiar del CP. Estudios caso-control y de cohorte han confirmado la asociación y la historia familiar es ahora establecida como un factor de riesgo para CP [38]. El riesgo puede ser obtenido de dos formas: un CP familiar y una forma menos frecuente CP que es denominado hereditario [14]. Se dice que un caso de CP es familiar cuando el miembro afectado posee uno o más familiares en primer grado con la enfermedad [38]. El CP hereditario se define como un subgrupo de CP familiar que se asocia a inicio temprano de la enfermedad y que muestra un patrón de distribución de un gen de susceptibilidad, consistente con la herencia mendeliana, de tipo autosómico dominante y de penetrancia incompleta y también una forma ligada al cromosoma X [14, 38, 39]. Se ha establecido que el riesgo de CP se incrementa de acuerdo al número de miembros de la familia afectados y al grado de parentesco que además está inversamente relacionado con la edad en la que los miembros de la familia contrajeron la enfermedad (tabla 7)[38].

Historia Familiar	Riesgo relativo	Riesgo absoluto (%)
Ninguno	1	8
Padre o hermano	2	15
Padre o hermano afectado a una edad <60 años.	3	20
Padre y hermano	4	30
CP Hereditario.	5	35-45

Tabla 7. Historia familiar y riesgo de CP.

- **Loci de susceptibilidad a CP familiar.**

Además de los estudios realizados por Woolf (1960), Cannon *et al* (1982), Meikle *et al* (1985) entre otros [40, 41], que sugieren una significancia de factores familiares en el CP, varios loci de susceptibilidad para CP familiar han sido identificados a lo largo del genoma (19q, 17p11, 1q25, 16q22.3-q23.1, 13q12.3, 11p11.2, 10q25, 10q23.31, 10p15, 8p22, 7q11.23, 7p11-q21, 7p22, 3p26, Xq11-q12, 22q12.3, 22q12.1, 1q42.2-q43, 20q13) [42]. Varios genes candidatos han surgido de esos análisis (tabla 8); dentro de ellos, los HLODs más altos reportados corresponden a RNASEL (5.43) y ELAC (4.3).

ELAC/HPC2 en 17p codifica para una hidrolasa metal dependiente que podría explicar parcialmente efectos ambientales sobre las células epiteliales de la próstata [3]. RNASEL en 1q25, es un locus ligado a HPC1 (siglas en inglés de Cáncer Hereditario de Próstata) y codifica para una ribonucleasa que forma parte del sistema 2'5'-A y cuya función es degradar RNA viral y celular e inducir apoptosis bajo condiciones de infección viral [3, 43, 44]. Otro de los genes más ampliamente estudiado es el receptor 1 de macrófagos "carroñeros" (MSR1) sobre 8p22. En los macrófagos que se encuentran en sitios de inflamación en la próstata, este receptor es el responsable de la unión, internalización y procesamiento de un amplio rango de moléculas cargadas negativamente, entre ellas los lipopolisacáridos y otras toxinas bacterianas [3, 43].

LOCI	UBICACIÓN	HLOD
Región PCAP	1q42.2-43	2.2
Región HPC1 (RNAsL)	1q23-25	5.43
Región HPCX	Xq27-28	3.85
Región CAPB	1p36	3.65
Región HPC20	20q13	1.08
MSR1	8p22-23	1.84
Región HPC2 (ELAC)	17p	4.3

Tabla 8. Loci de susceptibilidad a CP hereditario. La tabla muestra el nombre de la región, la ubicación cromosómica y el HLOD reportado para cada uno de los loci.

- **El gen RNASEL y su asociación a susceptibilidad genética al CP.**

El gen RNASEL (figura 10), codifica para la RNAsa L, tiene una longitud de aproximadamente 13 Kpb y está constituido por 7 exones. Codifica para una proteína de 741 aminoácidos que posee un dominio bipartito en su estructura, en la cual la mitad N-terminal reprime al dominio RNAsa en la región C-terminal. La unión del oligonucleótido 2'5'A a la región represora de RNAsa L releva la inhibición, resultando en la exposición de los dominios de dimerización y de RNAsa [44].

Estudios iniciales de ligamiento genético identificaron que marcadores de la región HPC1 se cosegregaban con casos familiares de cáncer de próstata, pero la identificación del gen involucrado se estableció en el 2002, cuando se correlacionó la presencia de mutaciones germinales en el gen RNAsa L en dos familias afectadas por esta neoplasia [45]. La conexión RNAsaL/HPC1 sugirió que este gen codificaba para una proteína supresora o modificadora del cáncer de próstata [46]

HPC1: RNASEL

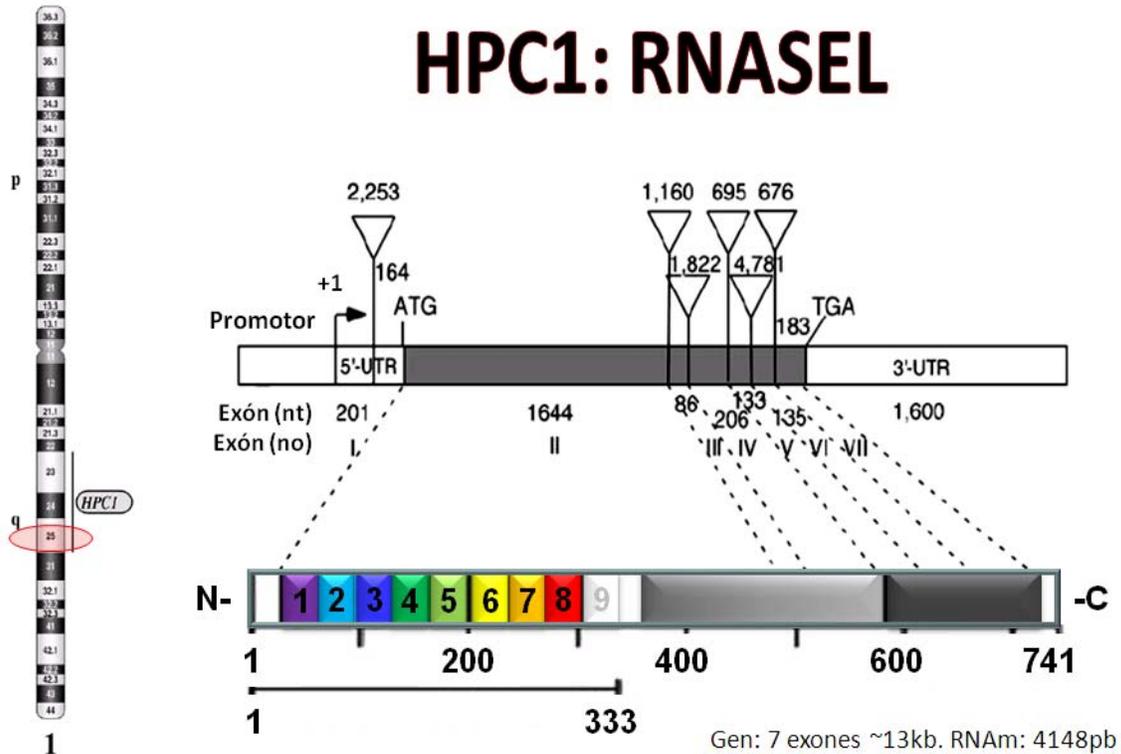


Figura 10. Ubicación y estructura del gen RNASEL. El gen RNASEL está localizado en el cromosoma 1q25 y tiene un tamaño aproximado de 13.0 kb. Está constituido por 7 exones de longitud y codifica para una proteína de 741 aminoácidos. La RNAsa L además de su dominio de RNAsa, posee en su estructura un dominio de dimerización y 9 repeticiones de ankirina que le brindan la capacidad de interaccionar con otras proteínas.

Los estudios de asociación de variaciones genéticas del gen RNAsa L con casos familiares y esporádicos de CP muestran que algunos alelos son relativamente frecuentes en sujetos afectados [44, 47, 48]. Aunque existen algunas controversias sobre estos reportes, particularmente debidas a la amplia variación patológica de los tumores estudiados, cuando se analizan casos familiares y esporádicos de CP metastático, se encuentran algunas variantes claramente asociadas [4, 49-51]. Los alelos met1ile, glu265x, arg462gln, asp541glu, 471delAAAAG del gen RNAsa L han sido los más analizados en estos estudios de asociación (figura 11). Estudios *in vitro* han demostrado que el alelo arg462gln se correlaciona con reducción de la actividad de RNAsa L en su capacidad de dimerizarse para lograr la forma catalítica y que tiene una actividad proapoptótica deficiente [44].

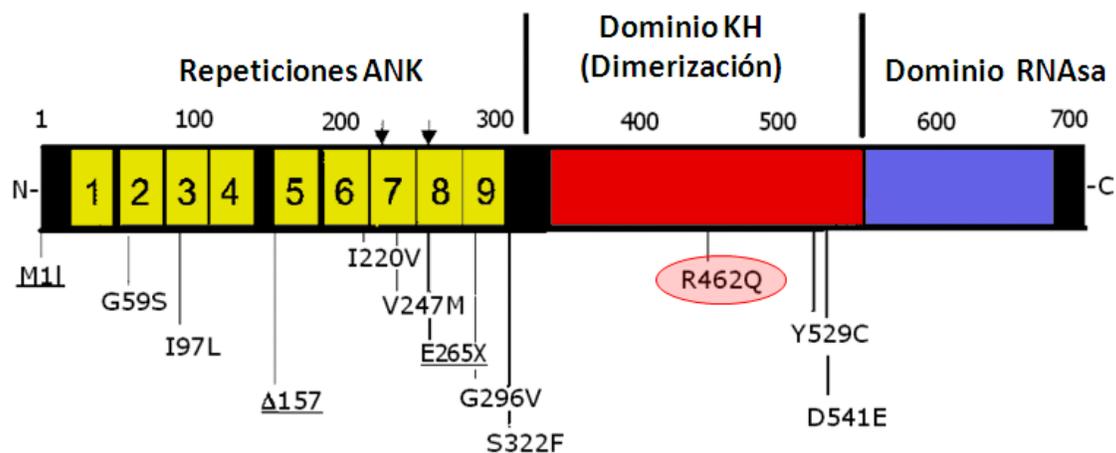


Figura 11. Variantes alélicas representativas del gen RNASEL. Dentro de las variantes alélicas del gen RNASEL La mutación 1385G-A (R462Q) ha sido la más estudiada y ha sido asociada con un incremento en el riesgo de CP ya que debido a su ubicación (en el dominio de dimerización), disminuye la dimerización de la enzima a la forma activa y produce una reducción en la habilidad de causar apoptosis en respuesta al sistema 2-5A.

1.2.4.5. Ambiente sexual.

Artículos recientes parecen apoyar la hipótesis de una asociación causal entre el factor infeccioso relacionado con la actividad sexual (enfermedades venéreas) y CP [52].

Dos metaanálisis han reportado asociaciones significantes entre CP y enfermedades transmitidas sexualmente. En uno de ellos, Taylor *et al* (2005), que comprende 29 estudios caso-control (6,022 casos de CP y 7320 controles) realizado en Estados Unidos, encontraron un riesgo incrementado para CP en hombres expuestos a HPV, gonorrea o cualquier enfermedad de transmisión sexual [53]. En el segundo de ellos, Dennis *et al* (2002) en un metaanálisis de estudios caso-control reportó una asociación significativa entre CP y presencia de enfermedades sexualmente transmitidas (RR =1.4) y prostatitis (OR= 1.6) [52]. Dentro de los estudio caso control relacionados con conducta sexual y CP, Fernández *et al* (2005), en Cuba, encontró riesgos incrementados a CP

en hombres con historia de enfermedad venérea (O.R=1.7, 95% CI=1.1-5) [6]. A pesar de que no todos los estudios han encontrado una asociación positiva entre enfermedades de transmisión sexual con CP [38], la evidencia epidemiológica sugiere la existencia de un componente infeccioso en la patogénesis del CP.

Existen diversos estudios en los cuales la ocurrencia de diversos agentes entre ellos los virus ha sido demostrada en tejido prostático tumoral y no tumoral, algunos de estos estudios ellos se consideran en la siguiente sección.

1.2.4.6. Patógenos virales y CP.

La contribución de la respuesta inmune y la respuesta inflamatoria al desarrollo del cáncer ha sido bien reconocida en diferentes tumores humanos [37, 54, 55]. Una de las hipótesis recientes acerca de la etiología del CP, es que la inflamación crónica o recurrente ocasionada entre otras cosas por virus, puede iniciar o promover el desarrollo del CP. Ésta hipótesis se fundamenta en primera instancia en la alta frecuencia de prostatitis sintomática y asintomática encontrada en biopsias de próstata o especímenes de resección de hombres de 40-79 años de edad [37]. En segundo lugar, a la observación que diversos organismos patógenos como los virus, pueden contribuir al proceso inflamatorio y son capaces de establecer infecciones crónicas persistentes en la próstata y por último, a la identificación de un grupo importante de genes de susceptibilidad a CP relacionados con la defensa del organismo a las infecciones y/o a la inflamación, tales como RNASEL, MSR1, MIC-1/NAG-1 y TLR4 [3, 56]. Dentro de los procesos en los que se ha demostrado la infección por virus se encuentran diversos episodios de prostatitis sintomática, en todos los procesos de prostatitis asintomáticos [37] y en los procesos tumorales de próstata [37, 56]. Estas

observaciones dejan clara la posibilidad de la participación de los virus en el origen y/o desarrollo del CP.

Ha sido reportado que los siguientes virus poseen actividades oncogénicas y además establecen infecciones persistentes en el tejido prostático: los papilomavirus humanos de alto riesgo (hrHPVs), los poliomavirus BK (BKV), JC (JCV) y SV40, los herpesvirus tipo 8 (HHV-8), citomegalovirus humano (HCMV), Epstein barr (EBV) [57-61] y más recientemente, el RNA virus xenotrópico relacionado con el virus de la leucemia murina (XRMV) [62]. A continuación se mencionan algunas características de éstos virus que ponen de manifiesto su oncogenicidad y presencia en la próstata.

- **HPVs:** Estos virus son capaces de replicarse in vivo en la próstata y son utilizados además para immortalizar células epiteliales in vitro [53]. Existen más de 100 tipos de HPVs, de los cuales los de alto riesgo están asociados a tumores malignos (ej. 16, 18, 45, 31, 33, etc.) [61]. Dentro de las neoplasias ocasionadas por estos virus se encuentran los cánceres de cérvix, oro-farínge, recto y ano, vulva y pene [63-65]. En un estudio caso-control, Adami *et al* (2003) midió la presencia de anticuerpos para los principales tipos de HPV (16, 18 y 33) en 238 sujetos con CP que no habían recibido tratamiento y en 210 controles, sus resultados evidenciaron un riesgo significativo para CP en aquellos sujetos con altos niveles de anticuerpos contra HPV 33 (OR=2.3; 95% CI, 1.2-4.1) [65]. De la misma manera que a nivel serológico, estudios como el de Kuczyk *et al* (2000) demuestran la presencia de la proteína E6 de HPV-16 en el 21% de muestras de CP [66]. Existen otros estudios que demuestran la presencia de HPVs oncogénicos en tejido prostático [64, 65, 67-69].

- **Poliomavirus:** Los poliomavirus BKV y JCV se encuentran con alta frecuencia en poblaciones humanas y más del 80% de los adultos son seropositivos [70]. Estos virus están estrechamente relacionados al virus SV40. Los antígenos T de estos virus son proteínas oncogénicas capaces de transformar células de mamíferos mediante la interacción con proteínas celulares tales como p53 y proteínas de la familia Rb [69]. Las infecciones primarias con estos virus ocurren en edades tempranas y raramente causan síntomas clínicos. Después de la infección primaria, estos virus establecen una infección persistente en el tracto urinario y algunos reportes han demostrado la detección de BKV y JCV en tejido prostático [69, 71].
- **Herpesvirus:** Los herpesvirus Epstein barr (EBV), Citomegalovirus (HCMV) y herpesvirus tipo 8 (HHV-8) poseen la característica de ser linfotrópicos. Las infecciones con HCMV causan la mononucleosis infecciosa e infecciones congénitas del sistema nervioso. Este virus también se ha asociado con CP; por ejemplo Samanta *et al* (2003) detectaron proteínas de HCMV en biopsias embebidas en parafina de 22 pacientes con PIN y carcinomas prostáticos mediante técnicas inmunohistoquímicas, FISH, PCR y secuenciación [72]. Al igual que el HCMV, los virus HHV-8 y EBV están fuertemente asociados a cánceres humanos y su presencia en tejido prostático tumoral ha sido bien establecida [73, 74]. Se ha propuesto que la alta frecuencia de infecciones por EBV y la carcinogenesis está ligada a factores ambientales.
- **Virus Xenotrópico relacionado al Virus de la Leucemia Murina (XMRV):** Urisman *et al* (2006), utilizando un microarreglo de DNA compuesto de oligonucleótidos representativos de todos los virus conocidos, identificaron la presencia de secuencias gamma retrovirales (virus XRMV) en muestras de DNAC de sujetos con CP homocigotos para la variante R462Q

del gen RNASEL (7 de 11 casos), y posteriormente por RT-PCR detectaron el virus en 8 de 20 casos de (40%) sujetos homocigotos para la variante mencionada [62]. Este virus, está estrechamente relacionado a virus de la leucemia murina, de los cuales son bien conocidas sus propiedades de causar tumores en ratones. Estos hallazgos representan el primer reporte de que un virus de este tipo puede producir una infección en humanos y a pesar de que su presencia no fue detectada en el tumor como tal, sino en las células del estroma que rodean al tumor, deja abierta la posibilidad de que una vez infectadas este tipo de células de alguna manera pueden influir el crecimiento tumoral.

Además de la presencia de diversas familias de virus en tejido prostático, otros estudios han establecido asociaciones positivas entre la presencia de anticuerpos contra diversos virus y CP. The US Third National Health and Nutrition Examination Survey demostró asociación entre CP y seropositividad para HCMV, Herpes HHV-8, Virus del Herpes Simplex tipo 1 y anticuerpos contra virus de la Hepatitis B y C virus en hombres jóvenes (edades de los 30-49 años); en hombres de 50-59 años seropositividad para Papillomavirus Humano tipo 16 (HPV-16), Virus del Herpes Simplex tipo 2, CMV, HHV-8 y Hepatitis C estuvo asociado con CP [38].

A pesar que diversos grupos han encontrado una clara asociación entre la presencia de virus oncogénicos y CP, otros reportan la misma prevalencia del agente patógeno tanto en tejido prostático normal como en tejido prostático tumoral [75-77]. Una de las explicaciones que se ha dado a esta divergencia es de naturaleza metodológica, ya que los métodos de detección de los genomas virales empleados por los diferentes grupos de investigación poseen diferente grado de sensibilidad y los procedimientos de colección y preservación de las muestras biológicas utilizadas

en los estudios son diferentes; por otro lado la exposición a los diversos tipos y/o variantes virales varía entre poblaciones, lo que podría explicar en parte la presencia o ausencia de asociación.

En este trabajo, nos enfocamos en el factor genético reconocido de susceptibilidad al CP RNASEL, que también está asociado a mecanismos de resistencia antiviral, por lo que a continuación se describirá este factor genético y una serie de agentes virales oncogénicos que reconocidamente infectan el tejido prostático de manera crónica.

1.3. ANTECEDENTES DIRECTOS: ASOCIACIÓN ENTRE DNA VIRUS, RNASEL Y CP.

Como se mencionó en el párrafo anterior, la próstata es blanco de múltiples infecciones virales crónicas y esto podría asociarse a la patogénesis de esta malignidad [65, 69]. Por otro lado, la participación del sistema inmune en el desarrollo del cáncer ha sido ampliamente descrita para diferentes tipos de tumores [37, 54, 55]. En la intersección de estos dos puntos, infecciones virales y respuesta inmune, se encuentran involucrados los interferones (IFNs), moléculas que se encargan de establecer la primera línea de defensa del organismo contra las infecciones virales [78]. La síntesis de IFNs ocurre en las células infectadas como respuesta a la presencia de productos virales invasores.

Los inmunoestimulantes asociados a la superficie de bacterias y parásitos son muy importantes para generar respuestas inmunológicas innatas, pero estos no están presentes en los virus. La única molécula inusual que se asocia a los virus es el RNA de doble-cadena (dsRNA), un intermediario de su ciclo vital (figura 12). Las células huésped pueden detectar el dsRNA e inducir la secreción de IFNs para iniciar un programa de respuestas antivirales. Los IFNs interactúan con las células vecinas activando un "estado antiviral" tisular, induciendo la expresión de la sintetasa 2-

5 oligo-A (una enzima que se encarga de la síntesis de oligoadenilatos 2-5A a partir de ATP) en aquellas células que entran en contacto con un dsRNA . Estos oligoadenilatos activan la síntesis del RNAm de la ribonucleasa I (RNasa L). Finalmente, la RNasa L se encarga de degradar rápidamente los RNAs mensajeros celulares y virales presentes en la célula infectada [78]. El proceso mediado por el sistema 2-5A deprime la síntesis de proteínas (reduciendo la producción de partículas virales) y activa la apoptosis de la célula infectada con el objetivo de controlar la infección viral. La ausencia de RNasa L en ratones transgénicos causa una deficiencia en la actividad antiviral del interferón y un defecto en la apoptosis [79].

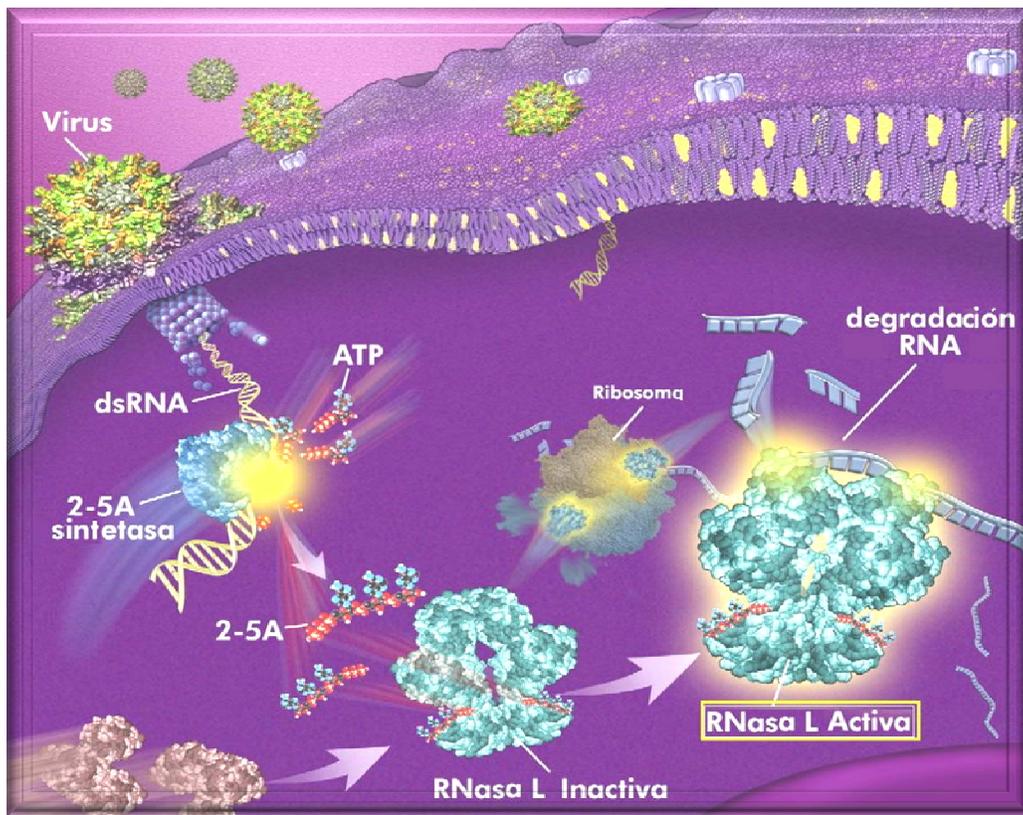


Figura 12. Mecanismo 2-5A/RNasa L. El RNA de doble cadena (dsRNA) asociado a patógenos virales, activa a la 2-5A sintetasa (también conocida como oligoadenilato sintetasa o OAS). Esto trae como resultado la síntesis de 2-5A del ATP. La unión del 2-5A al monómero inactivo de RNasa L ocasiona la formación de dímeros activos de RNasa L. El resultado es la degradación de regiones en forma de loop de cadena sencilla del RNA, incluyendo RNA ribosomal en ribosomas intactos, lo que produce una potente respuesta antiviral en las células tratadas con IFN e infectadas por virus.

El alelo R462Q se correlaciona con reducción de la actividad de RNasa L en su capacidad de dimerizarse para lograr la forma catalítica y además ocasiona que la célula tenga una actividad proapoptótica deficiente. Este fenotipo antiapoptótico de la deficiencia de RNasa L podría potencialmente suprimir el cáncer, sin embargo la RNasa L es también el principal mediador de la acción antiviral del IFN [80]. Esto lleva a considerar la posibilidad de que alteraciones en HPC1/RNASEL podrían ocasionar susceptibilidad a los agentes virales y esto a su vez predisponer o favorecer el desarrollo y/o progresión del CP. Esta hipótesis ha sido evaluada solo para el virus XMRV [81-83].

A pesar que es bien sabido que productos virales como el antígeno T de Py y las proteínas E6 y E7 de HPVs, son capaces de inducir transformación celular e interactuar de una manera sinérgica con la capacidad de señalización de la vía del interferón [84], ningún estudio ha establecido una relación entre el polimorfismo R462Q de RNasa L, otras infecciones virales y CP.

1.4. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO.

A nivel mundial diversos estudios han demostrado que la próstata es blanco de virus persistentes, que poseen potenciales oncogénicos bien reconocidos: HPVs, BKV, JCV, SV40, HHV-8, HCMV, Epstein Barr, entre otros. A pesar que diversos grupos de investigación han identificado la presencia de virus oncogénicos en tejido prostático, hasta la fecha existen solo dos reportes caso-control que evalúan la asociación del alelo R462Q y la presencia del virus XMRV en sujetos con PC y ninguno que lo relacione con otras infecciones virales (no XMRV) y CP.

En México, la prevalencia de dichos virus en la próstata, así como la frecuencia del polimorfismo R462Q del gen RNASEL y su asociación con cáncer de próstata no ha sido estudiada.

De existir dichas asociaciones podrían proveerse herramientas de tipo diagnóstico que junto con las características clínico-patológicas del tumor contribuyan a identificar susceptibilidad, en los pacientes y contribuyan a un mejor entendimiento de la etiología de la enfermedad.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS.

2.1. OBJETIVO GENERAL.

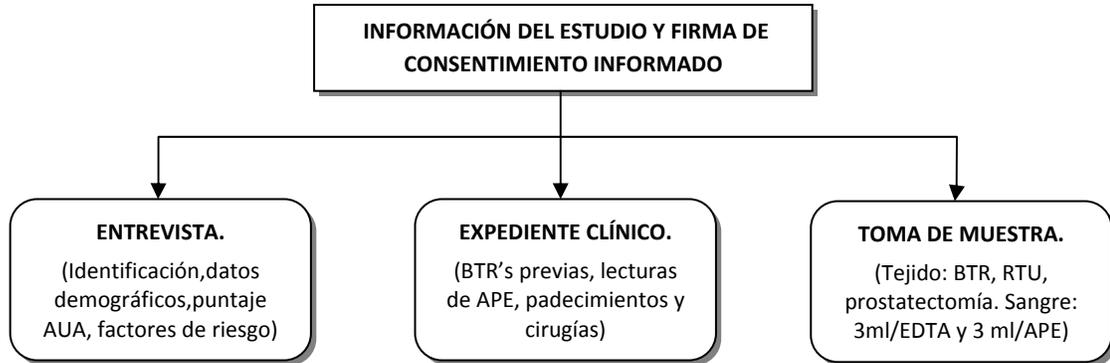
Determinar la prevalencia de virus potencialmente oncogénicos en tejido prostático tumoral y no tumoral, así como la frecuencia del polimorfismo R462Q en gen RNASEL y sus asociaciones simples y combinadas con cáncer de próstata.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Determinar la frecuencia del polimorfismo R462Q del gen RNASEL en los grupos de estudio.
2. Identificar la presencia en tejido prostático de los virus XMRV, HCMV, SV40, BKV, JCV y HPVs de alto riesgo.
3. Determinar la posible asociación entre el polimorfismo R462Q del gen RNASEL e infecciones virales crónicas (XMRV, HCMV, SV40, BKV, JCV y HPVs de alto riesgo), así como la posible asociación entre dicho polimorfismo y cáncer de próstata.

CAPÍTULO III. MATERIAL Y MÉTODOS.

3.1. ESQUEMA GENERAL DE LA PARTE CLÍNICA.



3.2. ESQUEMA GENERAL DE LA PARTE EXPERIMENTAL DE LABORATORIO.

Este proyecto fue revisado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Universitario de la Universidad Autónoma de Nuevo León “Dr. José Eleuterio González” bajo el número de identificación B104-001 y B107-001. Todos los pacientes que aceptaron participar firmaron carta de consentimiento informado.

3.3. DISEÑO DEL ESTUDIO.

El estudio que se realizó, es clasificado como un estudio caso-control prospectivo, en el cual se incluyeron dos grupos de pacientes: el grupo de estudio constituido por sujetos con CP y el grupo control formado por sujetos libres de la neoplasia.

3.4. CRITERIOS DE SELECCIÓN DE LOS PARTICIPANTES.

- **Criterios de Inclusión.**

Dentro de los criterios de inclusión para el grupo de casos se consideraron todos aquellos sujetos con diagnóstico histopatológico de CP con biopsia disponible. El grupo control fue conformado contemporáneamente con el grupo de casos y fueron elegibles solo si su diagnóstico histopatológico fue negativo para CP.

- **Criterios de exclusión.**

Todos aquellos pacientes que no contaran con biopsia disponible, que su muestra fuera de mala calidad y que no aceptaran participar fueron excluidos del estudio.

3.5. PACIENTES Y ORIGEN DE LAS MUESTRAS.

Todos los sujetos que experimentaron biopsia (BTR) por criterios clínicos (APE ≥ 4 ng/ml o tacto rectal sospechoso) o resección trans-uretral (RTU) en el Servicio de Urología del Hospital Universitario "José Eleuterio González", entre Octubre del 2006 y Julio del 2007 fueron incluidos.

3.5.1. Muestras biológicas.

Se tomó una muestra de sangre para determinación de APE y extracción de DNA previo al procedimiento de BTR, RTU o prostatectomía de cada participante. Se registraron datos demográficos, factores de riesgo e información urológica mediante un cuestionario que fue contestado por cada participante mediante entrevista.

La concentración de APE fue determinada a partir de muestras de suero mediante un ensayo inmunométrico quimioluminiscente en fase sólida (IMMULITE 1000).

El procedimiento de BTR fué realizado mediante un equipo de ultrasonido Logic Book XP de General Electric, Modelo 2005. La profilaxis de los pacientes consistió en la administración de 500 mg de ciprofloxacino cada 12h. por tres días antes de la biopsia y enema (450 mg citrato de sodio/45 mg lauril sulfoacetato) la mañana del procedimiento. La colección de la muestra fue realizada bajo anestesia local y mediante la técnica del octante empleando una aguja calibre 18 y pistola para biopsia. Dos cilindros adicionales procedentes del lóbulo derecho e izquierdo de la próstata fueron obtenidos para la determinación de secuencias virales. Fragmentos de 0.5X0.5cm de tejido prostático fueron obtenidos del procedimiento de RTU para evaluación virológica. Todos los diagnósticos histopatológicos fueron realizados por un solo patólogo.

3.6. EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.

El DNA de muestras sanguíneas fue obtenido mediante la técnica estándar de TSNTE y el DNA/RNA de muestras de tejido congelado fue extraído con Trizol (Invitrogen). Las muestras de tejido fueron homogenizadas y extraídas de acuerdo a las especificaciones del distribuidor. La cantidad y calidad de los ácidos nucleicos extraídos fue verificada espectrofotométricamente y por amplificación por PCR del gen GAPDH para descartar la presencia de inhibidores.

3.7. GENOTIPIFICACIÓN.

La evaluación de la variante R462Q (rs486907) de RNASEL fue realizada empleando la tecnología TaqMan (Applied Biosystems: ABI, Foster City, CA). Brevemente, en una primera etapa 10 ng de DNA fueron amplificados por PCR alelo específica. En una segunda ronda, la discriminación alélica fue realizada con el StepOne RT-PCR system mediante el software StepOne v2.0 (Applied Biosystems). Las condiciones de reacción, secuencias de sondas y primers empleadas durante la etapa de genotipificación se muestran en la tabla 9.

Secuencia de sondas y primers.	Condiciones de reacción (7 µL)	
Fw 5´-GGAAGATGTGGAAAATGAGGAAGA-3´ Rv 5´-TGCAGATCCTGGTGGGTGTA-3´	[Final] TaqMan PCR Mmix 2X.... 1X RNASEL FAM.....0.2µM RNASEL VIC.....0.2 µM Primer Fw.....5.0µM Primer Rv.....5.0µM	Termociclado: 95°C.....10 min 92°C.....15s 40 ciclos 60°C.....1min 4°C
6-FAM-CAGGACATTTGGGCAA-MGB NFQ VIC-CAGGACATTTGGGCAA-MGB NFQ		

Tabla 9. Etapa de genotipificación. Las secuencias de las sondas y primers, así como también las condiciones de reacción empleadas para la genotipificación de la variante R462Q de RNASEL se resumen en la tabla. El nucleótido polimórfico se muestra resaltado en la secuencia de las sondas.

3.8. DETECCIÓN DE SECUENCIAS VIRALES.

La detección de secuencias virales fue realizada mediante PCR anidada empleando protocolos descritos en la literatura [62, 69, 71] . De manera general, 500 ng de DNA fueron amplificados para la detección de BKV, JCV, SV40 y HPVs empleando los métodos descritos por Fedele *et al* (1999) y Zambrano *et al* (2002), respectivamente [69, 71]. Para la detección de XRMV, 1ug de RNA fue sometido a retrotranscripción empleando el sistema SSIII (Invitrogen), posteriormente se utilizaron 2 uL del DNAc sintetizado por reacción de PCR empleando la metodología descrita por Urisman *et al* (2006) [62]. La detección de HCMV fue realizada mediante 2 rondas de amplificación empleando dos juegos de primers específicos que amplifican una porción de la región UL3 de HCMV de 420pb y 188pb respectivamente. La secuencia de los primers empleados, así como las regiones y los tamaños amplificados para cada virus se muestran en la tabla 10.

Previo a la etapa de tamizaje, se llevó a cabo una etapa de validación de protocolos seleccionados para la identificación de cada virus mediante la determinación de los límites de detección de cada protocolo. Se realizaron rondas de amplificación por PCR convencional empleando como templado 5 diluciones seriales de plásmidos control para cada virus partiendo de 600,000 a 60 copias virales. Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa/BrEt al 3%.

3.9. SECUENCIACIÓN Y GENOTIPIFICACIÓN VIRAL.

Los productos obtenidos de las muestras positivas fueron purificados a partir de geles de agarosa mediante el estuche comercial Wizard SV and PCR Clean-Up System (Promega, Madison WI, United States) y su secuencia fue obtenida por secuenciación directa utilizando el BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) en un secuenciador 3100-Avant

Nombre	Gen/Región	Secuencia	Tamaño del producto
GAPDH	GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3' 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3'	225 pb
GAG O	GAG	5'-CGCGTCTGATTTGTTTTGTT-3' 5'-AGAGGGTAAGGGCAGGGTAA-3'	413 pb
GAG I		5'-TCTCGAGATCATGGGACAGA-3' 5'-CCGCCTCTTCTTCATTGTTC-3'	290 pb
HCMV1	UL3	5'-CAAGCGGCCTCTGATAACCAAGC-3' 5'-CTCTCCTCTGGGGCAACTTCCTC-3'	420pb
HCMV 2		5'-CCGATCCTCTGAGAGTCTGCTCTC-3' 5'-CAGCCACAATTACTGAGGACAGA-3'	188pb
MY09	L1	5'-CGTCCMARRGGAWACTGATC-3'	450pb
MY11		5'-GCM AGGGWCATAAYAATGG-3'	
GP5+		5'-TTTGTTACTCTGGTAGATACTAC-3'	
GP6+		5'-GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC-3'	
PM1F	Antígeno T	5'-TCYTCTGGNNTAAARTCATGCT-3'	550pb
PM1R		5'-AAWTAGRTKCCAACCTATGGAA-3'	
PM2R		5'-GGTAGAATACCAAATGACTTTCC-3'	
BKF		5'-GAATGCTTTCTTCTATAGTATGG-3'	
JCF		5'-ATATTATGACCMCCAAAACCATG-3'	
SVF		5'-ATAATTTTTTTGTATAGTAGTGCA-3'	

Tabla 10. Primers empleados en la etapa de tamizaje viral. Las secuencias de los primers empleados en la etapa de identificación viral, así como la región que amplifican y el tamaño de los productos de PCR se muestran en cada columna.

Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las secuencias de referencia reportadas para cada virus.

Los tipos de HPV de las muestras positivas fueron discriminados mediante Linear Array HPV Genotyping Test (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), de acuerdo a las instrucciones del proveedor y los resultados fueron validados por secuenciación para 2 muestras.

3.10. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Los grupos de casos y controles fueron comparados empleando métodos univariados. La comparación de edades entre los grupos de estudio fue realizada mediante prueba de t y la estadística U de Mann-Whitney fue empleada para la comparación de medianas. La distribución de genotipos fue comparada para verificar el equilibrio de Hardy-Weinberg por prueba exacta mediante el software De Finetti (<http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/hw/hwa1.pl>). La relación entre Genotipo-CP, Genotipo-Infección e Infección-CP fue evaluada mediante prueba de Chi cuadrada. Se realizó un modelo de regresión logística multivariada considerando CP como variable dependiente realizando un ajuste por edad durante el análisis. Valores de $P < 0.05$ fueron considerados significativos.

CAPÍTULO IV. RESULTADOS.

4.1. Características generales de la población estudiada.

Un total de **130** hombres mexicanos fueron incluidos en el estudio (tabla 11); 55 de ellos conformaron el grupo de casos y 75 fueron admitidos dentro del grupo control. El 92.30% de los sujetos fueron del Noreste de México (estados de Zacatecas, San Luis Potosí, Tamaulipas, Coahuila y Nuevo León).

Lugar de Origen	Casos	Controles	TOTAL
Noreste de México	50	70	120
Otras Regiones del País.	5	5	10
TOTAL	55	75	130

Tabla 11. Lugar de nacimiento de la población de estudio. La región Noreste de México, comprende los estados de Nuevo León, Coahuila, Tamaulipas, San Luis Potosí y Zacatecas. Dentro de la categoría de otras regiones del país, se incluyen a los estados de Guerrero, Distrito Federal, Michoacán, Sonora y Veracruz

La distribución por edad de los grupos de estudio mostró que el 47.27% de los hombres con CP y el 24.0% de los controles fueron mayores de 70 años. La edad promedio al diagnóstico para el grupo de casos fue de 70.83 (rango: 36-88) y 66.04 (rango 50-88) para el grupo control (figura 13).

La mediana de los valores de APE en los grupos de estudio fue de 18.3 ng/ml para casos (rango 0.16-1062ng/ml) y 6.7 ng/ml para el grupo de controles (rango 0.2-25.99 ng/ml). La mayoría de los hombres con CP tuvieron valores de APE >10.0 ng/ml (tabla 12)

El diagnóstico patológico más frecuente fue prostatitis crónica (86.66%); los eventos de prostatitis fueron encontrados en asociación con tejido prostático benigno (13.33%), tejido hiperplásico

(28.0%) y tejido atrófico (14.66%) respectivamente; sólo 10 individuos tuvieron diagnóstico patológico de tejido prostático benigno (figura 14). La distribución del grado Gleason en los 55 casos de CP mostró valores de Gleason superiores a 7 en 35 (63.63%) de los sujetos; como se muestra en la figura 15, todos los casos tuvieron valores de Gleason superiores o iguales a 6, cinco casos tuvieron valores normales de APE y tres de ellos tuvieron valores de Gleason ≥ 9 .

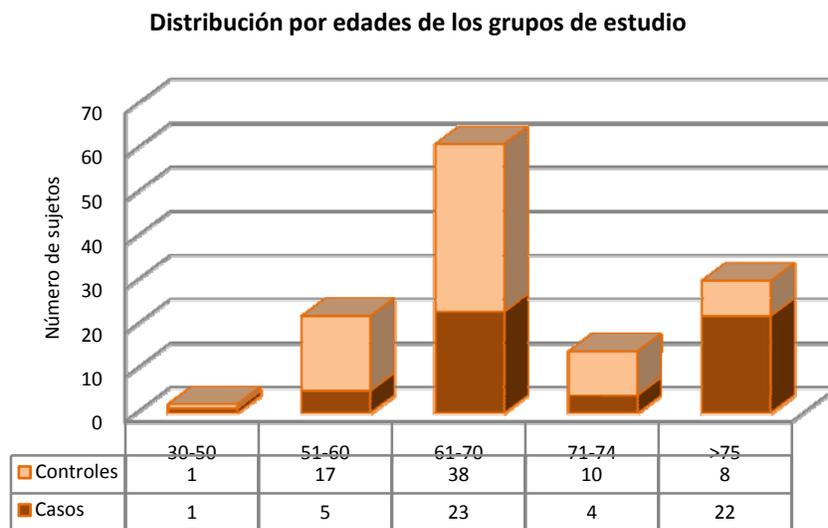


Figura 13. Distribución por edades de los grupos de estudio. Los 130 sujetos incluidos en el estudio pudieron ser clasificados por rangos de edad. En la gráfica de distribución fue excluido un paciente del grupo control que no contaba con registro de edad.

Valor de APE (ng/ml)	Casos	Controles	Total
0.1 - 4.0	5	22	27
4.1 - 8.0	4	23	27
8.1 - 10.0	9	8	17
>10.0	34	25	59
Total	52	78	130

Tabla 12. Valores de APE de los grupos de estudio. El 96.15% de los sujetos con CP versus el 68.0% de los sujetos control mostraron valores de APE anormales ($>4\text{ng/ml}$). En un sujeto control el APE no pudo ser determinado.

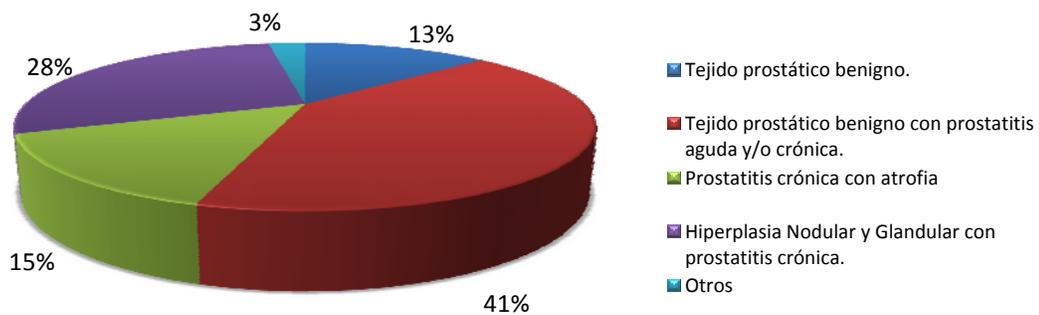


Figura 14. Diagnóstico histopatológico del grupo control (n=75). El evento más frecuente fue la prostatitis aguda o crónica acompañada con tejido prostático benigno, atrofia y/o hiperplasia nodular y glandular.

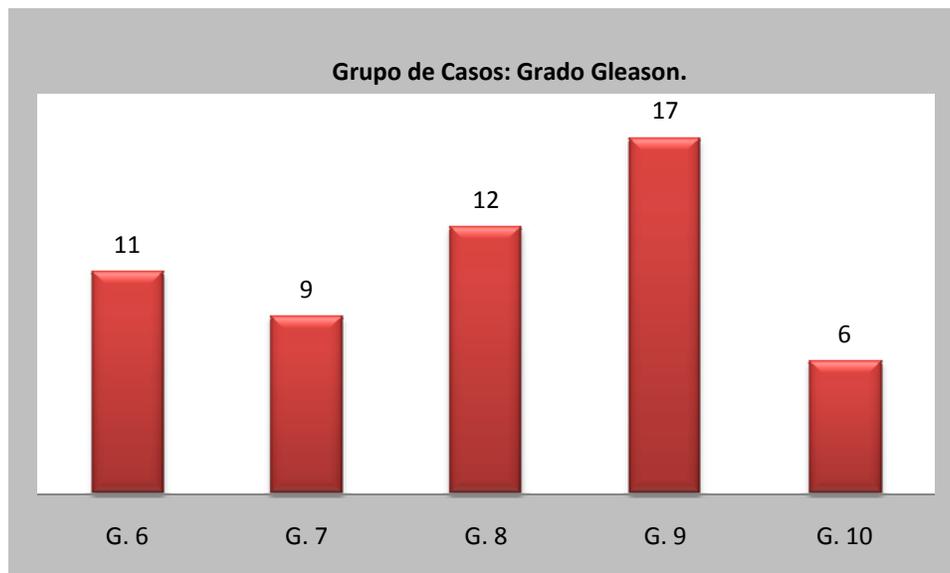


Figura 15. Grado Gleason. La figura muestra los 55 casos incluidos en el estudio, clasificados de acuerdo a su grado Gleason.

4.2. Genotipificación de la variante R462Q de RNASEL.

Todas las muestras de DNA/RNA que fueron obtenidas tuvieron la capacidad de amplificar el fragmento esperado para el gen GAPDH (figura 16) y fueron utilizadas en las subsecuentes determinaciones.

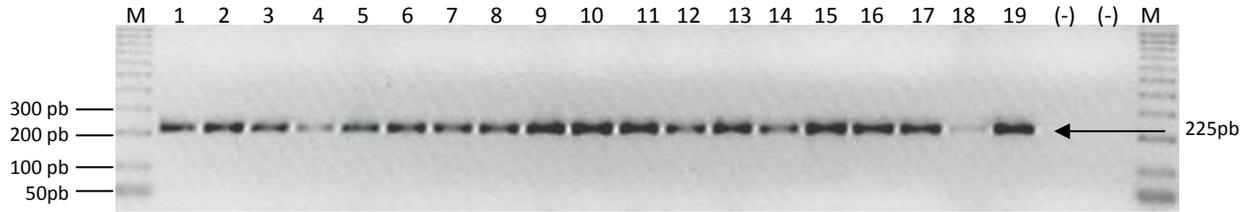


Figura 16. Amplificación de GAPDH. La imagen muestra la amplificación de una banda de 225pb correspondiente a un fragmento del gen GAPDH de 19 de las muestras empleadas durante la etapa de genotipificación. En el primero y último carril se muestra el marcador de peso molecular (M). Los controles negativos de reacción están indicados entre paréntesis.

Las figuras 17A y 17B resumen los resultados de la genotipificación de la muestra analizada. Las frecuencias de los genotipos G/G, G/A, and A/A fueron 0.618, 0.382, 0.0 para casos y 0.693, 0.240 y 0.067 para controles respectivamente.

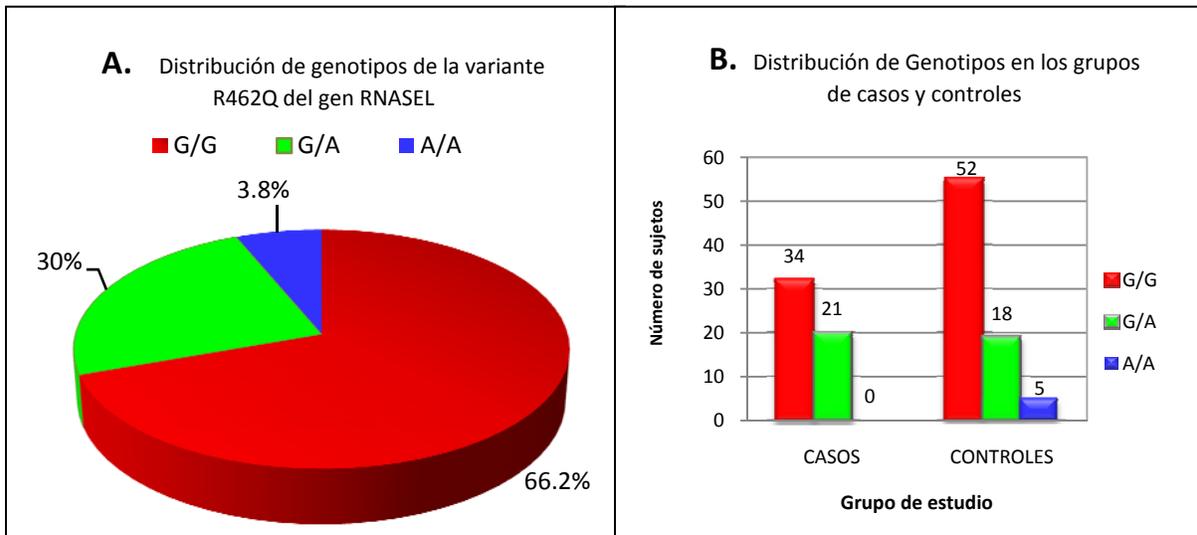


Figura 17. Distribución de genotipos de la población estudio. En la figura se muestran las frecuencias genotípicas (A) de la población estudiada y (B) distribuidas de acuerdo a los grupos de casos y controles.

Las frecuencias genotípicas del grupo control no presentaron desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg (figura 18) mediante prueba exacta ($P=0.1154$) y debido a que las proporciones de los alelos A o G no varían entre el grupo de casos y controles, el alelo 462Q de RNasa L y CP no están estadísticamente relacionados en esta población ($P=0.0756$).

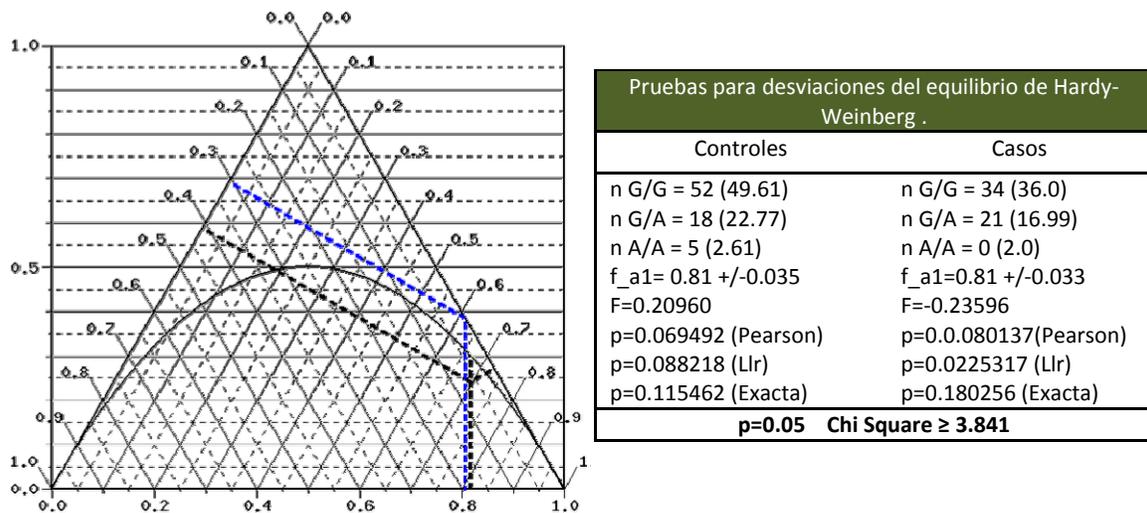


Figura 18. Diagrama De Finetti con parábola de Hardy Weinberg. La longitud de la línea vertical representa la frecuencia del genotipo G/A. La longitud de las líneas perpendiculares izquierda y derecha representan las frecuencias de los genotipos G/G y A/A respectivamente. En el eje de las abscisas se muestra la frecuencia del alelo G y la intersección de la parábola de H.W. y la línea vertical representan la frecuencia del genotipo G/A en caso de equilibrio de H.W. En línea punteada negra se muestra el grupo control.

4.3. Detección de secuencias virales.

Los ensayos de PCR anidada empleados para cada virus fueron estandarizados empleando controles positivos. Los límites de detección de los protocolos de PCR fueron establecidos en 30 copias para Poliomavirus (Py) y 60 copias para HPVs, XMRV y CMV (figuras 19 y 20).

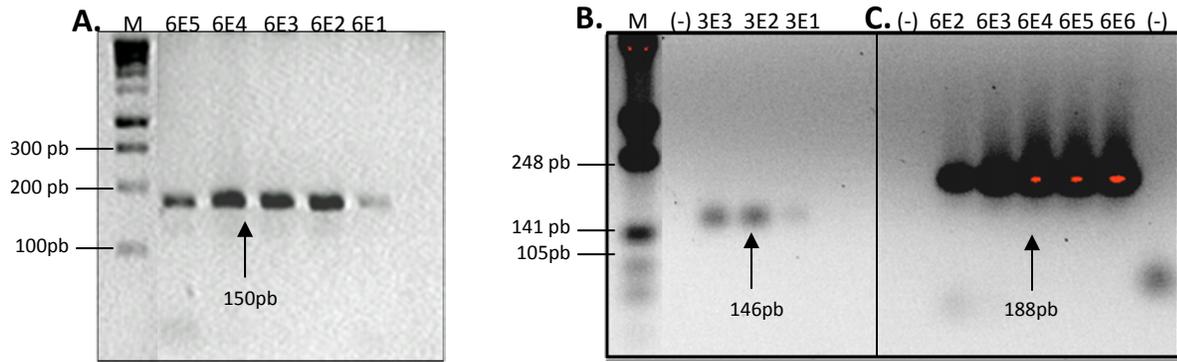


Figura 19. Límites de detección de los métodos de tamizaje viral. A. HPVs (150 pb), B. Poliomavirus (146 pb) y C. HCMV (188 pb). En la primera posición se indica el marcador de peso molecular (M) y posteriormente las diluciones seriadas de cada plásmido. La letra E equivale a exponente.

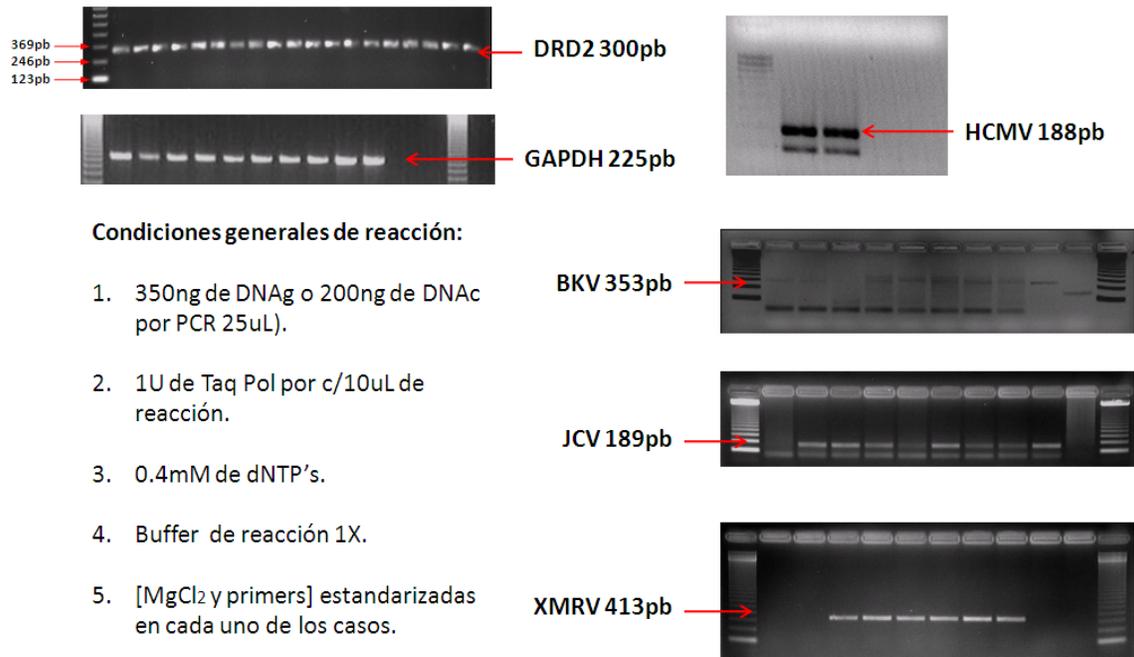


Figura 20. Condiciones generales de reacción y geles representativos del tamizaje viral. En la figura se muestran las imágenes de amplificación de genes endógenos, así como de muestras positivas para cada uno de los virus incluidos en el tamizaje. Las condiciones generales de reacción se muestran en la parte izquierda de la figura.

La presencia de los Py BK, JC y SV40 no fue detectada en ninguno de los 130 tejidos prostáticos examinados. Infecciones con XMRV y HCMV (figura 21) fueron detectadas en uno (1.33%) y seis (8.0%) muestras control respectivamente y en ninguna de las muestras de tejido prostático tumoral.

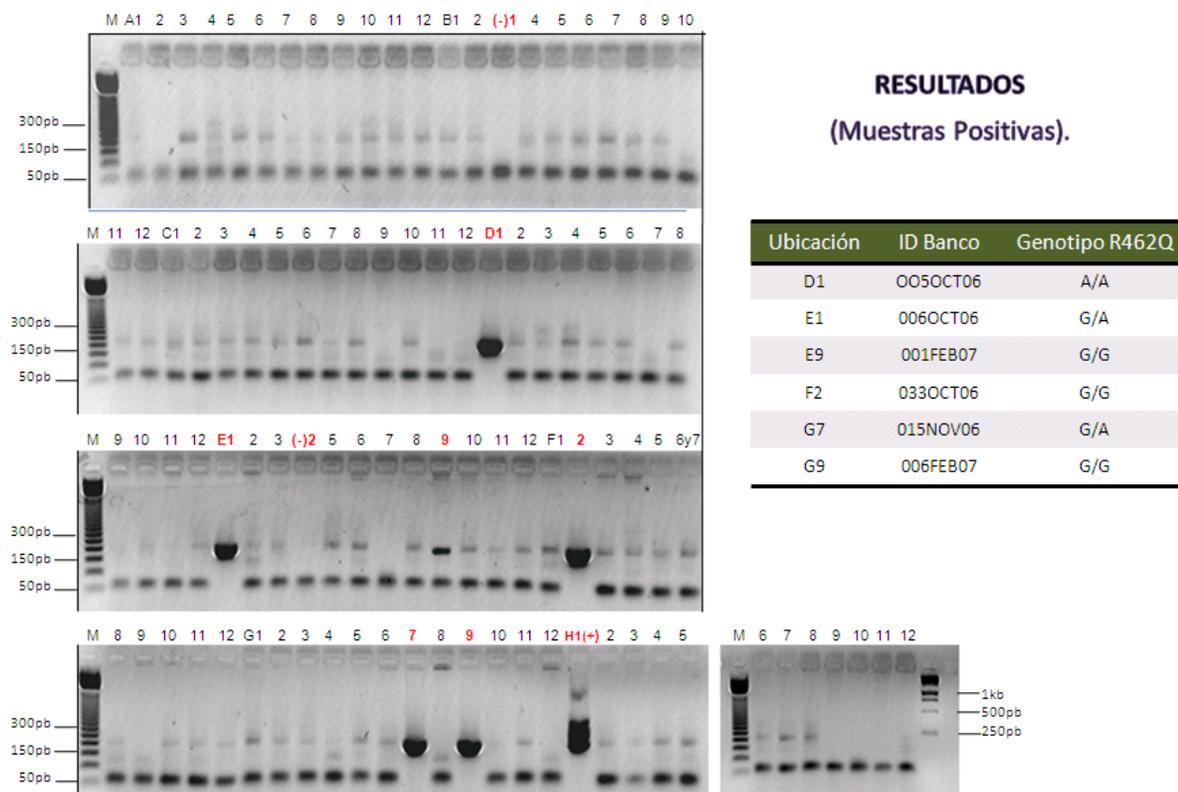


Figura 21. PCR anidada para tamizaje de HCMV en muestras de tejido prostático. 350ng de DNA genómico proveniente de tejido prostático fueron amplificados mediante PCR anidada. Los productos obtenidos fueron visualizados en geles de agarosa/BrEt al 3.0%. La presencia de una banda de 138pb correspondiente a una porción de U3 de HCMV fue observada en 6 de 130 muestras tamizadas (6 controles).

La presencia de secuencias de HPV fue detectada en 15 sujetos (11.53%); 11 (20.0%) de ellos fueron casos y 4 (5.3%) fueron controles (figura 22 y tabla 13).

La distribución por genotipos de las muestras positivas para XMRV, HCMV y HPV se muestra en la tabla 10. Nueve sujetos HPV positivos mostraron el genotipo silvestre (R/R) y dos de ellos fueron heterocigotos (R/Q) para la variante R462Q de RNasa L.

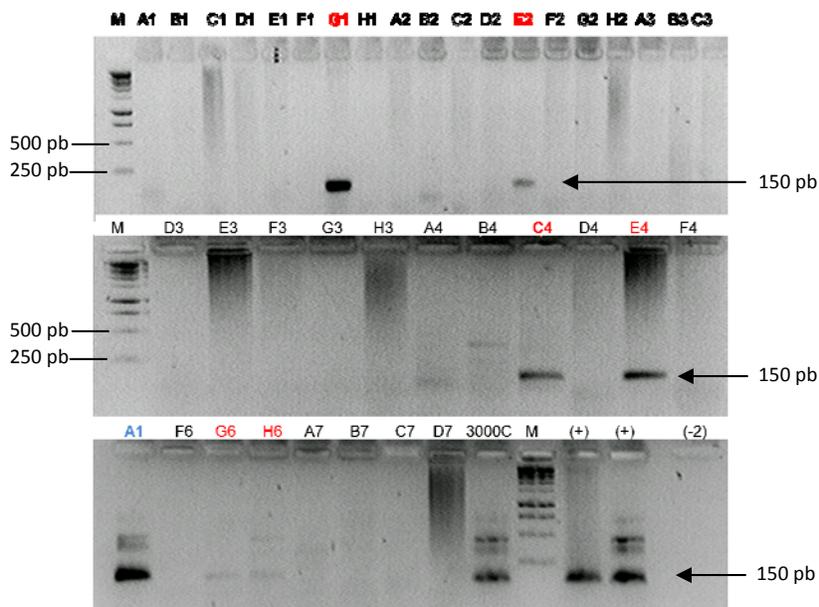


Figura 22. PCR anidada para tamizaje de HPV's en muestras de tejido prostático. 500ng de DNA genómico proveniente de tejido prostático fueron amplificados mediante PCR anidada. Los productos obtenidos en la segunda ronda de amplificación (primers GP5/6) fueron visualizados en geles de agarosa/BrEt al 3.0%. La presencia de una banda de 150pb correspondiente a una porción de L1 de HPV's fue observada en 15 de 130 muestras tamizadas (11 casos y 4 controles).

Virus (+)/ Genotipo	Casos			Total	Controles			Total
	R/R	R/Q	Q/Q		R/R	R/Q	Q/Q	
Py (BK, JC, SV40)	0	0	0	0	0	0	0	0
HPV	9	2	0	11	4	0	0	4
HCMV	0	0	0	0	3	2	1	6
XMRV	0	0	0	0	1	0	0	1
Total	9	2	0	11	8	2	1	11

Tabla 13. Distribución de genotipos de las muestras positivas para los diferentes virus. Un total de 22 muestras resultaron positivas para la infección con alguno de los virus tamizados. 11 de los cuales fueron casos y 11 controles. Solo un sujeto control con genotipo Q/Q para el alelo R462Q de RNASEL fue identificado como positivo (HCMV).

4.4. Relación R462Q de RNASEL, infección y CP.

No hubo asociación entre el genotipo R462Q e infección ($P=0.414$), Infección y CP ($P= 0.572$), o Infección-valor de APE ($P=0.862$). Sin embargo la infección por HPV significativamente incrementa ($P = 0.021$) el riesgo de CP 4.438 veces entre la población estudiada (95% IC: 1.330-14.801). El análisis de regresión logística multivariada mostró que la infección por HPV fue la única variable independiente que es útil para predecir CP ($P=0.013$). En las tablas 14 y 15 se resumen las pruebas estadísticas de asociación y los valores de los estadísticos obtenidos durante el análisis.

Prueba para asociación (C.I.: 95% Intervalo de Confianza)				
Diferencia de frecuencias alélicas	Heterocigoto	Homocigoto	Positividad Alélica	Armitage's trend
Alelo A Riesgo.				
[A]<->[G]	[AA]<->[AG]	[AA+]<->[GG]	[AA]<->[AG+GG]	OR común
OR=1.028 C.I.=[0.548-1.927] chi2=0.01 p=0.93113 (P)	OR=1.784 C.I.=[0.831-3.829] chi2=2.23 p=0.13533	OR=0.138 C.I.=[0.007-2.582] chi2=3.16 p=0.07566	OR=1.396 C.I.=[0.671-2.905] chi2=0.80 p=0.37098	OR=1.200 chi2=0.01 p=0.93179

Tabla 14. Comparación entre Genotipo vs CP.

Comparación.	Grados de libertad de X^2	Valor del Estadístico.	Valor de P.
Carga alélica vs Infección.	1	0.575	0.448
Infección vs CP.	1	0.319	0.572
Infección HPV vs CP.	1	5.327	0.021

$\alpha=0.05$

Tabla 15. Comparación entre genotipo vs Infección e Infección vs CP.

CAPÍTULO V. DISCUSIÓN.

Además de que factores genéticos, tales como R462Q de RNasa L, pueden jugar un papel en la etiología del CP; existe evidencia de que las enfermedades infecciosas también pueden ser importantes debido a que virus como HCMV, los poliomavirus JC y BK, HPVs de alto riesgo y más recientemente XMRV, están asociados con infecciones de la próstata [69, 86]. Sin embargo, tanto los estudios de la variante R462Q en CP como los diversos estudios de las infecciones virales realizados alrededor del mundo han dado resultados contradictorios. En este trabajo se analizó la asociación entre infecciones virales y la variante de predisposición a cáncer R462Q en relación a CP. En la tabla 16 se muestra se muestra una comparación entre las frecuencias reportadas para el genotipo R462Q de RNASEL y las encontradas en este estudio.

Población.	n	Frecuencia genotípica de RNASEL R462Q			Referencia.
		G/G	G/A	A/A	
Cleveland.					
Blancos	210	0.409	0.461	0.128	Larson BT. The Journal of Urology 2008.
Negros	12	1.0	0.0	0.0	
Otros	10	0.6	0.4	0.0	
HapMap.					
CEU	60	0.317	0.55	0.133	HapMap Project http://www.hapmap.org
JPT	45	0.467	0.467	0.067	
CHB	44	0.545	0.386	0.068	
YRI.	60	0.883	0.117	0.0	
Norte de Europa					
CP	87	0.586	0.333	0.080	Fischer N. J Clin Virol 2008.
Control.	70	0.60	0.343	0.057	
Noreste de Mex.					
CP	55	0.618	0.382	0.0	Martinez-Fierro. Datos no publicados. 2009.
Controles	75	0.693	0.24	0.067	

Tabla 16. Comparación entre las frecuencias genotípicas reportadas para el polimorfismo R462Q de RNASEL y las obtenidas en este estudio (parte inferior de la tabla).

Nuestros resultados mostraron una baja frecuencia (6.7%) de homocigotos A/A en la población mexicana estudiada comparada con la reportada por Larson *et al* (2008) para hombres blancos en Cleveland (12.8%) o por el HapMap para población europea (13.3%). Sin embargo dichas frecuencias son similares a las reportadas por el HapMap para la población asiática de Japón y China (6.7% y 6.8% respectivamente) y por la reportada para el norte de Europa por Fischer *et al* (2008). Esas diferencias pueden ser explicadas por las diferencias étnicas entre poblaciones debido al proceso de mezcla genética característico de cada región geográfica. No se encontró asociación entre el alelo 462Q y CP ($P=0.448$).

La detección de genomas virales en tejido prostático fue restringida a los virus HCMV (4.61%), XMRV (0.076%) y HPVs (11.53%). La relación entre infección y genotipo Q/Q de RNasa L ha sido establecido solamente para XMRV. En este sentido, nuestros resultados difieren de los reportados por Urisman *et al* (2006), quien describe en sujetos con CP familiar 8/20 muestras positivas para XMRV [83]. La prevalencia de XMRV en casos de CP esporádico ha sido notoriamente inferior a la reportada por Urisman. Fischer *et al* (2008) identificó solo dos muestras positivas de 157 tejidos prostáticos tamizados, ninguno de los 11 tejidos homocigotos Q/Q incluidos en el estudio, fue positivo para XMRV [82]. D'arcy *et al* (2008) en un estudio realizado en Irlanda, no encontró evidencia de infección por XMRV en pacientes Q/Q con diagnóstico de CP [81]. En nuestro estudio, la única muestra positiva correspondía a un sujeto control con genotipo R/R, 64 años de edad, valor de APE de 0.64 ng/ml y diagnóstico patológico de tejido prostático benigno. Las diferencias entre las prevalencias reportadas sugieren que la alta susceptibilidad observada por el estudio de Urisman, podría estar influida por factores hereditarios propios de CP familiar pero ausentes en los casos de CP esporádico.

Se ha reportado la presencia de HCMV, Py y HPVs en tejido prostático. En la tabla 17, se muestra una comparación entre esos estudios y el nuestro; en este estudio la presencia de Py no fue identificada en ninguno de los 130 tejidos evaluados, sin embargo seis muestras del grupo control fueron positivas para HCMV. La ausencia de HCMV, Py y XMRV en tejido prostático tumoral sugiere que ellos no están asociados con CP en población mexicana, aunque es importante mencionar que todos los diagnósticos patológicos de las muestras control que fueron positivas (con excepción del paciente positivo para XMRV) estaban acompañados de prostatitis crónica y que eso podría resultar en un posterior desarrollo de malignidad. No se encontraron diferencias entre infección y valores de APE (P=0.862).

Población	Virus Tamizado	Muestras (+)	Total	Observaciones	Ref.
Suecia. 402 casos de hiperplasia de los cuales 201 casos progresaron a CP.	Epstein Bar JCV BKV, HPVs, CMV Adenovirus, HSV 1 y 2 <i>C. albicans.</i>	31 1 0 0 2	34 (352)	No hubo diferencia en la ocurrencia de inflamación severa en las muestras E.B. y JCV (+) vs muestras negativas. EB, JCV y CA no contribuyen al desarrollo de CP.	Bergh J. British journal of cancer 2007.
Baltimore, EUA. 30 pacientes para Bacterias. 200 pacientes para virus (338 muestras)	BKV <i>Chlamydia T</i> CMV E.B. HPVs, XMRV.	1 1 1 16 0	18 (200)	El 87% de las prostatectomía tenían DNA bacteriano de una o más especies, sin embargo las mayoría de las biopsias fueron negativas: heterogeneidad. No asociación.	Sfanos KS. The Prostate 2008.
Grecia. 42 muestras de malignidades prostáticas.	BKV JCV HPVs	8 0 2	10 (42)	BKV podría estar implicado en la progresión de CP, a diferencia de los HPVs.	Balis V. Int J Biol Markers. 2007.
LongBeach CA, EUA. 12 tejidos frescos y 20 especímenes en parafina.	HPV's JCV BKV	0 (20), 6* (12) 10 (20), 6 (12) 0 (20), 3 (12)	10 (20) y 7(12)	HPVs y JCV son virus comunes en la próstata .	Zambrano A, Prostate 2002.
Monterrey N.L. México. 55 Casos de CP y 75 Controles.	JCV, BKV, SV40. HPVs CMV. XMRV.	0 15 6 1	22 (130)	La frecuencia de HPVs fue significativamente mayor en los casos comparado con los controles, lo que sugiere su participación en el desarrollo o progresión del CP.	Martinez-Fierro. Datos no publicados. 2009.

* HPVs 16, 18, 33, 58

Tabla 17. Comparación entre los diferentes estudios de tamizaje viral reportados en la literatura y los obtenidos en este trabajo.

En este estudio el tamizaje de HPVs mostró que la infección por estos virus incrementa el riesgo de CP en 4.438 veces entre la población estudiada ($P=0.021$), el DNA de HPV fue encontrado en 11/55 casos (20.0%) y 4/75 (5.3%) controles. Nuestros resultados son consistentes con los datos reportados por Leiros *et al* (2005) donde muestra una asociación significativa entre presencia de HPV y carcinomas de próstata en Argentina, con una alta prevalencia de 41.5% vs 0.0% de muestras hiperplásicas [87]. Zambrano *et al* (2002) detectó una alta prevalencia de HPV en tejido prostático en 6 de 12 (50%) pacientes con CP [69]. De manera inversa, nuestros resultados son diferentes de dos estudios independientes reportados por Bergh *et al* (2007) y Sfanos *et al* (2008) en Suecia y Estados Unidos respectivamente, donde no se encontró evidencia de presencia de infección por HPVs en ninguno de los 352 y 200 tejidos prostáticos tamizados (tabla 14) [88, 89]. Esta variación puede ser explicada en parte por los métodos moleculares empleados en la detección del virus o por las diferencias en el comportamiento sexual de las poblaciones estudiadas, por ejemplo, empleando células exfoliadas del pene, uretra distal y superficie externa del glande y especímenes del surco coronal, varios estudios en hombres sanos en diferentes países han reportado que las prevalencias de HPV muestran grandes variaciones entre sus poblaciones en un rango del 3.0 al 45% [90-92]. En México no existen datos de prevalencia de infección por HPV en tejido prostático, pero nuestros resultados van de acuerdo con la historia de la alta prevalencia (43-46%) de HPV en células exfoliadas del surco de la uretra coronal de sujetos sexualmente activos y militares sanos reportada por Lazcano-Ponce *et al* (2001) y Lajous *et al* (2005) respectivamente [91, 92].

Es importante mencionar que la mayoría de las muestras empleadas en las determinaciones fueron obtenidas vía biopsia transrectal. Algunos autores han sugerido la posibilidad de contaminación de la muestra durante el procedimiento de obtención con virus provenientes de otros tejidos, esto se fundamenta ya que tanto secuencias de HPVs y Py han sido detectadas en

tejidos de la uretra o en tejido anal. Sin embargo, la diferencia en la prevalencia entre los grupos de casos y controles de los virus tamizados, minimiza la posibilidad de contaminación.

Es bien conocido que la primera línea de defensa contra las infecciones virales es la respuesta con IFN, debido a que E6 y E7 pueden inhibir la capacidad de señalización del IFN [84], en este trabajo se probó la hipótesis de que el genotipo Q/Q podría potenciar aún más esta susceptibilidad. En este sentido nuestros resultados mostraron no asociación entre la Infección y genotipo R462Q de RNASEL (P=0.414) o entre infección con HPV y la agresividad del tumor representada por su grado Gleason (P = 0.667).

Finalmente, algunas observaciones de este estudio deberán ser consideradas: el relativamente pequeño número de muestras, podría ocasionar algunos sesgos en el análisis estadístico realizado. Se incluyeron sujetos con valores de APE $\geq 10\text{ng/ml}$ a pesar de la alta posibilidad de detectar CP en estos sujetos [85], sin embargo la mayoría de estos sujetos ya tenían un diagnóstico patológico previo negativo para CP además del considerado para ser incluidos en este estudio y además cursaban con diagnóstico adicional de prostatitis crónica y/o otras patologías que tienen la característica de elevar los niveles de APE, es por ello que no fueron excluidos del tamizaje.

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES.

La frecuencia de la mutación R462Q del gen RNASEL encontrada en este estudio (6.7%) fue más baja que la reportada para otras poblaciones (6.7-13%). En este estudio no se observó asociación entre el genotipo R462Q de RNASEL y CP.

La detección de genomas virales en tejido prostático de la población estudiada fue restringido a los virus HCMV (4.6%), XMRV (0.77%) y HPV (11.53%). Sin embargo la ausencia de infección en tejido prostático tumoral por los virus, XMRV, CMV y Pys sugiere que no están asociados a CP en esta población y que por lo tanto, existen factores adicionales que están involucrados en la etiopatogénesis de la enfermedad.

No se encontró asociación simple ni combinada entre infección por los virus estudiados en conjunto, con genotipo R462Q-CP. La aportación más importante del estudio es el hallazgo de que la presencia de infección por HPV en tejido prostático, incrementa 4.438 veces el riesgo de contraer CP (IC: 1.330-14.801) en la población estudiada y que este riesgo no está asociado a la agresividad de la enfermedad (P=0.667).

Este es el primer trabajo en México que reporta frecuencias genotípicas de la mutación R462Q del gen RNASEL, prevalencias de infección en tejido prostático de los virus estudiados y que establece una asociación positiva entre infección por HPV y CP.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INEGI: **Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Datos nacionales.** . México, DF 2007.
2. **Estadísticas demográficas 2007**
[http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/vitales/demograficas/2007/Cua_pob_2007.pdf]
3. Rennert H, Zeigler-Johnson CM, Addya K, Finley MJ, Walker AH, Spangler E, Leonard DG, Wein A, Malkowicz SB, Rebbeck TR: **Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005, **14**(4):949-957.
4. Simard J: **Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed.** *Endocrine-related cancer* 2003, **10**(2):225-259.
5. Dennis LK: **Prostate cancer and consistency of reporting sexual histories in men over age 50.** *Prostate cancer and prostatic diseases* 2005, **8**(3):243-247.
6. Fernandez L, Galan Y, Jimenez R, Gutierrez A, Guerra M, Pereda C, Alonso C, Riboli E, Agudo A, Gonzalez C: **Sexual behaviour, history of sexually transmitted diseases, and the risk of prostate cancer: a case-control study in Cuba.** *Int J Epidemiol* 2005, **34**(1):193-197.
7. Hayes RB, Pottern LM, Strickler H, Rabkin C, Pope V, Swanson GM, Greenberg RS, Schoenberg JB, Liff J, Schwartz AG *et al*: **Sexual behaviour, STDs and risks for prostate cancer.** *Br J Cancer* 2000, **82**(3):718-725.
8. Society AC: **Cancer facts and figures 2008.** In. Atlanta Georgia: American Cancer Society; 2008: 70.
9. **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005, National Cancer Institute.**
[http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/,]
10. **Secretaría de Salud. Programa de acción: Cáncer de Próstata.**
[<http://bibliotecas.salud.gob.mx/gsd/collect/publin1/index/assoc/HASH18a3.dir/doc.pdf>]
11. **Dirección General de Epidemiología, Secretaria de Salud. Compendio de Cáncer / RHNM / 2001 / Morbilidad/ Mortalidad.** 2001.
12. Vinay Kumar AA, Nelson Fausto.: **Patología estructural y funcional**, 7ma. edn. Madrid, España: Elsevier; 2005.
13. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Gronberg H, Drake CG, Nakai Y, Isaacs WB, Nelson WG: **Inflammation in prostate carcinogenesis.** *Nat Rev Cancer* 2007, **7**(4):256-269.
14. 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 DePino RAW, 7th edn: Wolters Kluwer Lippincott Williams and Wilkins.
15. Bai Y: **Risk of prostate cancer and family history of cancer: a population-based study in China.** *Prostate cancer and prostatic diseases* 2005, **8**(1):60-65.
16. Johansson JE, Andren O, Andersson SO, Dickman PW, Holmberg L, Magnuson A, Adami HO: **Natural history of early, localized prostate cancer.** *JAMA* 2004, **291**(22):2713-2719.
17. Meng FJ, Shan A, Jin L, Young CY: **The expression of a variant prostate-specific antigen in human prostate.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002, **11**(3):305-309.
18. Hessels D, Verhaegh GW, Schalken JA, Witjes JA: **Applicability of biomarkers in the early diagnosis of prostate cancer.** *Expert Rev Mol Diagn* 2004, **4**(4):513-526.
19. Carroll Peter R. CMA, Zietman Anthony L., Rothaermel Jason M. : **Report to the Nation on Prostate Cancer A Guide for Men and Their Families.** In. Edited by Foundation PC: Prostate Cancer Foundation; 2005.

20. Armah HB, Parwani AV: **Atypical adenomatous hyperplasia (adenosis) of the prostate: a case report with review of the literature.** *Diagn Pathol* 2008, **3**:34.
21. Montironi R: **Mechanisms of disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate.** *Nature clinical practice Urology* 2007, **4**(6):321-332.
22. Tomlins SA: **Integrative biology of prostate cancer progression.** *Annual review of pathology* 2006, **1**:243-271.
23. Zynger DL, Yang X: **High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia of the Prostate: The Precursor Lesion of Prostate Cancer.** *Int J Clin Exp Pathol* 2009, **2**(4):327-338.
24. Lopez-Beltran A: **Atypical adenomatous hyperplasia (adenosis) of the prostate: DNA ploidy analysis and immunophenotype.** *International journal of surgical pathology* 2005, **13**(2):167-173.
25. De Marzo AM, Marchi VL, Epstein JI, Nelson WG: **Proliferative inflammatory atrophy of the prostate: implications for prostatic carcinogenesis.** *Am J Pathol* 1999, **155**(6):1985-1992.
26. Ruska KM, Sauvageot J, Epstein JI: **Histology and cellular kinetics of prostatic atrophy.** *Am J Surg Pathol* 1998, **22**(9):1073-1077.
27. De Marzo AM, Nakai Y, Nelson WG: **Inflammation, atrophy, and prostate carcinogenesis.** *Urol Oncol* 2007, **25**(5):398-400.
28. Putzi MJ, De Marzo AM: **Morphologic transitions between proliferative inflammatory atrophy and high-grade prostatic intraepithelial neoplasia.** *Urology* 2000, **56**(5):828-832.
29. Lightfoot N: **Medical history, sexual, and maturational factors and prostate cancer risk.** *Annals of epidemiology* 2004, **14**(9):655-662.
30. Sakr WA: **The frequency of carcinoma and intraepithelial neoplasia of the prostate in young male patients.** *The Journal of urology* 1993, **150**(2 Pt 1):379-385.
31. Sakr WA, Grignon DJ, Crissman JD, Heilbrun LK, Cassin BJ, Pontes JJ, Haas GP: **High grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN) and prostatic adenocarcinoma between the ages of 20-69: an autopsy study of 249 cases.** *In Vivo* 1994, **8**(3):439-443.
32. Yin M: **Prevalence of incidental prostate cancer in the general population: a study of healthy organ donors.** *The Journal of urology* 2008, **179**(3):892-895; discussion 895.
33. Mastalski K: **Substantial family history of prostate cancer in black men recruited for prostate cancer screening: results from the Prostate Cancer Risk Assessment Program.** *Cancer* 2008, **113**(9):2559-2564.
34. Kooiman GG: **The influence of dietary and environmental factors on prostate cancer risk.** *Prostate cancer and prostatic diseases* 2000, **3**(4):256-258.
35. Strom SS: **Prostate cancer in Mexican-Americans: identification of risk factors.** *The Prostate* 2008, **68**(5):563-570.
36. Muir CS: **The epidemiology of prostatic cancer. Geographical distribution and time-trends.** *Acta oncologica (Stockholm, Sweden)* 1991, **30**(2):133-140.
37. Nelson WG: **Prostate cancer.** *The New England journal of medicine* 2003, **349**(4):366-381.
38. Patel AR: **Risk factors for prostate cancer.** *Nature clinical practice Urology* 2009, **6**(2):87-95.
39. Montironi R, Scarpelli M, Lopez Beltran A: **Carcinoma of the prostate: inherited susceptibility, somatic gene defects and androgen receptors.** *Virchows Arch* 2004, **444**(6):503-508.
40. Meikle AW, Smith JA, West DW: **Familial factors affecting prostatic cancer risk and plasma sex-steroid levels.** *Prostate* 1985, **6**(2):121-128.

41. Woolf CM: **An investigation of the familial aspects of carcinoma of the prostate.** *Cancer* 1960, **13**:739-744.
42. **Prostate Cancer** [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/dispmim.cgi?id=176807>]
43. Dong JT: **Prevalent mutations in prostate cancer.** *J Cell Biochem* 2006, **97**(3):433-447.
44. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, Plummer S, Klein EA, Carpten JD, Trent JM, Isaacs WB, Casey G, Silverman RH: **Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates.** *Cancer Res* 2003, **63**(20):6795-6801.
45. Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T, Ewing C, Gillanders E *et al*: **Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1.** *Nat Genet* 2002, **30**(2):181-184.
46. Simard J, Dumont M, Labuda D, Sinnett D, Meloche C, El-Alfy M, Berger L, Lees E, Labrie F, Tavtigian SV: **Prostate cancer susceptibility genes: lessons learned and challenges posed.** *Endocr Relat Cancer* 2003, **10**(2):225-259.
47. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, Xiang Y, Krumroy LM, Klein EA, Catalona WJ, Nupponen N, Carpten JD, Trent JM *et al*: **RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases.** *Nat Genet* 2002, **32**(4):581-583.
48. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks AF, Cunningham JM, Peterson BJ, Jacobsen SJ, Cerhan JR *et al*: **Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic prostate cancer.** *Am J Hum Genet* 2002, **71**(1):116-123.
49. Maier C, Haeusler J, Herkommer K, Vesovic Z, Hoegel J, Vogel W, Paiss T: **Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene.** *Br J Cancer* 2005, **92**(6):1159-1164.
50. Noonan-Wheeler FC, Wu W, Roehl KA, Klim A, Haugen J, Suarez BK, Kibel AS: **Association of hereditary prostate cancer gene polymorphic variants with sporadic aggressive prostate carcinoma.** *Prostate* 2006, **66**(1):49-56.
51. Wiklund F, Jonsson BA, Brookes AJ, Stromqvist L, Adolfsson J, Emanuelsson M, Adami HO, Augustsson-Balter K, Gronberg H: **Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer.** *Clin Cancer Res* 2004, **10**(21):7150-7156.
52. Dennis LK, Dawson DV: **Meta-analysis of measures of sexual activity and prostate cancer.** *Epidemiology* 2002, **13**(1):72-79.
53. Taylor ML, Mainous AG, 3rd, Wells BJ: **Prostate cancer and sexually transmitted diseases: a meta-analysis.** *Fam Med* 2005, **37**(7):506-512.
54. Sreekumar A, Laxman B, Rhodes DR, Bhagavathula S, Harwood J, Giacherio D, Ghosh D, Sanda MG, Rubin MA, Chinnaiyan AM: **Humoral immune response to alpha-methylacyl-CoA racemase and prostate cancer.** *J Natl Cancer Inst* 2004, **96**(11):834-843.
55. Suzuki K, Nakazato H, Matsui H, Hasumi M, Shibata Y, Ito K, Fukabori Y, Kurokawa K, Yamanaka H: **NK cell-mediated anti-tumor immune response to human prostate cancer cell, PC-3: immunogene therapy using a highly secretable form of interleukin-15 gene transfer.** *J Leukoc Biol* 2001, **69**(4):531-537.
56. Baek SJ, Horowitz, J.M., Eling, T.E.: **Molecular cloning and characterization of human nonsteroidal anti-inflammatory drug-activated gene promoter. Basal transcription is mediated by Sp1 and Sp3.** *J Biol Chem* 2001, **276**(36):33384-92.
57. Koromilas AE, Li S, Matlashewski G: **Control of interferon signaling in human papillomavirus infection.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2001, **12**(2-3):157-170.
58. Wu W, Rochford R, Toomey L, Harrington W, Jr., Feuer G: **Inhibition of HHV-8/KSHV infected primary effusion lymphomas in NOD/SCID mice by azidothymidine and interferon-alpha.** *Leuk Res* 2005, **29**(5):545-555.

59. Ning S, Huye LE, Pagano JS: **Interferon regulatory factor 5 represses expression of the Epstein-Barr virus oncoprotein LMP1: braking of the IRF7/LMP1 regulatory circuit.** *J Virol* 2005, **79**(18):11671-11676.
60. Harms JS, Splitter GA: **Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter.** *Hum Gene Ther* 1995, **6**(10):1291-1297.
61. zur Hausen H: **Viruses in human cancers.** *Science* 1991, **254**(5035):1167-1173.
62. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D *et al*: **Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant.** *PLoS Pathog* 2006, **2**(3):e25.
63. Sudbo J: **Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck.** *N Engl J Med* 2001, **345**(5):376-377.
64. zur Hausen H: **Human papillomaviruses in the pathogenesis of anogenital cancer.** *Virology* 1991, **184**(1):9-13.
65. Adami HO, Kuper H, Andersson SO, Bergstrom R, Dillner J: **Prostate cancer risk and serologic evidence of human papilloma virus infection: a population-based case-control study.** *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003, **12**(9):872-875.
66. Kuczyk M, Serth J, Machtens S, Jonas U: **Detection of viral HPV 16 DNA in prostate cancer and benign prostatic hyperplasia by quantitative PCR-directed analysis.** *Prostate Cancer Prostatic Dis* 2000, **3**(S1):S23.
67. McNicol PJ, Dodd JG: **Detection of human papillomavirus DNA in prostate gland tissue by using the polymerase chain reaction amplification assay.** *J Clin Microbiol* 1990, **28**(3):409-412.
68. Noda T, Sasagawa T, Dong Y, Fuse H, Namiki M, Inoue M: **Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in archival specimens of benign prostatic hyperplasia and prostatic cancer using a highly sensitive nested PCR method.** *Urol Res* 1998, **26**(3):165-169.
69. Zambrano A, Kalantari M, Simoneau A, Jensen JL, Villarreal LP: **Detection of human polyomaviruses and papillomaviruses in prostatic tissue reveals the prostate as a habitat for multiple viral infections.** *Prostate* 2002, **53**(4):263-276.
70. McNeas AL, White ZS, Zanwar P, Vilchez RA, Butel JS: **Specific and quantitative detection of human polyomaviruses BKV, JCV, and SV40 by real time PCR.** *J Clin Virol* 2005, **34**(1):52-62.
71. Fedele CG, Ciardi M, Delia S, Echevarria JM, Tenorio A: **Multiplex polymerase chain reaction for the simultaneous detection and typing of polyomavirus JC, BK and SV40 DNA in clinical samples.** *J Virol Methods* 1999, **82**(2):137-144.
72. Samanta M, Harkins L, Klemm K, Britt WJ, Cobbs CS: **High prevalence of human cytomegalovirus in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic carcinoma.** *J Urol* 2003, **170**(3):998-1002.
73. Grinstein S, Preciado MV, Gattuso P, Chabay PA, Warren WH, De Matteo E, Gould VE: **Demonstration of Epstein-Barr virus in carcinomas of various sites.** *Cancer Res* 2002, **62**(17):4876-4878.
74. Hoffman LJ, Bunker CH, Pellett PE, Trump DL, Patrick AL, Dollard SC, Keenan HA, Jenkins FJ: **Elevated seroprevalence of human herpesvirus 8 among men with prostate cancer.** *J Infect Dis* 2004, **189**(1):15-20.
75. Effert PJ, Frye RA, Neubauer A, Liu ET, Walther PJ: **Human papillomavirus types 16 and 18 are not involved in human prostate carcinogenesis: analysis of archival human prostate cancer specimens by differential polymerase chain reaction.** *J Urol* 1992, **147**(1):192-196.

76. Masood S, Rhatigan RM, Powell S, Thompson J, Rodenroth N: **Human papillomavirus in prostatic cancer: no evidence found by in situ DNA hybridization.** *South Med J* 1991, **84**(2):235-236.
77. Serfling U, Ciancio G, Zhu WY, Leonardi C, Penneys NS: **Human papillomavirus and herpes virus DNA are not detected in benign and malignant prostatic tissue using the polymerase chain reaction.** *J Urol* 1992, **148**(1):192-194.
78. Wagner EK HM: **Basic Virology.** Malden MA.: Blackwell Science, Inc.; 1999.
79. Zhou A, Paranjape J, Brown TL, Nie H, Naik S, Dong B, Chang A, Trapp B, Fairchild R, Colmenares C *et al*: **Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L.** *EMBO J* 1997, **16**(21):6355-6363.
80. Silverman RH: **A scientific journey through the 2-5A/RNase L system.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2007, **18**(5-6):381-388.
81. D'Arcy F FR, Perry A, Marignol L, Lawler M, Watson R.G.W, Fitzpatrick J.M, Lynch T.H.: **NO EVIDENCE OF XMRV IN IRISH PROSTATE CANCER PATIENTS WITH THE R462Q MUTATION.** *European Urology Supplements* 2008, **7**(3).
82. Fischer N, Hellwinkel O, Schulz C, Chun FK, Huland H, Aepfelbacher M, Schlomm T: **Prevalence of human gammaretrovirus XMRV in sporadic prostate cancer.** *J Clin Virol* 2008, **43**(3):277-283.
83. Urisman A RJM, Nicole Fischer, Sarah J. Plummer, Graham Casey, Eric A. Klein, Krishnamurthy Malathi, Cristina Magi-Galluzzi, Raymond R. Tubbs, Don Ganem, Robert H. Silverman, Joseph L. DeRisi: **Identification of a Novel Gammaretrovirus in Prostate Tumors of Patients Homozygous for R462Q RNASEL Variant.** *PLoS Pathogens* 2006, **2**(3):15.
84. Pang KR: **Biological and clinical basis for molecular studies of interferons.** *Methods in molecular medicine* 2005, **116**:1-23.
85. H. Ballentine Carter AMD, Hans Lilja,: **Report to the Nation on Prostate cancer 2004. Prostate Cancer Foundation.** In. California: Medscape; 2004: 9-11.
86. Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB: **The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer.** *J Urol* 2004, **172**(5 Pt 2):S6-11; discussion S11-12.
87. Leiros GJ: **Detection of human papillomavirus DNA and p53 codon 72 polymorphism in prostate carcinomas of patients from Argentina.** *BMC urology* 2005, **5**.
88. Bergh J: **No link between viral findings in the prostate and subsequent cancer development.** *British journal of cancer* 2007, **96**(1):137-139.
89. Sfanos KS: **A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms.** *The Prostate* 2008, **68**(3):306-320.
90. Franceschi S: **Prevalence and determinants of human papillomavirus genital infection in men.** *British journal of cancer* 2002, **86**(5):705-711.
91. Lajous Mn: **Determinants of prevalence, acquisition, and persistence of human papillomavirus in healthy Mexican military men.** *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 2005, **14**(7):1710-1716.
92. Lazcano-Ponce E: **High prevalence of human papillomavirus infection in Mexican males: comparative study of penile-urethral swabs and urine samples.** *Sexually transmitted diseases* 2001, **28**(5):277-280.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO.

M. EN C. MARGARITA DE LA LUZ MARTÍNEZ FIERRO.

Candidato para el Grado de

Doctorado en Ciencias con Orientación Terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética

Tesis:

“Polimorfismo R462Q del gen RNASEL, infecciones virales crónicas y cáncer de próstata”

Campo de estudio: Biología Molecular.

Biografía.

Lugar de Nacimiento: Rodeo, Durango, México.

Fecha: 13 de mayo de 1978.

Padres: Ma. de la Luz Fierro Ramos y Jesús Martínez Valdéz.

Educación.

Licenciatura: Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Zacatecas.

Grado obtenido: Químico Farmacéutico Biólogo en 2002.

Estudios de Posgrado: Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Nuevo León.

Grado obtenido: Maestría en Ciencias con orientación terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética.