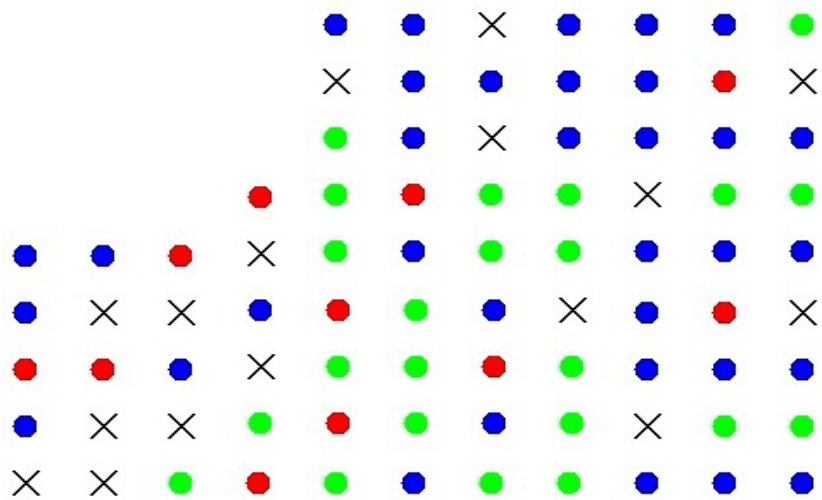
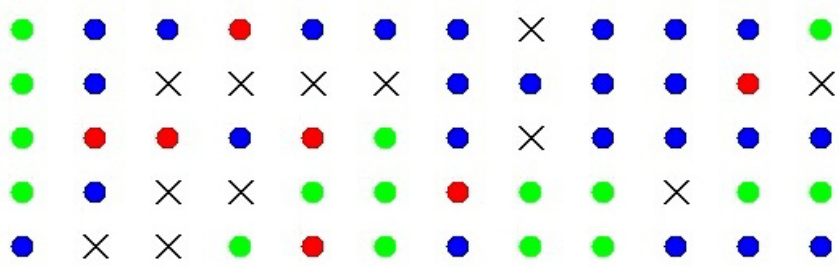


# NUEVOS BIOMARCADORES GENÉTICOS PARA EL CÁNCER DE PRÓSTATA ESPORÁDICO

# NEW GENETIC BIOMARKERS FOR SPORADIC PROSTATE CANCER

María Jesús  
Álvarez Cubero



New Genetic Biomarkers for Sporadic Prostate Cancer

MARÍA JESÚS ÁLVAREZ CUBERO  
TESIS DOCTORAL. *Mención Internacional*  
GRANADA, 2012

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Jesús Álvarez Cubero  
D.L.: GR 56-2013  
ISBN: 978-849028-264-9



Tesis doctoral:

**Nuevos Biomarcadores Genéticos para el Cáncer de Próstata  
Esporádico**

---

---

**New Genetic Biomarkers for Sporadic Prostate Cancer**

---

---

María Jesús Álvarez Cubero

Granada, 2012

D. José Antonio Lorente Acosta, Catedrático de la UGR; del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la Universidad de Granada; Director del Laboratorio de Identificación Genética de la UGR y Director científico del centro Pfizer(UGR),Genyo (Genómica e Investigación Oncológica).

D. Juan Carlos Álvarez Merino, Titulado superior de docencia e investigación del Departamento de Legal, Toxicología y Antropología Física de la UGR y Director del Laboratorio de Identificación Genética de la UGR.

D. José Manuel Cózar Olmo, Director de la UCG de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves y Profesor Asociado de la UGR, del Departamento de Urología, de la UGR.

Certifican que:

María Jesús Álvarez Cubero, Licenciada en Biología, ha realizado la Tesis Doctoral **“Nuevos biomarcadores genéticos para el cáncer de próstata esporádico”**, en el Laboratorio de Identificación Genética del Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropología Física de la Universidad de Granada; en el Centro do Instituto Nacional de Medicina Legal (Serviço de Genética e Biologia Forense) de Coimbra y en University of North Texas Health Science Center (Department of Forensic & Investigative Genetics) de Ft.Worth (Texas), para aspirar al grado de Doctor en Biología, con mención de “Doctor Internacional”, reuniendo las condiciones necesarias para ser presentada y defendida ante el tribunal correspondiente.

Y para que así conste a los efectos oportunos, en cumplimiento de la legislación vigente, firmamos el presente certificado en Granada, a 14 de Marzo de 2012.

Dr.D.J.A.Lorente

Dr.D.J.C Alvarez

Dr.D.J.M.Cózar

A mi madre, a mis hermanos y a David

Antes pensábamos que nuestro futuro estaba en las estrellas. Ahora sabemos que está en nuestros genes (*James Watson*).

## Agradecimientos

A los directores de esta tesis doctoral, por ayudarme y ofrecerme el poder aprender en este nuevo campo científico.

Un agradecimiento especial a José Antonio y Carlos, por transmitirme la pasión por la genética y sin los cuales no hubiese sido posible este trabajo. Gracias por depositar tanta confianza en mí y dejarme aprender día a día en el Laboratorio, por sus ánimos constantes y apoyo. Siempre lo he dicho, para mí no son sólo un referente científico, sino personal, de buen compañerismo y buen trabajo en equipo.

A todos mis compañeros del Departamento, a todos los Médico-Legales, los residentes que nos han acompañado y por supuesto a los Toxicólogos. Un agradecimiento muy especial también a Marga y Mari Carmen por su amabilidad y ofrecimiento constante. A Vivi por los buenos momentos que compartimos en el laboratorio y del que surgió una gran amistad. Por su puesto, agradecer a la gente que me han enseñado diariamente y ayudado, los compañeros de ADN. A mis compañeros de LORGEN (Carmen, Esther, Encarni y Javier) con los que compartí los primeros años de mi formación, gracias por prestarme vuestro tiempo y atención. Un agradecimiento muy especial a mis **amigos** y compañeros María y por su puesto a Luis Javier, que hacen que día a día este trabajo sea más enriquecedor, por su apoyo, sus horas y ayuda constante, por siempre recibir un SÍ en todo lo que he necesitado, Gracias.

A la gente que me ha acogido fuera como si estuviese en casa. A todos los compañeros de Ft.Worth y Coimbra.

A mis todos mis amigos, los que me han sufrido día a día en los entrenamientos (Migue, Suna, Elena, Rocío...), los que siempre están ahí (Fer, Blanca y Lydia), los que me han apoyado (Javi, Meli, Angela, Anfra...) a Belén, Encarni, Espe...

Por último, a mi familia. A mi tío Javier, por dedicarme su tiempo con la estadística. A mi hermana y Bernar, por sus ánimos y su tiempo. A Jose e Isabel por su apoyo. A David, por su ánimo, apoyo, su cariño y soportar que le dedicase menos tiempo del que se merece. Un agradecimiento muy especial a mi madre, que desde el principio me transmitió sus inquietudes por la genética, sus ánimos y fuerzas constantes, GRACIAS mamá, sin tí nada de esto hubiese sido posible.

*"Cuando la gratitud es tan absoluta las palabras sobran". (Álvaro Mutis)*

*"No puede responder otra cosa que gracias y gracias". (William Shakespeare)*

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>6</b>
1. GENÉTICA Y CÁNCER .....	8
ONCOGENES .....	9
2. EL CÁNCER DE PROSTATA .....	8
2.1. EL CÁNCER DE PRÓSTATA: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIONES .....	10
2.2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....	12
2.3. EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA .....	16
3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES AFECTOS .....	20
3.1. EL ESTADIO .....	20
3.2. GRADACIÓN GLEASON .....	24
4. MARCADORES PARA DETECTAR EL CÁNCER DE PRÓSTATA .....	26
4.1. PSA .....	26
4.2. BIOMARCADORES .....	29
4.3. MARCADORES GENÉTICOS .....	30
4.3.1. BRCA-1 y BRCA-2 .....	31
4.3.2. Gen CO1 .....	32
4.3.3. Gen CHEK2 .....	32
4.4. CAMBIOS EPIGENÉTICOS .....	33
5. BIBLIOGRAFÍA .....	34
<b>OBJETIVOS / OBJECTIVES</b> .....	<b>40</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
1. PACIENTES Y CONTROLES .....	46
Selección de los Pacientes .....	46
Selección de los Controles .....	47
Características clínicas de Pacientes y Controles .....	48
Normas éticas en el manejo de muestras de ADN humanas: .....	50
1. EXTRACCIÓN DE ADN .....	51
2. CUANTIFICACIÓN .....	51
3. AMPLIFICACIÓN .....	51
Amplificación del gen RNASEL .....	51
Amplificación de genes MSR1 y ELAC2 .....	54
Técnica de TaqMan® SNP Genotyping Assays .....	54
Amplificación del ADN mitocondrial .....	57
4. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR .....	59
5. SECUENCIACIÓN .....	60
6. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE SECUENCIACIÓN .....	61

7.	VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS _____	61
7.1.	ELECTROFORESIS CAPILAR _____	61
7.2.	ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS _____	63
8.	TRATAMIENTO ESTADÍSTICO _____	63
8.1.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GENES RNASEL, MSR1 Y ELAC2 _____	63
8.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ADN MITOCONDRIAL _____	64
9.	BIBLIOGRAFÍA _____	65
	ANEXOS _____	67
	<b>CAPÍTULO 1</b> _____	<b>75</b>
	<i>Búsqueda de la relación en las mutaciones del Gen RNASEL con el cáncer de próstata esporádico</i> _____	<b>75</b>
	ABSTRACT _____	77
1.	INTRODUCCIÓN _____	78
1.1.	GEN RNASEL (HPC1) _____	79
1.2.	VARIANTES DEL GEN RNASEL _____	81
2.	MATERIALES Y MÉTODOS _____	85
2.1.	POBLACIÓN Y MUESTRA _____	85
2.2.	ANÁLISIS GENÉTICOS _____	85
2.3.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS _____	86
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	87
3.1.	D541E _____	88
3.2.	R462Q _____	92
3.3.	I97L _____	97
4.	CONCLUSIONES _____	99
5.	BIBLIOGRAFÍA _____	101
	ANEXO _____	105
	<b>CAPÍTULO 2</b> _____	<b>107</b>
	<i>Búsqueda de la relación en las mutaciones de los Genes ELAC2 y MSR1 con el cáncer de próstata esporádico</i> _____	<b>107</b>
	ABSTRACT _____	109
1.	INTRODUCCIÓN _____	111
1.1.	GEN ELAC 2 (HPC2) _____	112
1.2.	VARIANTES DEL GEN ELAC2 _____	113
1.3.	GEN MSR1 _____	116
1.4.	VARIANTES DEL GEN MSR1 _____	117
2.	MATERIALES Y MÉTODOS _____	119
2.1.	ANÁLISIS GENÉTICOS _____	119
2.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS _____	119
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	121



3.1. GEN MSR1 _____	121
3.2. GEN ELAC2 _____	131
4. CONCLUSIONES _____	140
5. BIBLIOGRAFÍA _____	143
ANEXO _____	146
<b>CAPÍTULO 3</b> _____	<b>149</b>
<b><i>Análisis del papel de los haplogrupos y polimorfismos mitocondriales en el cáncer de próstata esporádico</i></b> _____	<b>149</b>
ABSTRACT _____	151
1. INTRODUCCIÓN _____	152
1.1. ADN MITOCONDRIAL _____	153
1.2. HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES _____	158
1.3. MITOCONDRIAS Y ENFERMEDAD _____	164
1.4. APLICACIONES DEL ADNmt _____	166
1.5. ADNmt Y CÁNCER DE PRÓSTATA _____	167
2. MATERIALES Y MÉTODOS _____	169
2.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO _____	169
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	170
3.1. HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES (CONTROLES Y PACIENTES) _____	170
3.2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS _____	174
3.3. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN CONTROL _____	176
4. CONCLUSIONES _____	178
5. BIBLIOGRAFÍA _____	180
ANEXO _____	187
<b>CAPITULO 4</b> _____	<b>188</b>
<b><i>Resumen Global</i></b> _____	<b>188</b>
BIBLIOGRAFÍA _____	193
REFERENCES _____	197
<b>CONCLUSIONES / CONCLUSIONS</b> _____	<b>199</b>
<b>ARTÍCULOS PUBLICADOS</b> _____	<b>205</b>
<i>PREDICTIVE VALUE IN THE ANALYSIS OF RNASEL GENOTYPES IN RELATION TO PROSTATE CANCER.</i> _____	206
<i>ESTUDIO GENÉTICO DEL RNASEL EN CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU RELACIÓN CON EL ESTADIAJE CLÍNICO</i> _____	206

## ABREVIATURAS

A: Adenina.

ADN: Ácido didesoxinucleico.

ADNmt: ADN mitocondrial.

ADNn: ADN nuclear.

ADP: Adenosín Difosfato.

ARN: Ácido ribonucleico.

ARNr: ARN ribosómico.

ARNt: ARN de transferencia.

ATP: Adenosín trifosfato.

BRCA 1 y 2: Siglas del gen del cáncer de mama 1 y 2 (Breast cancer gene 1 / 2).

C: Citosina.

CO1: Citocromo oxidasa 1.

CP: Cáncer de próstata.

CRM: Cadena respiratoria mitocondrial.

DTT: Ditiotreitól.

EC: Electroforesis capilar.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

ELAC2: ElaC homólogo 2 (*E. coli*).

F: Forward (referido al Primer).

G: Guanina.

H: Siglas que nombran a la hebra pesada del ADNmt. Proviene del acrónimo referente a la palabra inglesa "Heavy".

HBP: Hiperplasia prostática benigna.

HDL: High density lipoprotein.

HPC: Cáncer de próstata hereditario.

HV1: Región hipervariable 1.

HV2: Región hipervariable 2.

ins: Inserciones.

kDa: Kilo Dalton.

L: Siglas que nombran a la hebra ligera del ADNmt. Proviene del acrónimo referente a la palabra inglesa "Light".

LDL: Low density lipoprotein.

LOH: *Loss of Heterozygosity* o pérdida de heterocigosidad.

min: Minutos.

MSR1: *Macrophage scavenger receptors 1*.

NaCl: Cloruro sódico.

NADH: Dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida).

ncRNA: ARN no codificante.

NTC: Control negativo usado en la técnica SNP Genotyping Assay.

OR: Odds ratio.

OXPHOS: Fosforilación oxidativa.

p: Sigla de brazo corto de un cromosoma.

pob: Población.

pb: Pares de bases. A veces, debido a la nomenclatura inglesa aparece como bp.

PK: Proteínasa K.

R: Reverse (referido al Primer).

RBP: RNA-binding proteins.

RNASEL: Ribonucleasa L.

ROS: Especies reactivas de oxígeno.

rpm: Revoluciones por minuto.

rs: Nomenclatura de un SNP determinado. Suele ir acompañada de una serie numérica.

S: Referente a unidad Svedberg caracterizada por el tipo de coeficiente de sedimentación. Esta unidad es característica de los ribosomas (70S y 80S) y ARNr.

SDS: Siglas del detergente Sodio Dodecil Sulfato.

SNPs: Siglas referentes a *Single Nucleotide Polymorphism*, o lo que es lo mismo Polimorfismo de un único nucleótido.

SPSS: Siglas del programa estadístico "Statistical Package for the Social Sciences" aunque también se ha referido como "Statistical Product and Service Solutions" (Pardo, A., & Ruiz, M.A., 2002).

SR: Siglas de *Scavenger Receptors*.

T: Timina.

T<sup>a</sup>: Temperatura.

T<sub>f</sub>: Temperatura de fusión.

UVB: Radiación ultravioleta o radiación UV tipo B.

## **INTRODUCCIÓN**

## 1. GENÉTICA Y CÁNCER

El destino de cada una de las células de nuestro organismo está previamente fijado en el material genético que contienen, es decir, impreso en su ADN. Sin embargo, este ADN puede sufrir cambios; bien por causas externas ambientales, como la alimentación, la radiación ultravioleta y estilo de vida; o internas, entre las que podemos señalar todas las alteraciones de distintos tipos de rutas, que normalmente acaban produciendo un crecimiento celular descontrolado [1]. Finalmente, se produce una interacción con el ADN, que si no es reparada puede quedar fijada y expresarse [1]. Así se ha observado, como en el caso de la radiación UV puede generar dímeros de timina, sitiosapurínicos, apirimidínicos, o puentes cruzados entre las cadenas de ADN. De igual modo, puede ocurrir con el caso de los factores de crecimiento del tipo TGF- $\beta$  que al sufrir mutaciones adquieren una resistencia a la inhibición del crecimiento produciéndose un crecimiento celular descontrolado. Generalmente tanto cambios genéticos como epigenéticos pueden afectar a determinadas regiones del ADN alterando las pautas normales de crecimiento y proliferación celular [2].

Durante el desarrollo y progreso de un cáncer, las células sufren una serie de modificaciones, pueden ser epigenéticas como metilación del ADN, desacetilación de histonas y alteraciones en el nucleosoma. Estas alteraciones y variaciones generan una inestabilidad genética que puede activar oncogenes o silenciar genes supresores de tumores [3].

Todos los eventos citados anteriormente generan finalmente mutaciones que podemos clasificar según el tipo de célula que afecten: mutaciones germinales (afectan a las células gaméticas) y mutaciones somáticas (afectan a las células somáticas). Las consecuencias finales de un tipo de mutación y otra

son diferentes. Así los cambios que se producen en los gametos o células germinales pueden provocar esterilidad en el individuo o fijarse en el material genético del mismo implicando una transmisión a la descendencia, por lo que evolutivamente tienen gran importancia. En cambio, las mutaciones somáticas que se producen en un individuo pueden desencadenar algún tipo de patología o iniciar la carcinogénesis, pero a diferencia de las anteriores, no se transmiten a la descendencia [4]. Este último tipo de mutación puede dar lugar a individuos mosaico, ya que no todas las células del individuo tienen por qué estar afectadas por esta mutación.

## **ONCOGENES**

Los protooncogenes son aquellos genes celulares que controlan procesos de proliferación y diferenciación celular. Si por cualquier agente, tanto exógeno como endógeno, ocurren mutaciones en estos, se produce una alteración en los mismos que puede derivar en la generación de variantes alteradas u oncogenes.

Los oncogenes se describen como genes anormales que proceden de la mutación de un protooncogén y su principal función es la transformación de una célula normal en una maligna que desarrollará un determinado tumor.

La participación de los protooncogenes es muy amplia tanto en cascadas de señalización que intervienen finalmente en la proliferación celular, como en la interacción de vías para la expresión de genes que actúen sobre el ciclo celular. Se encargan por tanto, de mantener una homeostasis en el ciclo celular.

## **2. EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

Existen distintos tipos de alteraciones en el tejido prostático, pudiendo ser de tipo benigno o maligno. La frecuencia de ambas alteraciones aumenta con el envejecimiento. Existen características de los trastornos proliferativos benignos como son la polaquiuria, infección y posible obstrucción [5]. En la hipertrofia nodular benigna se producen síntomas como la obstrucción del vaciado vesical por la presión sobre la uretra prostática. A su vez, hay una cierta predisposición a la infección y formación de cálculos [6]. Una de las principales diferencias entre la hiperplasia benigna y el carcinoma de próstata es que este último tumor se suele originar en la zona periférica de la próstata a diferencia de la hiperplasia benigna que se desarrolla principalmente en las zonas periuretral y de transición de la glándula [6].

Con respecto a las características malignas vamos a centrarnos en el cáncer de próstata, el cual se detallará a lo largo de todo este trabajo.

### **2.1. EL CÁNCER DE PRÓSTATA: DEFINICIÓN Y CLASIFICACIONES**

El cáncer de próstata es el sexto cáncer más común en el mundo y el tercero en el caso de los varones. Si nos centramos en la población española también ocupa la tercera posición entre varones españoles, al igual que la tercera causa de muerte general por cáncer. En América es uno de los cánceres más comunes, teniendo las tasas de incidencia más elevadas del mundo contrastando con las tasas más bajas localizadas en Asia y Norte de África. Así mismo, y a pesar de los progresos en su diagnóstico precoz, tratamiento e incremento de la supervivencia; constituye la segunda causa de mortalidad por cáncer, después del broncopulmonar en dichos países. En Europa, en el año 2008, se diagnosticaron 382.300 nuevos casos y 89.300 pacientes fallecieron [7]. En España, el estudio de incidencia del cáncer de próstata realizado en 2010, mostró una incidencia estimada de 19.000 nuevos casos/año [8], con una tasa de 80 nuevos casos/100.000 habitantes.



Existen principalmente dos tipos de adenocarcinoma prostático, el familiar y el esporádico. Debido a que el cáncer de próstata es un tipo de tumor sólido, es característico de este tipo de tumores la existencia de unas tasas de incidencia de 5-10% en casos familiares [9]. De hecho se describen casos de historias familiares en los que individuos con dos o incluso tres familiares afectados de esta patología tienen un riesgo incrementado de 5 a 11 veces, con respecto a los casos que no se encuadren en este entorno familiar [10]. Es un ejemplo de lo que se conoce como *cáncer de próstata hereditario*, en el que existe una familia con un grupo de tres o más familiares afectados (padres e hijos) y además el grupo afectado suele padecer la enfermedad a una edad temprana (55 años o inferior a esta).

Por otro lado, se denomina *cáncer de próstata familiar* cuando el cáncer de próstata afecta a más de una persona pero sin un patrón definitivo de herencia. En la patología prostática familiar, el material genético está dañado y existen al menos tres familiares de primer grado de consanguinidad afectados por esta patología (normalmente apareciendo los casos en generaciones sucesivas) [11]. Suele aparecer en personas de edad avanzada, la edad media del diagnóstico es de 70 años, siendo excepcional su diagnóstico antes de los 40 años. Sin embargo, existen un gran porcentaje de casos de *cáncer de próstata esporádico* en los que en determinadas familias se encuentran varones afectados por cáncer de próstata, en edad típica de este adenocarcinoma y sin tener aparentemente influencias genéticas [12]. A diferencia del anterior, en el cáncer de próstata esporádico, el material genético está dañado por carcinógenos, como causa de la exposición del individuo a lo largo de su vida a agentes mutagénicos o factores diversos como pueden ser la profesión o la dieta. La incidencia de este último tipo oscila entre valores de un 80 a un 90% [13].

La dificultad para poder diferenciar entre el cáncer de próstata hereditario y esporádico radica en que no existen patrones clínicos o patológicos claramente diferentes salvo la edad temprana de diagnóstico en el cáncer de tipo hereditario. Sin embargo, sendos tipos de cánceres de próstata parecen tener un patrón pronóstico diferente [14]. El cáncer de próstata hereditario se

describe con un comportamiento más agresivo, un pronóstico más desfavorable que el de tipo esporádico [15].

Si establecemos una analogía con lo que ocurre en el cáncer renal, se sabe que el gen supresor de tumores von Hippel Lindau (VHL) es relevante para el desarrollo del cáncer renal familiar, pero a su vez también lo es para el cáncer renal esporádico. El gen de VHL es un gen supresor de tumores que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 3 (3p); este gen tiene 3 exones que codifican para una proteína de 213 aminoácidos [16].

En el cáncer renal, como en casi todos los cánceres; existe una forma hereditaria y otra no hereditaria o esporádica, constituyendo este último la gran mayoría (95%). Un 85% de los cánceres esporádicos son carcinomas de células claras, 5-10% son cánceres papilares y el resto constituye variantes poco frecuentes, como los cromóforos y los carcinomas de los tubos colectores [16]. Debido al gran porcentaje de tumores esporádicos, se han realizado estudios genéticos en estos casos. De hecho, se han descrito multitud de casos en los que el gen VHL ha sufrido pérdida de función (bien por mutación, por metilación o por pérdida alélica) quedando así demostrado el papel que ejerce el gen VHL en el desarrollo del carcinoma renal esporádico. De igual forma, los genes que se describen en el carcinoma prostático familiar parecen ejercer importantes funciones en su desarrollo [17-19]. Por ello, siguiendo ese posible patrón similar entre la genética del cáncer esporádico y familiar, se va a intentar relacionar la información genética descrita en el carcinoma hereditario para el gen HPC1 con el carcinoma prostático esporádico.

## **2.2. CARACTERÍSTICAS DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

Otra de las particularidades del cáncer de próstata es la gran variabilidad del mismo, dependiendo de la raza, localización geográfica, edad y otros factores como lugar de trabajo, alimentación y otros hábitos de vida.

De hecho una de las principales características del cáncer es que se trata de una patología crónica asociada con mutaciones genéticas causadas por varios factores, la mayoría de los cuales son ambientales. La variación en la

incidencia de los diferentes tipos de tumores en el mundo es indicativa de diferencias en la exposición a factores ambientales [20]. En el caso del cáncer de próstata, la epidemiología se divide en dos grandes grupos: los factores endógenos (historial familiar, hormonas, raza, edad y estrés oxidativo); y los factores exógenos (dieta, agentes medioambientales, ocupación y otros factores como estilo de vida) [21]. A continuación se analizan, de forma somera algunos de estos factores.

- *Historial Familiar*

De hecho existen estudios que lo corroboran con gemelos monozigóticos y dizigóticos para comprobar el papel relevante genético en los mismos. Se piensa que las causas son debidas tanto a componentes genéticos como a factores de riesgo medioambientales que se comparten dentro de una misma familia [22]. Para ello se han realizado análisis de segregación múltiple en los que se indica que la causa de este tipo de cáncer familiar está debido a la acción de uno o más genes de alto riesgo como por ejemplo HPC1, HPC2, MSR1, HPCX... Aunque algunos de ellos se han destacado con un papel principal para el desarrollo de este adenocarcinoma, en general queda mucho por hacer.

- *Hormonas*

Los andrógenos parecen alterar de forma significativa las tasas de crecimiento del cáncer de próstata. Se ha comprobado que concentraciones elevadas de testosterona y su metabolito, dihidrotestosterona, aumentan el riesgo de cáncer de próstata.

- *Raza y etnia*

Las tasas de mayor incidencia de esta patología se localizan en los afroamericanos [21] y las más bajas se localizan en las poblaciones asiáticas. Con un valor intermedio están las poblaciones hispánicas y europeas [23]. Dentro de la población europea, la mayor incidencia se localiza en países nórdicos como Islandia, mientras que las más bajas se localizan en países de la Unión Europea como Italia, España y Francia [24,25].

En la población afroamericana, no sólo se dan tasas de mayor incidencia sino también tasas de mortalidad más amplias y a una edad más temprana [23].

Por todo ello, parece apropiado considerar dentro de los factores de pronóstico el lugar de residencia como parámetro relevante para el diagnóstico del cáncer de próstata.

- *Factores medioambientales (lugar de trabajo y hábitos de vida)*

Los individuos que tienen determinados ambientes laborales como aquellos confinados a trabajos de agricultura (principalmente por el uso de pesticidas) o industrias que trabajan con metales pesados parecen tener una incidencia mayor a desarrollar cáncer de próstata. Hay estudios que señalan a los pesticidas organoclorados como un factor causante del cáncer de próstata [26].

Otros factores que se han destacado como posibles causantes o con una asociación positiva al cáncer de próstata son la alimentación, la actividad física y el tabaquismo entre otros [21]. Con respecto a la actividad deportiva, parece que el desarrollar una pauta vigorosa de ejercicio puede disminuir la progresión del cáncer de próstata. El efecto protector de la misma no es claramente conocido aún, pero se piensa que puede ser debido a la influencia sobre un gran número de hormonas. Entre las hormonas sobre las que ejerce efecto el ejercicio físico destacamos la insulina, leptina y testosterona. En un estudio realizado en una población americana se concluyó que los varones de 65 años que habían realizado al menos tres horas semanales de actividad física tenían un riesgo menor de ubicarse dentro de los rangos más elevados de cáncer de próstata [27].

- *Dieta*

Es uno de los factores en los que más se ha intentado establecer una relación con el desarrollo de cáncer de próstata. La dieta es muy diversa a lo largo del mundo, de tal forma que países asiáticos incluyen gran cantidad de proteínas de soja y poca cantidad de proteínas animales en su dieta. En contrapartida, los países industrializados de la región occidental poseen dietas

ricas en grasas animales y mayor índice de obesidad. Al comparar los datos de cáncer de próstata, se ven porcentajes diferentes en estas regiones, de tal forma que los asiáticos tienen baja incidencia de esta patología y es elevada en los países occidentales [28].

Se han descrito una gran cantidad de factores alimenticios que parecen ejercer un papel relevante en el desarrollo del cáncer de próstata. El consumo de grasas, especialmente las grasas poliinsaturadas [21] parece actuar como metabolitos intermediarios que reaccionan con el ADN o proteínas pudiendo causar daños en el ADN. La vitamina C, aunque puede actuar como especie reactiva de oxígeno, actúa como un potente agente reductor o antioxidante bloqueando la formación de nitrosaminas y nitrosamidas (que poseen capacidad carcinogénica). [21]. La ingestión de vitamina E, produce un efecto protector por su acción antioxidante, evitando la progresión del cáncer [21].

Muchos de los alimentos que se nombran como relevantes para el desarrollo del cáncer de próstata se encuadran en este grupo por sus capacidades quimiopreventivas, propiedades antioxidantes y efectos inhibidores en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata. Dentro de estas sustancias destacaríamos a los carotenoides, licopeno, retinoides, vitaminas A, E y C, selenio, sustancias con contenido en fenol [28], las proteínas de soja, el pescado y las grasas marinas, ácidos omega 3, colesterol, polifenoles, isoflavonas, carne roja, cruciformes y el té verde [29]. Todos estos agentes interactúan en algún punto de la ruta carcinogénica del cáncer de próstata, incluyendo el metabolismo de andrógenos, progresión del ciclo celular y apoptosis, al igual que alternando potenciales de membrana mitocondriales y respuestas al estrés oxidativo [30]. Se han realizado estudios en poblaciones suecas en las que se ha demostrado que sólo los pescados con alto contenido en ácidos grasos del tipo omega 3 disminuyen el cáncer de próstata. Parecen inhibir la acción del ácido araquidónico (derivado de la biosíntesis de los eicosanoides) y aumentan las cantidades de EPA (ácido eicosapentanoico). El EPA compite con el araquidónico como sustrato de las ciclo-oxigenasas y, por tanto, unas concentraciones elevadas de EPA pueden llevar a cambios

importantes en el crecimiento del tumor potenciado por las prostaglandinas [31].

Se ha comprobado que los afroamericanos consumen más cantidad de grasas y menor cantidad de fibra en su dieta si se comparan con poblaciones como la caucásica y la asiática. De igual forma, se conoce que la población afroamericana consume menos licopeno, selenio y productos derivados de la soja [23], lo que parece contradictorio con respecto a la distribución poblacional de este cáncer.

### **2.3. EPIDEMIOLOGIA DEL CÁNCER DE PRÓSTATA**

Se ha comprobado que las tasas de incidencia de esta patología varían ampliamente entre individuos de distintas etnias. Entre los años 2002 y 2006, las tasas de incidencia del cáncer de próstata oscilaban entorno a unos 232 individuos de 100.000 en afroamericanos frente a los 146 afectados en las poblaciones europeas [32]. En la población de Andalucía se ha estimado una incidencia de cáncer de próstata de 70/100.000 habitantes/año, porcentaje inferior a la incidencia en España 82/100.000 hab/año. Según los estudios coordinados por el Dr. Cózar, en Andalucía podemos ver que se diagnostica en pacientes más jóvenes, y con más síntomas prostáticos en estadios localizados (T1c) [8]. En cambio, poblaciones como Japón y China presentan porcentajes de incidencia y mortalidad de este adenocarcinoma más bajos [33]. Estas tasas se hacen aún más evidentes si nos fijamos en las tasas de mortalidad entre estos dos grupos poblacionales, siendo dos veces mayor en la población afroamericana.

Según los últimos estudios, parece que el componente racial está altamente ligado con un componente genético (seguramente multifactorial) que hace que exista esta diferencia entre los grupos poblacionales. Sin embargo, no es el único factor que influye en esta patología, como se ha señalado previamente, el componente ambiental es otro de los factores más importante [34]. De hecho estudios de poblaciones migratorias han indicado que la duración de la residencia en diversos lugares afecta al riesgo de cáncer de próstata. Con todo esto, vemos que los factores genéticos son importantes pero el riesgo del cáncer de próstata también fluctúa entre poblaciones que son étnicamente similares pero que viven en diferentes lugares quedando patente el papel de los factores medioambientales en cambios de riesgo en esta patología [33].

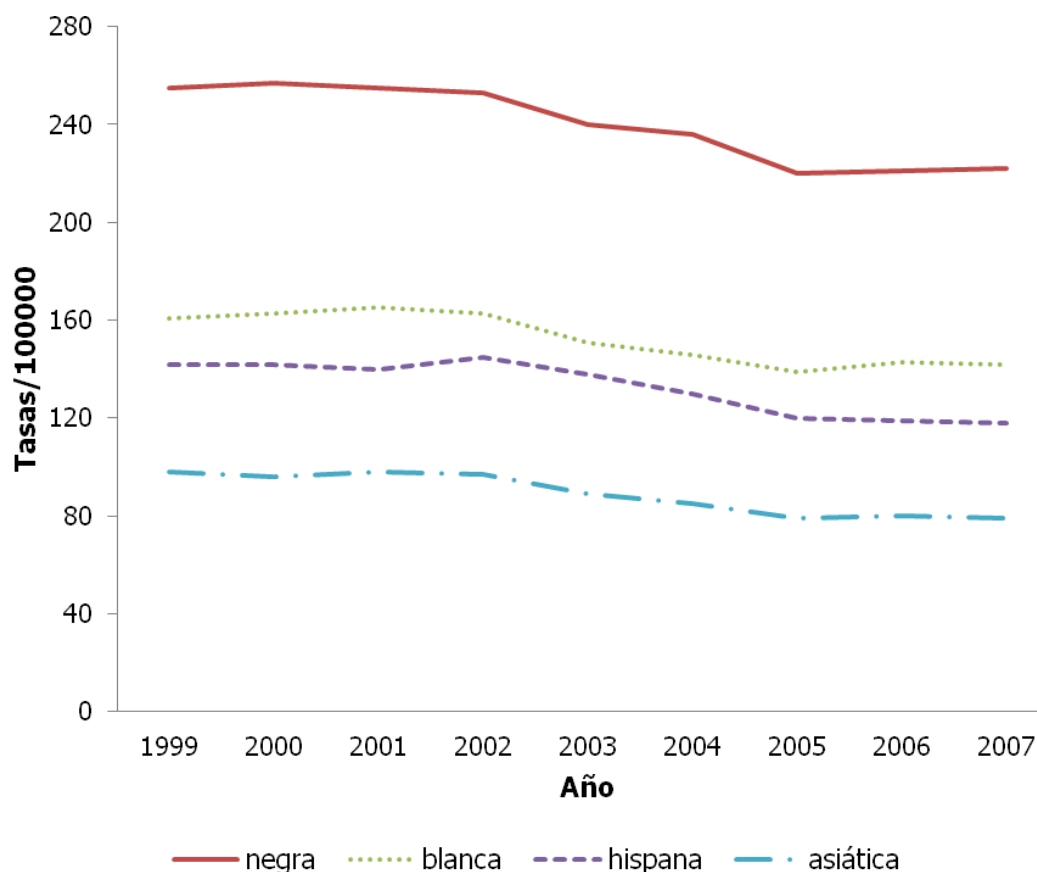


Figura1: Tasas de cáncer de próstata en poblaciones asiática, hispana, blanca y negra. Obtenida a partir de datos combinados del Programa Nacional de Registros del Cáncer. (Las tasas están calculadas por cada 100.000 personas y ajustadas por edad. Como grupo hispano se refiere a grupos raciales de etnia blanca y otros grupos raciales de islas del Pacífico o indoamericana/nativa de Alaska [35]).

Si se estableciese un esquema de gradación de este cáncer, los grupos que poseen mayores tasas de incidencia y mortalidad son los individuos afroamericanos, seguidos de población blanca residente en EEUU. Entre los grupos con menores tasas, destacamos a los hispanos y japoneses y seguidos de los varones descendientes de Asia que poseen las tasas más bajas. La diferencia entre las poblaciones no se determina exclusivamente por la existencia de tasas de prevalencia y supervivencia diferentes, sino que se han señalado casos en los que se describen fenómenos de anticipación del cáncer. Por lo general, los casos de cáncer de próstata aparecen cinco años antes en las poblaciones americanas que en poblaciones asiáticas[36].

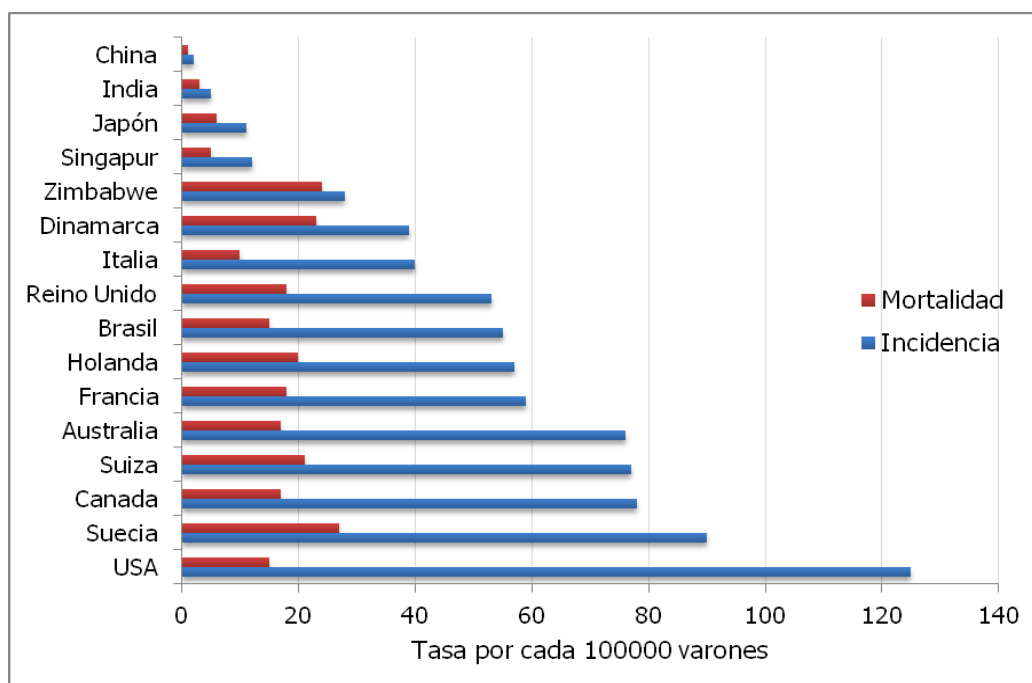


Figura 2: Datos actualizados a 2002 donde se indican las tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de próstata en distintos grupos poblacionales.

Como se ha visto a lo largo de este apartado, los factores raciales y geográficos son muy relevantes a la hora de poder realizar un estudio correcto así como, un análisis de este carcinoma. Este estudio está referido exclusivamente a una determinada población del Sur de Europa, concretamente de Granada (Andalucía, España). Si se concretan las tasas de incidencia y mortalidad a nivel Europeo, se observa como las más altas se encuentran en los países escandinavos (Norte Europa) y las menores en la regiones Sur europeas [37] (Figura 3).



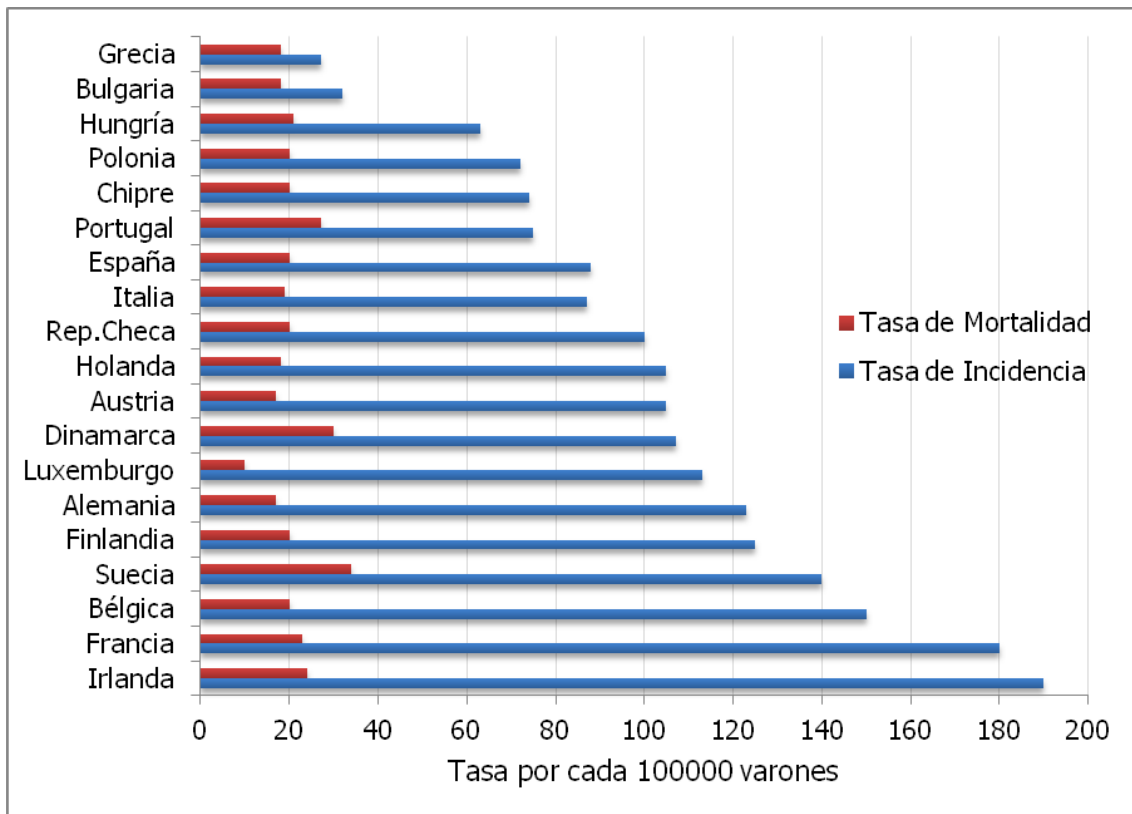


Figura 3: Tasas de incidencia y Mortalidad en la población europea. Como vemos las tasas de incidencia y mortalidad varían entre los distintos países europeos. Fuente: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/prostate/incidence/> [37].

### 3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LOS PACIENTES AFECTOS

El pronóstico de carcinoma de próstata se puede predecir con cierta exactitud gracias a medidas de gradación y estadificación clínicas. Existen distintas formas de clasificar al paciente con cáncer de próstata: según la extensión del tumor (TNM), el grado histopatológico (Gleason), su estadio clínico o histopatológico, o su riesgo. Para la estadificación, se tienen en cuenta el tamaño (volumen) del tumor, el grado de extensión dentro de la próstata, la extensión fuera de la próstata, las metástasis en los ganglios linfáticos y la distancia. Estas valoraciones se pueden realizar bien en biopsias prostáticas o en especímenes de prostatectomía total [6].

#### 3.1. EL ESTADIO

El estadio o etapa, es un método de clasificación del tumor según su tamaño y localización. Puede estimarse mediante distintos procedimientos como son el tacto rectal, ecografía o bien mediante una punción y posterior recuento del número de células cancerosas presentes en cada muestra tomada. Pueden establecerse varios sistemas de clasificación de las etapas del cáncer como son los sistemas ABCD o clasificación de Whitmore-Jewett, los sistemas TNM (siglas de Tumor, Nódulo y Metástasis) o bien los sistemas I – IV (o su análogo numérico 1-4) [38].

#### ✓ Estadificación mediante el sistema de Whitmore-Jewett (sistema ABCD)

En este caso se clasifica el cáncer de próstata como A, B, C, o D. Donde cada letra se corresponde con un estadio y unas características clínicas determinadas.

- **Estadio A**, se engloba a un tumor clínicamente indetectables confinado a la glándula prostática y que ha sido un hallazgo casual en una cirugía de

próstata por otro motivo. Podemos realizar subclasificaciones, donde A1 se corresponde con un cáncer bien diferenciado con afectación focal; y A2 con un cáncer moderadamente o pobremente diferenciado o con afectación de múltiples focos en la glándula prostática. Si el cáncer afecta a más del 5% del tejido se considera dentro del estadio T1b.

- **Estadio B**, se refiere a un tipo de tumor confinado a la glándula prostática (local). De igual forma, podemos diferenciar, B0 en los casos en los que el PSA es detectable, pero tumor no palpable; B1 cuando existe un único nódulo en un lóbulo de la próstata; y B2 al describirse una afectación más extensa de un lóbulo o de ambos lóbulos de la próstata.
- **Estadio C**, nos referimos a un tumor clínicamente localizado en el área periprostática pero que se extiende a la cápsula prostática o afecta a las vesículas seminales. Según características clínicas podemos a su vez diferenciar los tipos C1, cuando existe una extensión clínica extracapsular; o C2 si el tumor extracapsular produce retención de orina u obstrucción uretral.
- **Estadio D** se corresponde con la enfermedad metastásica. Se destacan dos tipos la D1 (análoga a N1-M0) para el caso en el que el cáncer llega a los ganglios linfáticos. Hasta este punto (etapa C y D1) se le puede considerar como un cáncer regional. La etapa D2 (o M1), implica una diseminación del cáncer a otras partes del cuerpo por lo que se denomina como cáncer sistémico o metastásico.

#### ✓ **Estadificación sistema I-IV**

**Estadio I**, se engloba a un tipo de cáncer que no se ha extendido a los ganglios linfáticos ni a ninguna parte del cuerpo. Engloba a una escala Gleason baja (2 a 4), y al estadio T1a, N0, M0.

**Estadio II**, diferenciamos a un cáncer que no se ha extendido a los ganglios linfáticos ni a ninguna parte del cuerpo, pero a diferencia del caso anterior posee un Gleason intermedio o alto (5 o más alto); normalmente diagnosticado por una biopsia realizada por un nivel de PSA alto, y no se ha

podido palpar en el tacto rectal o no se ha visto en la ecografía transrectal; aunque también puede detectarse en estos dos últimos casos. Englobaríamos en este grupo a las siguientes combinaciones:

- T1a, N0, M0, Gleason intermedio o alto (5 a 10).
- T1b, N0, M0, cualquier Gleason (2 a 10).
- T1c, N0, M0, cualquier Gleason (2 a 10).
- T2, N0, M0, cualquier Gleason (2 a 10).

**Estadio III**, el cáncer ha sobrepasado los límites de la próstata y puede afectar a las vesículas seminales, pero no a los ganglios linfáticos ni a ninguna parte del cuerpo. Encuadra a los estadios T3, N0, M0 y cualquier Gleason (2 a 10).

**Estadio IV** se cumplen uno o más de los siguientes parámetros:

- El cáncer se ha extendido a los tejidos próximos a la próstata, diferentes de las vesículas seminales, como el esfínter externo vesical (músculos que ayudan en el control de la micción), recto, y/o pared de la pelvis.
- Se ha extendido a los ganglios linfáticos.
- Se ha extendido a órganos distantes del cuerpo.

Se corresponde con los estadios T4, N0, M0 y cualquier Gleason (2 a 10); o cualquier T, N1, M0 y cualquier Gleason (2 a 10); o bien cualquier T, cualquier N, M1 y cualquier Gleason (2 a 10).

#### ✓ **Estadificación (TNM)**

En el sistema de estadificación (TNM) existen distintas categorías en función de que los cánceres sean palpables en el tacto rectal o bien identificados sólo por el antígeno prostatoespecífico anormal (T1c), para los palpables pero clínicamente circunscritos a la glándula (T2) y para los que se han extendido fuera de la próstata (T3 y T4) [5].

Este sistema de estadiaje se usa como método estándar para realizar clasificaciones en este cáncer. Este sistema TNM se usa para clasificar a varios tumores malignos, y describe cómo de extendido se encuentra el tumor en el

paciente. Debe sus siglas a T (describe el tamaño del tumor y si invade tejidos cercanos); N (describe si los nódulos linfáticos regionales se ven afectados) y M (describe si hay metástasis).

Dentro del **estadio T** podemos diferenciar las siguientes categorías:

- T1: Tumor no evidente clínicamente, no palpable ni visible mediante técnicas de imagen. Dentro de este, podemos establecer una serie de subgrupos T1a, T1b y T1c.
- T2: Tumor confinado en la próstata. De la misma forma que antes, se establecen subgrupos. T2a (donde el tumor abarca la mitad de un lóbulo o menos), T2b (el tumor abarca más de la mitad de un lóbulo pero no ambos lóbulos); T2c (El tumor abarca ambos lóbulos).
- T3: Tumor que se extiende más allá de la cápsula prostática. Según cómo sea esta extensión podemos diferenciar: T3a (extensión extracapsular unilateral o bilateral) o T3b (tumor que invade la/s vesícula/s seminal/es).
- T4: Tumor fijo o que invade estructuras adyacentes distintas de las vesículas seminales, como son el cuello vesical, esfínter externo, recto, músculos elevadores del ano y/o pared pélvica [39].

En el **estadio N** diferenciamos dos tipos denominados como N0 (lo que significa que el cáncer no se ha extendido a ningún ganglio linfático) y N1 (en el caso en el que el cáncer se haya extendido a uno o más ganglios linfáticos regionales de la pelvis, es decir próximos a la próstata).

En el **estadio M**, podemos encontrar dos clasificaciones: la M0 (que clasifica a un cáncer que no presenta metástasis a distancia) y la M1 (donde el cáncer presenta una extensión a distancia (fuera de la pelvis), como a otros ganglios linfáticos (como los periaórticos o mediastínicos), otros órganos como el hueso, pulmón, hígado o cerebro).

Normalmente tras determinar el estadio TNM, se combina con la información clínica de la escala Gleason y se engloba al paciente finalmente en un último estadio cuya nomenclatura se establece con números romanos que oscila del I (menos avanzado) al IV (más avanzado). Esto va a ser útil para determinar el tratamiento y pronóstico del paciente.

Según las guías prácticas clínicas sobre el tratamiento del cáncer de próstata [39], para establecer una correcta clasificación de este tumor, no debemos fijarnos solo en el estadio TNM, ya que en el caso de individuos con cáncer de próstata localizado no sería suficiente. Por ello, los subgrupos de riesgo o pronóstico se realizan en combinación con otros factores de riesgo conocidos como son el grado de PSA y la escala de Gleason, estableciéndose la clasificación de D'Amico [40].

Según esta clasificación, podemos diferenciar:

- Grupos de bajo riesgo; entendiéndose como aquellos en los que se cumplen los siguientes criterios: estadios T1c-T2a; Gleason <7 y PSA menor o igual a 10 ng/mL.
- Grupos de riesgo intermedio: estadios en el rango T2b, escala Gleason de 7 y valores de PSA por encima de 10 y menores o igual a 20 ng/mL.
- Individuos de alto riesgo: que corresponden con aquellos que poseen estadios de T3 o T4; Escala Gleason igual o superior a 8 y valores de PSA por encima de 20 ng/mL. [41].

### 3.2. GRADACIÓN GLEASON

Este tipo de clasificación se determina en base a las características microscópicas que presente el tumor y establecidas por un anatomopatólogo. Con ello, siempre nos estaremos refiriendo a una pérdida de la arquitectura normal del tejido (en cuanto a tamaño, forma y diferenciación de la glándula) [42].

La gradación del carcinoma prostático, se centra en las características arquitecturales del tejido que fueron nombradas por Dr. Donald F. Gleason se conoce como sistema de gradación de Gleason [6]. Se usa como medida de la agresividad de este cáncer y se basa en la apariencia de las células cancerosas que son clasificadas en una escala de 1 a 5 (Figura 1), o bien de valores de 1 a 9 (según la apariencia se les da un valor numérico de 1 a 5 compuesto por dos números de la forma 3+4=7). En este segundo tipo de expresión de la escala, valores de 4 o menores, sugieren un cáncer de crecimiento lento, mientras que

uno de siete o más es interpretado como de crecimiento más rápido. Esta gradación suele darse en combinación de dos números (gradación combinada de Gleason), de tal forma que cada uno indica los componentes principales del tumor. Así, los grados 2, 3 y 4 tienen características intermedias [43].

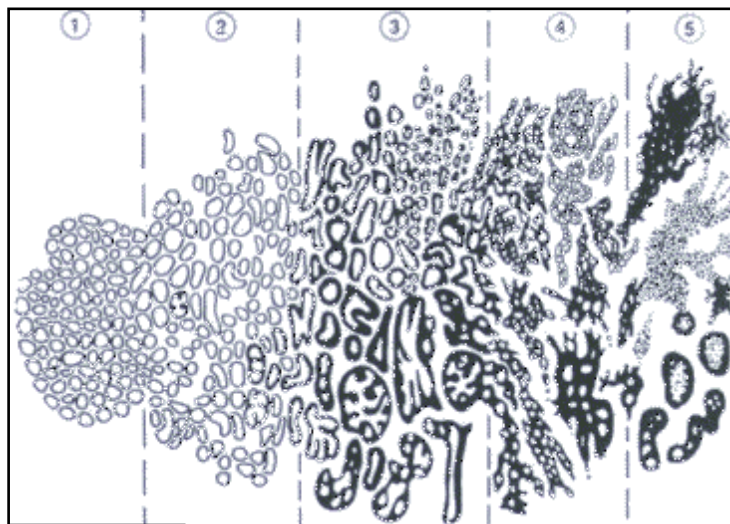


Figura 4: Representación anatomopatológica del estadio Gleason. Las células del margen derecho, son células con una forma poco definida y de distribución al azar que contrastan con las células del lado izquierdo que parecen totalmente homogéneas en forma y distribución. La zona central está ocupada por unas células de características intermedias entre las simétricas del margen izquierdo y las asimétricas e irregulares del derecho. Imagen tomada del artículo de O'Dowd [42].

## **4. MARCADORES PARA DETECTAR EL CÁNCER DE PRÓSTATA**

Los biomarcadores tumorales nos sirven como señal para poder detectar la existencia de determinados tumores facilitando una detección precoz y contribuyendo a un diagnóstico y tratamiento en las etapas tempranas del mismo. Podemos destacar dos tipos de marcadores: los negativos (se encuentran ausentes o en menor porcentaje de expresión en el tejido tumoral) y los positivos (aumentan su expresión en el tejido tumoral) [44]. El cáncer de próstata es una de las patologías que nos ofrece la posibilidad de ser detectada con una determinada precocidad por la existencia de marcadores tumorales positivos como el PSA. Sin embargo, cada vez se están describiendo más casos que nos demuestran la fragilidad de este marcador y la necesidad de buscar otros marcadores alternativos que palien este problema. De hecho, el PSA se sigue usando actualmente pero cada vez es más necesario, obtener un nuevo biomarcador que nos proporcione un mejor diagnóstico y pronóstico; la necesidad de obtener un nuevo biomarcador.

### **4.1. PSA**

El PSA, es una glicoproteína con actividad serín-proteasa producida en el epitelio prostático [45-47] cuyo gen se localiza en el cromosoma 19 (19q13.41) [44]. Tiene un peso de 34 kD y es una glicoproteína de cadena única de unos 237 aminoácidos que se produce casi exclusivamente por las células epiteliales prostáticas. Esta serín-proteasa, pertenece a la familia de las calicreínas [21].

Las medidas de los valores de PSA se realizan de forma rutinaria y son una herramienta útil para el manejo y tratamiento de pacientes afectados por esta patología [48,49]. Un valor de PSA de 4 ng/mL se considera como valor umbral, por encima del cual debería realizarse una biopsia prostática, aunque realmente la especificidad de este test es baja cuando el PSA está por debajo de valores de 10 ng/mL [50]. El problema que se plantea con el uso de este marcador está relacionado con la característica de que no sólo las células malignas lo producen, por lo que no es totalmente fiable como valor diagnóstico, pudiendo



crear falsos negativos y/o positivos. De hecho, se han observado concentraciones elevadas de PSA en hiperplasias benignas de próstata y otros tipos de prostatitis [51]; al igual que hay casos de varones con valores de PSA  $\leq 4$  ng/mL que padecen cáncer de próstata agresivo (Escala Gleason  $\geq 7$ ) [52]. A pesar de ello, no se dispone en la actualidad de otra herramienta que nos sirva de marcador, por lo que aun sabiendo las limitaciones del PSA, se sigue usando [53-56]. De hecho, se han realizado estudios en los que se comprueba que la eficacia de detectar el cáncer de próstata mediante el antígeno prostático (PSA) es poco específica cuando éste se encuentra en torno a los rangos de 2 and 10 ng/mL, encontrándose a pacientes a los que se les somete a biopsias innecesarias al encontrarse dentro de estos rangos de PSA [50].

Hay estudios que indican el pequeño valor de este marcador para diagnóstico temprano de esta patología. De hecho, en individuos con valores de PSA entre 4-10 ng/mL se han encontrado resultados de biopsia negativa en el 80% de los casos [44]. Sin embargo, en pacientes mayores de 70 años, valores de 5 ng/mL pueden considerarse normales. Para mayor detalle ver información de rangos de PSA y edad descritos por Oesterling en 1993 en la Tabla 1.

Tabla 1. Rango normal de PSA y edad.

Edad	Rango normal de PSA (ng/mL)
40 – 49	0 – 2.5
50 – 59	0 – 3.5
60 – 69	0 – 4.5
70 – 79	0 – 6.5

Aunque no siempre cifras de PSA en los rangos de normalidad descartan la presencia de cáncer, si suelen coincidir en estos casos con tumores circunscritos a la glándula y por lo general poseen un mejor pronóstico. Para evitar problemas, cuando nos encontramos con niveles de PSA entre 4 y 10 ng/mL se amplían los análisis incluyendo conceptos como densidad de PSA (relaciona el valor del PSA con el volumen prostático, valores  $>0.15$  indican sospecha de CP y  $< 0.15$  son más compatibles con HBP.), velocidad de PSA (aumentos del PSA  $> 0.75$  ng/mL. en un año indican sospecha de CP), PSA libre

(cociente PSA libre/PSA total: relación entre el PSA que circula libre de la proteína transportadora y el PSA unido a ella. Valores  $> 0.25$  son compatibles con HBP, y  $< 0.20$  sospechosos de CP), PSA según edad, lo que permitiría evitar biopsias prostáticas innecesarias [57,58].

Ante estos resultados se han planteado como recomendables seguir las siguientes pautas:

- Un PSA  $> 10$  ng/mL. obliga a la realización de una biopsia guiada por ecografía.
- Si el PSA está entre 4 y 10, hay que valorar el cociente PSA libre / total y la velocidad del PSA. Si son anormales, estará indicada la biopsia prostática.
- En los pacientes tratados con Inhibidores de la 5 Alfa reductasa las cifras de PSA se reducen a la mitad a partir de los 6 meses de tratamiento[58,59] Por lo tanto a partir del 6º mes de tratamiento se debe de multiplicar por 2 la cifra de PSA para conocer la cifra real de PSA. La cifra obtenida mantiene la sensibilidad y especificidad del PSA obtenido.

Según las Guías Europeas en CP [58,59] no es necesario la realización de una detección precoz en todos los individuos sino que los mejores candidatos para este análisis serían:

Todos los varones que tengan antecedentes familiares de primer grado de cáncer de próstata. El riesgo es mayor si ha aparecido el cáncer en edades inferiores a los 60 años, existen 2 o más miembros familiares de 1º grado afectados o tres generaciones consecutivas. Por ello, se estipula comenzar a los 45 años si hay un antecedente familiar de 1º grado con CP. O a los 40 años si existen 2 o más antecedentes familiares de 1º grado de CP.

- En varones de raza negra comenzar con el *screening* a los 45 años.
- En varones mayores de 70 años o esperanza de vida  $<$  a 10 años, no se recomienda la realización de una estrategia diagnóstica precoz.

## 4.2. BIOMARCADORES

Existen múltiples estudios en los que se analizan distintos tipos de moléculas o sustancias como posibles marcadores efectivos para esta patología [44].

- ✓ HPC1 (RNASEL) del que se han descrito distintas variantes posibles causantes del cáncer de próstata.
- ✓ PCA3 (Antígeno prostático 3) codificado por un gen que se localiza en el cromosoma 9, formado por cuatro exones y tres intrones. Parece que la causa más frecuente en el cáncer de próstata es el splicing del segundo exón.
- ✓ TMPRSS2: ETS se ha descrito como muy común en individuos de estadio bajo o medio de esta patología, mientras que prácticamente inexistente en los de elevada riesgo o desarrollo del tumor.
- ✓ GSTP1 (enzima de la familia Glutathion-S-transferasa), su papel no está claro, algunos estudios indican que se produce metilación del gen GSTP1, otros indican una disminución de la expresión de este gen.
- ✓ AMACR ( $\alpha$ - metilacil-CoA racemasa) parece que cuando los rangos de PSA se encuentran entre 4-10 ng/mL, se produce un aumento de los anticuerpos antiAMACR. Esto podría ser clave para diferenciar individuos sanos de afectados. Sin embargo, se han encontrado sobreexpresiones en individuos sanos que hacen descartar esta enzima como buen marcador.
- ✓ GOLPH2 (Golgi fosfoproteína 2) es una clase de proteína de membrana del aparato de Golgi, estudios preliminares parecen demostrar que los niveles de expresión aparecen elevados en cáncer de próstata comparados con los que presenta un tejido normal.
- ✓ EPCA es una proteína de matriz nuclear, algunos estudios han demostrado que determinadas proteínas de matriz nuclear pueden verse presentes en todo tipo de células y estados fisiológicos, mientras que otras son específicas de tejido y estado celular. Por estas características, se pensó en estas proteínas como posible marcador de un evento tumoral, sin embargo deben de realizarse una mayor cantidad de

estudios para poder corroborar los resultados. Efectos similares ocurren con la Sarcosina, que aparece elevada en individuos afectados [44].

### 4.3. MARCADORES GENÉTICOS

El problema de la gran variabilidad de esta patología y de la existencia de una gran cantidad de factores epidemiológicos de riesgo, así como el diagnóstico a una edad avanzada (lo que hace complicado obtener muestras de ADN de varios individuos de la misma familia afectos), hace difícil poder diferenciar determinados marcadores genéticos específicos de este adenocarcinoma [60]. El uso de marcadores genéticos para detectar un tipo de cáncer no es una técnica ni altamente novedosa ni exclusiva del cáncer de próstata. Tal es el caso del uso de genes como BRCA1 y BRCA2 para el diagnóstico y prevalencia del cáncer de mama y ovario, donde determinadas mutaciones indican un mayor riesgo al desarrollo de esta patología [61].

Del mismo modo, se está realizando una búsqueda de marcadores que puedan reemplazar a la cistoscopia que se realiza para detectar el cáncer de vejiga. Sin embargo, parece que la citología sigue dando mejores resultados que el uso de marcadores como el BCLA-4 (proteína específica de la matriz nuclear en el cáncer de vejiga). El problema radica en que no se ha demostrado el uso de estos biomarcadores en pacientes de bajo riesgo y algunos son muy específicos de determinadas regiones del tracto urinario [62]. De igual forma, en el caso del cáncer colorrectal existen diversos tipos de marcadores, algunos de ellos con una mayor eficacia que otros dependiendo del tipo de patología concreta que se esté buscando. De este modo, podríamos enumerar: CEA (marcador sérico) que en combinación con otros factores pronósticos puede ser muy útil; marcadores genéticos como MSI, MLH1 y APC, con eficacia en la detección de la poliposis familiar múltiple y no polipósica respectivamente [63]. Encontramos numerosos análisis en distintos genes que se han encuadrado como elevado riesgo de susceptibilidad al desarrollo del cáncer de próstata. Destacamos como más relevantes al gen HPC1 (RNASEL), ELAC2 y MSR1, de los cuales hablaremos en profundidad en los capítulos siguientes.

#### **4.3.1. BRCA-1 y BRCA-2**

Existen gran cantidad de estudios que demuestran una clara asociación entre un aumento en el riesgo a desarrollar cáncer de próstata en individuos con mutaciones en estos genes. Muchos de los casos se han descubierto en estudios de familias con mutaciones en el gen BRCA-2 que han desencadenado un cáncer de mama y a su vez un riesgo aumentado en el cáncer de próstata. Estudios similares se han descrito en el gen BRCA1 [2]. Parece que en los casos de cánceres familiares existe una asociación entre los individuos portadores de mutaciones en BRCA2 y la presencia de un alto riesgo en cánceres de ovario, mama y próstata.

De hecho, ya se describen casos de asociación entre el cáncer de mama en familias con cáncer de próstata. En un estudio realizado en Islandia, los descendientes varones de pacientes con cáncer de mama presentan de 2 a 3 veces más de riesgo a padecer cáncer de próstata.

Estudios similares a los realizados han demostrado que los genes BRCA1 y BRCA2 aumentan el riesgo a padecer cáncer de próstata [64]. Se destacan principalmente mutaciones de tipo delección que afectan a individuos con cáncer de próstata, mutaciones 999del5 en poblaciones de Islandia y la mutación 6174delT en poblaciones de judíos Ashkenazi. En un estudio desarrollado en varios miembros afectados de unas familias con cáncer de mama en una población española, se ha descrito la mutación 5369delATTT (localizada en el exón 11 del gen BRCA2) que produce un codón de parada en la posición 1723 generando una función anormal del gen BRCA2 que causa la pérdida del extremo BRCA2 C-terminal. Tras finalizar el estudio, se encontraron individuos portadores de la mutación de los cuales unos estaban previamente diagnosticados de cáncer de mama y otros de próstata; mientras que otros no habían sido diagnosticados antes de finalizar el estudio. Sin embargo, no se pudo avalar ningún resultado de asociación con los datos que se poseían hasta el momento, aunque parece que esta mutación puede ejercer un papel importante en el desarrollo del cáncer de mama y de próstata [65].

#### 4.3.2. Gen CO1

El gen de la citocromo oxidasa 1 se localiza en el genoma mitocondrial y también se ha asociado con cáncer de próstata. Tras realizar la secuenciación de este gen, se ha encontrado que en la posición nucleotídica 6124 se produce un cambio de T a C, lo que provoca una sustitución aminoacídica Met74Thr. Este tipo de mutación produce una disminución de un 29% de la actividad de la citocromo oxidasa (de la cual el gen CO1 ocupa el núcleo catalítico de la misma), pero a su vez, se produce también un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno [66]. Aunque aún, es uno de los genes de los que queda más por describir, se estima establecido que entre un 11-12% de los pacientes con cáncer de próstata poseen mutaciones en el gen CO1 [67].

#### 4.3.3. Gen CHEK2

El gen CHEK2, se localiza en el cromosoma 22q12.1 y recibe este nombre por ser homólogo al gen CHK2 (gen de *checkpoint* de la levadura *S. pombe*). Su principal función es actuar como regulador *upstream* de p53 al igual que actuar en las rutas de señalización de ADN ATM dependiente. Este gen fue inicialmente conocido por presentar mutaciones que estaban localizadas en el síndrome de Li-Fraumeni. Los estudios realizados por Dong et al reflejaron una influencia de las mutaciones en el gen CHECK2 y el desarrollo en el cáncer de próstata [68]. Se han descrito de tal forma, mutaciones como 1100delC y Ile157Thr que aparecen en un porcentaje más elevado entre individuos afectados por cáncer de próstata que entre individuos controles [2].

#### 4.4. CAMBIOS EPIGENÉTICOS

Se han descrito modificaciones genéticas que se asocian con el desarrollo y progresión del cáncer de próstata; y cada vez más, se comprueba que los cambios epigenéticos tienen un papel importante en la iniciación y progresión del cáncer de próstata [3], por lo que se podrían destacar como herramienta de seguimiento del cáncer de próstata. La Glutathion S-transferasa p1 (GST-P1) y de igual forma, cualquier gen que posea promotores ricos en CpG se han descubierto metilados en casos de cáncer de próstata. De hecho, el gen de la GSTP-1 que pertenece a una familia enzimática implicada en la protección del ADN de radicales libres, se incluye cada vez más como un posible biomarcador del cáncer de próstata, ya que se ha detectado una metilación del mismo en el 84% de los casos de cáncer de próstata [69].

Se han descrito también casos, en los que los parámetros post-traduccionales como la acetilación y dimetilación de las proteínas histónicas H3 y H4 se han clasificado con grupos de distinto riesgo a padecer cáncer de próstata. Por lo que parece cada vez más claro que los mecanismos de regulación epigenética pueden jugar un papel importante en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata [70].

La importancia del fenómeno epigenético de la hipermetilación en el cáncer de próstata parece clara. Ejerce su efecto al modificar genes supresores de tumores como APC y RASSF1; genes receptores de estrógenos y andrógenos y genes apoptóticos como PYCARD, RPRM y GLIPR1. De la misma forma, cambios en las proteínas histónicas de tipo acetilación y metilación se han descrito en casos de cáncer de próstata. Por ejemplo, en la progresión del cáncer de próstata se ha detectado una sobreexpresión de enzimas modificadoras de histonas, como es el caso de la lisina dimetilasa 1A específica (KDM1A). Esta enzima, interacciona con el receptor de andrógenos promoviendo finalmente una dimetilación de las Histonas H3 lys9m1 y H3 lys9m2. Así mismo, se ha correlacionado KDM1A con un aumento en riesgo del cáncer de próstata [3].

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] F.J. Gálvez-Gastélum, A.S. Sandoval-Rodríguez, J. Armendáriz-Borunda, El factor de crecimiento transformante  $\beta$  como blanco terapéutico. *Salud Pública Méx.* 46(4) (2004) 341-350.
- [2] H. Mattila, Hereditary Prostate Cancer in Finland. Tampereen Yliopistopaino Oy-Juvenes Print. (2009) 1-116.
- [3] A.S. Perry, R.W. Watson, M. Lawler, D. Hollywood, The epigenome as a therapeutic target in prostate cancer., *Nat. Rev Urol.* 7 (2010) 668-680.
- [4] R. Rodríguez-Arnaiz, Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. 2011.
- [5] D.L. Kasper, E. Braunwald, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, Oncología y Hematología. Enfermedades hiperplásicas y malignas de la próstata. in: Kasper D.L., Braunwald E., Fauci A.S., Hauser S.L., Longo D.L., Jameson J.L. (Eds.), HARRISON. Principios de medicina interna. Mc Graw Hill, Mexico, 2005, pp. 609-621.
- [6] A. Stevens, J.S. Lowe, B. Young, 19. Aparato reproductor masculino. in: Stevens A., Lowe J.S., Young B. (Eds.), Wheater. Histopatología Básica. Elsevier, UK, 2006, pp. 224-231.
- [7] J. Ferris i Tortajada, J. García-i-Castell, O. Berbel-Tornero, J.A. Ortega-García. Factores de riesgo constitucionales en el cáncer de próstata., *Actas Urol Esp.* 35 (2011) 282-288.
- [8] R. Medina, Comparativo: resultados nacionales frente a la comunidad andaluza. Estudio Epidemiológico de estimación del cáncer de próstata en España (2010)., Registro Nacional de cáncer de próstata. (2010).
- [9] E. Dagan, Y. Laitman, N. Levanon, A. Feuer, A.A. Sidi, J. Baniel, et al., The 471delAAAG mutation and C353T polymorphism in the RNASEL gene in sporadic and inherited cancer in Israel, *Familial Cancer.* 5 (2006) 389-395.
- [10] C.M. Robbins, S. Hooker, R.A. Kittles, J.D. Carpten, EphB2 SNPs and Sporadic Prostate Cancer Risk in African American Men. *Plos One.* (2011).
- [11] E.A. Klein, Aspectos familiares y genéticos del cáncer de próstata. AUA UPDATE SERIES-LECCION 30, pp. 81-86.
- [12] Rush University Medical Center, Chicago, Illinois. Factores de Riesgo del Cáncer de Próstata.
- [13] J.F. Uribe Arcila. Cáncer de Próstata. ¿Por qué se produce el cáncer de próstata? Aproximación a un modelo genético y molecular, *Revista Urológica Colombiana.* XIV (2005) 25-37.



- [14] A.R. Azzouzi, A. Valeri, L. Cormier, G. Fournier, P. Mangin, O. Cussenot. Familial prostate cancer cases before and after radical prostatectomy do not show any aggressiveness compared with sporadic cases. *UROLOGY*. 61 (6) (2003) 1193-1197.
- [15] O. Bratt, Hereditary prostate cancer: clinical aspects. *J Urol*. 168(3) (2002) 906-913.
- [16] A. Velasco, Manual de Urología esencial. *Biología Molecular y cánceres urológicos*.
- [17] A.C. Young, R.A. Craven, D. Cohen, C. Taylor, C. Booth, P. Harnden, et al., Analysis of VHL gene alterations and their relationship to clinical parameters in sporadic conventional renal cell carcinoma, *Clinical Cancer Research*. 15 (2009) 7582-7592.
- [18] R.E. Banks, P. Tirukonda, C. Taylor, N. Hornigold, D. Astuti, D. Cohen, et al., Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer, *Cancer Res*. 66 (2006) 2000-2011.
- [19] J.M. Giménez-Bachs, A.S. Salinas-Sánchez, F. Sánchez-Sánchez, J.G. Lorenzo-Romero, M.J. Donate-Moreno, H. Pastor-Navarro, et al., Determination of vhl Gene Mutations in Sporadic Renal Cell Carcinoma, *Eur.Urol*. 49 (2006) 1051-1057.
- [20] G. Danaei, S. Vander-Hoorn, A.D. Lopez, C.J.L. Murray, M. Ezzati, Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet*. 366(9499) (2005) 1784-1793.
- [21] D.G. Bostwick, H.B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S.M. Ho, J. Landolph, et al., Human Prostate Cancer Risk Factors. *Cancer*. 101(10 Suppl) (2004) 2371-2490.
- [22] W.B. Isaacs, J. Xu, Linkage Studies of Prostate Cancer Families to Identify Susceptibility Genes. Second Edition ed., Human Press Inc, Totowa, New Jersey, 2007.
- [23] R.E. Anglade, R.K. Babayan. Race, Ethnicity, Religion, Marital Status and Prostate Cancer in the USA. *Prostate Cancer: Science and Clinical Practice*, 2003, pp. 121-127.
- [24] A. Quaglia, S. Parodi, P. Grosclaude, C. Martinez-Garcia, J.W. Coebergh, M. Vercelli, Differences in the epidemic rise and decrease of prostate cancer among geographical areas in Southern Europe: an analysis of differential trends in incidence and mortality in France, Italy and Spain. *European Journal of Cancer*. 39 (2003) 654-665.
- [25] J. Ferlay, F. Bray, P. Pisani, D.M. Parkin, *GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide*, version 1.0. IARC CancerBase. 5 (2001) x-x.
- [26] M. Landau-Ossondo, N. Rabia, J. Jos-Pelage, L.M. Marquet, Y. Isidore, C. Saint-Aime, et al. Why pesticides could be a common cause of prostate and breast cancers in

the French Caribbean Island, Martinique. An overview on key mechanisms of pesticide-induced cancer. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 63 (2009) 383-395.

[27] E.L. Giovannucci, Y. Liu, M.F. Leitzmann, M.J. Stampfer, W.C. Willett, A Prospective Study of Physical Activity and Incident and Fatal Prostate Cancer. *ARCH INTERN MED*. 165 (2005) 1005-1010.

[28] M.S.W. Willis, F.H. Wians-Jr. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clinica Chimica Acta*. 330 (2003) 57-83.

[29] J.M. Chan, P.H. Gann, E.L. Giovannucci. Role of diet in prostate cancer development and progression. *J. Clin. Oncol*. 23 (2005) 8152-8160.

[30] V. Venkateswaran, L.H. Klotz. Diet and prostate cancer: mechanisms of action and implications for chemoprevention. *Nat. Rev. Urol*. 7 (2010) 442-453.

[31] P. Terry, P. Lichtenstein, M. Feychting, A. Ahlbom, A. Wolk. Fatty fish consumption and risk of prostate cancer. *The Lancet*. 357 (2001) 1764-1766.

[32] A. Jemal, R. Siegel, J. Xu, E. Ward, Cancer statistics., CA, *Cancer J Clin*. 60(5) (2010) 277-300.

[33] E. Deutsch, L. Maggiorella, P. Eschwege, J. Bourhis, J.C. Soria, B. Abdulkarim, Environmental, genetic, and molecular features of prostate cancer. *Lancet Oncol*. 5 (2004) 303-313.

[34] I.J. Powell, C.H. Bock, J.J. Ruterbusch, W. Sakr. Evidence supports a faster growth rate and/or earlier transformation to clinically significant prostate cancer in black than in white American men, and influences racial progression and mortality disparity. *J Urol*. 183 (2010) 1792-1796.

[35] Centros para el control y prevención de enfermedades. (CDC), Cáncer de próstata.

[36] J.R. Smith, J. Carpten, O. Kallioniemi, et al, Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 revealed by a genome-wide search. *Science*. 274 (1996) 1371-1374.

[37] Cancer Research UK, Geographic variation in prostate cancer incidence. *Prostate Cancer*, Cancer Research UK. 2011 (2010).

[38] A. Heidenreich, M. Bolla, S. Joniau, M.D. Mason, V. Matveev, N. Mottet, et al., Guidelines on Prostate Cancer. *EUA(European Urology Association)* ed. 2010.

[39] Guía de práctica clínica sobre tratamiento de cáncer de próstata. *Guías de práctica clínica en el SNS*. 29-31.

- [40] D'Amico, a. et, Biochemical outcome after radical prostatectomy, external beam radiation therapy, or interstitial radiation therapy for clinically localized prostate cancer. *JAMA*. 280 (1998) 969-975.
- [41] L. Martinez, Manual de Urología esencial. Cáncer de próstata. 2011.
- [42] G.J. O'Dowd, R.W. Veltri, M.C. Miller, S.B. Strum, The Gleason Score: A Significant Biologic Manifestation of Prostate Cancer Aggressiveness On Biopsy. *PCRI Insights*. 4 (2001).
- [43] W. Dyckes, Cáncer de próstata. 2011 (2006).
- [44] D.L. Cao, X.D. Yao, Advances in biomarkers for the early diagnosis of prostate cancer. *Chinese Journal of Cancer*. (2009) 229-233.
- [45] M.C. Wang, L.A. Valenzuela, G.E. Murphy, T.M. Chu. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol*. 17 (1979) 159-163.
- [46] H. Yu, E.P. Diamandis, D.J.A. Sutherland. Immunoreactive prostate-specific antigen levels in female and male breast tumors and its association with steroid hormone receptors and patient age. *Clin Biochem*. 27 (1994) 75-79.
- [47] R. Nadler, P. Humphrey, D. Smith, W. Catalona, T. Ratliff. Effect of inflammation and benign prostatic hyperplasia on elevated serum prostate-specific antigen levels. *J Urol*. 154 (1995) 407-413.
- [48] D.A. Ambruster. Prostate-specific antigen: biochemistry, analytical methods, and clinical application. *Clin Chem*. 39 (1993) 181-195.
- [49] H.C. Ruckle, G.C. Kleee, J.E. Oesterling. Prostate-specific antigen: concepts for staging prostate cancer and monitoring response to therapy. *Mayo Clin Proc* 1994, 69, 69-79. *Mayo Clin Proc*. 69 (1994) 69-79.
- [50] A.W. Roddam, M.J. Duffy, F.C. Hamdy, A.M. Ward, J. Patnick, C.P. Price, et al., Use of Prostate-Specific Antigen (PSA) Isoforms for the Detection of Prostate Cancer in Men with a PSA Level of 2-10 ng/ml: Systematic Review and Meta-Analysis. *European urology*. 48 (2005) 386-399.
- [51] P.S. Bunting. A guide to the interpretation of serum prostate specific antigen levels. *Clin. Biochem*. 28 (1995) 221-241.
- [52] K. Miller, P. Abrahamsson, K. Akakura, F.J. Debruyne, C.P. Evans, L. Klotz, The Continuing Role of PSA in the Detection and Management of Prostate Cancer. *European Urology Supplements*. 6 (2007) 327-333.
- [53] W.J. Catalona, D.S. Smith, T.L. Ratliff. Measurement of prostate-specific antigen in serum as a screening test for prostate cancer. *New England Journal of Medicine*. 324 (1991) 1156-1161.

- [54] F. Labrie, A. DuPont, R. Suburu. Serum prostate specific antigen as pre-screening test for prostate cancer. *Urol.* 3-147 (1992) 846-852.
- [55] M.K. Brawer, M.P. Chetner, J. Beatie, D.M. Buchner, R.L. Vessella, P.H. Lange. Screening for prostate carcinoma with prostate specific antigen. *Urol.* 3-147 (1992) 841-854.
- [56] W.J. Catalona, J.P. Richie, F.R. Ahmann. Comparison of digital rectal examination and serum prostate specific antigen in the early detection of prostate cancer: results of a multicenter clinical trial of 6,630 men. *Urol.* 3-151 (1994) 1283-1290.
- [57] M.B. Garnick, Prostate cancer: Screening, diagnosis, and management, *Ann.Intern.Med.* 118 (1993) 804-818.
- [58] A.M.Y. Nomura, L.N. Kolonel, Prostate cancer: A current perspective, *Epidemiol.Rev.* 13 (1991) 200-227.
- [59] American Urological Association, Prostate-Specific Antigen Best Practice Statement: 2009 Update, AUA. (2009) 1-81.
- [60] J. Simard, M. Dumont, D. Labuda, D. Sinnett, C. Meloche, M. El-Alfy, et al., Prostate cancer susceptibility genes: Lessons learned and challenges posed, *Endocr.Relat.Cancer.* 10 (2003) 225-259.
- [61] Z.K. Stadler, E. Salo-Mullen, S.M. Patil, M.C. Pietanza, J. Vijai, E. Saloustros, et al., Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Ashkenazi Jewish Families With Breast and Pancreatic Cancer. *Cancer.* (2011) 1-7.
- [62] M. Tinzi, M. Marberger, Urinary Markers for Detecting Bladder Cancer. *EAU Update Series.* 1 (2003) 64-70.
- [63] M.J. Duffy, A. Van-Dalenc, C. Haglund, L. Hanssone, E. Holinski-Federf, R. Klapdorg, et al., Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use. *European Journal of Cancer.* 43 (2007) 1348-1360.
- [64] S.M. Edwards, D.G.R. Evans, Q. Hope, A.R. Norman, Y. Barbachano, S. Bullock, et al., Prostate cancer in BRCA2 germline mutation carriers is associated with poorer prognosis, *Br.J.Cancer.* 103 (2010) 918-924.
- [65] J. Salgado, J.M. Aramendia, C. Gutierrez, C. Gil, M. Robles, J. García-Foncillas, A novel BRCA2 mutation that segregates with breast and prostate cancer in a Spanish family, *Breast Cancer Res.Treat.* 121 (2010) 219-220.
- [66] R. Arnold, S. O'Hearn, D. Wallace, H. Yi, E.S.C. Wright, J. Petros, Functional analysis of a rare mutation of mitochondrial dna found in a prostate cancer., *The Journal of urology.* 183(4) (2010) e87.

- [67] J.A. Petros, A.K. Baumann, E. Ruiz-Pesini, M.B. Amin, C. Qi Sun, J. Hall, et al., mtDNA mutations increase tumorigenicity in prostate cancer, *PNAS*. 102 (2005) 719-724.
- [68] X. Dong, L. Wang, K. Taniguchi, X. Wang, J.M. Cunningham, S.K. McDonnell, et al., Mutations in CHEK2 associated with prostate cancer risk, *Am.J.Hum.Genet.* 72 (2003) 270-280.
- [69] B. Djavan, A. Kazzazi, L. Dulabon, M. Margreiter, A. Farr, M.J. Handl, et al., Diagnostic Strategies for Prostate Cancer, *European Urology, Supplements*. 10 (2011) e26-e37.
- [70] P.G. Febbo, Genomic approaches to outcome prediction in prostate cancer, *Cancer*. 115 (2009) 3046-3057.

**OBJETIVOS / OBJECTIVES**

## OBJETIVOS

- Asociar marcadores genéticos, incluidos en los genes RNASEL, MSR1 y ELAC2, a características clínicas presentes en pacientes con cáncer de próstata, tratando de establecer un patrón de evolución de la enfermedad.
- Asociar los distintos haplogrupos mitocondriales con el proceso canceroso prostático, principalmente por el análisis mediante secuenciación de las regiones hipervariables 1 y 2 (HV1 y HV2) del genoma mitocondrial.
- Evaluar la influencia poblacional con una variante genética que nos aporte información sobre la localización geográfica de los pacientes de este cáncer y establecer de esta forma un estudio más robusto para el adenocarcinoma prostático debido a la gran variabilidad geográfica del mismo.
- Diseñar y desarrollar biomarcadores que nos ofrezcan información pronóstica, diagnóstica o predictiva eficaz para el cáncer de próstata, mejorando la especificidad de los que se usan en la actualidad.

## OBJECTIVES

- Search for some good genetic biomarkers among the RNASEL, ELAC2 and MSR1 genes that link prostate cancer with specific clinical parameters.
- Link the main function of mitochondrial haplogroups related to prostate cancer through the analysis of hypervariable regions 1 and 2 (HV1 and HV2) of D-loop in the mitochondrial genome.
- Evaluate the population influence with a genetic variable that provides geographical information about the patients of prostate cancer patients and improve the analysis of this cancer due to its high variability among the different geographical areas all around the world.
- Design and develop biomarkers that offer us an efficient prognosis, diagnosis and predictive information in prostate cancer, improving the specificity of the ones used at present.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. PACIENTES Y CONTROLES

Para el diseño de este proyecto se seleccionaron dos cohortes: los pacientes o individuos afectados por cáncer de próstata y los controles o individuos no afectados. Debido al tipo de patología que se analizó, la población de estudio está compuesta sólo de individuos de sexo masculino en ambos casos. Tanto la cohorte de controles como la de pacientes, provienen del área de Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La selección del grupo de estudio se realizó por criterios clínicos y se completó mediante encuestas a los pacientes en los que se incluyó el consentimiento informado para la realización de todos los tipos de análisis que se han derivado de esta tesis doctoral.

### Selección de los Pacientes

Los hombres que forman parte de este grupo fueron analizados por el urólogo, que tuvo en cuenta parámetros importantes para este tipo de cáncer como son el PSA, la escala T y la escala de Gleason. Dentro de estas características clínicas todos los individuos considerados como pacientes poseen un valor de PSA mínimo de 5.7 ng/mL pudiendo encontrar valores que oscilan en torno a 100 y 200 ng/mL e incluso algún individuo con valores muy elevados de PSA (2.100 ng/mL). El valor medio de PSA en la cohorte de pacientes es de 38 ng/mL. Los valores de la escala de Gleason oscilan entre valores mínimos de 4 a valores máximos de 10; con un valor medio de 6 en todo el grupo de pacientes. Dentro del estadio del tumor encontramos la presencia de los cuatro tipos de estadios posibles (A, B, C y D); siendo la mayor parte de los individuos del estadio B (63%) y C (30%).

Debido a la variabilidad geográfica de la incidencia de este tumor, se han realizado encuestas en las que se recabó información del lugar de nacimiento de los individuos. Esto ha permitido acotar el área de estudio a la región Sur de España y realizar un primer abordaje genético en esta área geográfica. En este grupo de pacientes se incluyen a varones adultos recientemente diagnosticados de cáncer de próstata, confirmado con pruebas anormales tanto en valores séricos de PSA como con síntomas en el tracto urinario bajo.

Este estudio se ha centrado en el cáncer de próstata esporádico, con varones caucásicos con una edad media de 66.4 años, existiendo varones de edades tempranas 48 y 51 años, así como con edades más avanzadas comprendidas entre 79 y 85 años. Cumpliendo estos criterios se ha conseguido un número de 231 pacientes para los cuales se han realizado una serie de análisis.

### **Selección de los Controles**

Hombres caucásicos sanos (n= 100) de la misma región geográfica y sin historial de cáncer de próstata fueron tomados como controles. Todos estos individuos se corresponden con pacientes que acudían a la consulta por posibles problemas de displasia renal a los cuales se les hacían análisis de PSA y exploración rectal para descartar un posible cáncer de próstata. Todos ellos presentaban valores de PSA considerados dentro del rango normal, es decir, por debajo de 4ng/mL y unos valores de edad similares a los de la cohorte de pacientes (menores de 69 y edades entre 70-79 años). Por tanto, el grupo control está formado por individuos de una edad avanzada (oscilando de los 60-65 años), sin antecedentes familiares y sin historial clínico característico de cáncer de próstata. Ya que el cáncer de próstata se presenta normalmente en varones de una edad superior a 40 años y la frecuencia aumenta después de los 50 años, con este grupo de edad (60-65 años) cubrimos un rango de pacientes que se encuadran afectados de cáncer de próstata.

## Características clínicas de Pacientes y Controles

Al realizar la toma de muestras de los pacientes, se registraron los parámetros reflejados en la Tabla 1. Cabe destacar, que toda la población de estudio está confinada a la población andaluza. Esta característica es muy relevante ya que en esta patología existe una gran variabilidad de tasas de incidencia en función de la región de procedencia de la población. Se cree que la localización geográfica y origen son de suma importancia en múltiples factores de riesgo como la alimentación, diferencias genéticas y distintos factores de exposición que se reflejan en un mayor riesgo en unas poblaciones con respecto a otras a padecer este adenocarcinoma [1]. Estudios previos relacionan el origen geográfico del paciente con una mayor tasa de incidencia y diferencian según este origen, su seguimiento médico y tratamiento. De hecho, si al 96% de los pacientes diagnosticados de cáncer de próstata se les estima una esperanza de vida de aproximadamente 5 años tras su diagnóstico, existen variaciones en el tiempo de supervivencia relacionadas con la edad de diagnóstico, etnia (mayor supervivencia en los grupos poblacionales de origen europeo que aquellos que tienen origen africano), estadio del cáncer en el momento del diagnóstico así como factores socioeconómicos [2]. La etnia parece destacarse como uno de los factores etiológicos más importantes en esta patología, por ello, este estudio se centra en la población del Sur de Europa (población europea andaluza). La población de estudio está compuesta por individuos residentes en la zona del Sur de España, Andalucía. Por tanto, el estudio se ciñe a una población de etnia blanca, europea confinada en un área concreta del Suroeste Europeo.

La edad en el momento del estudio se escogió como un factor que nos podía ofrecer información sobre la agresividad de esta patología. La edad media de aparición de este cáncer es de 70-79 años. Sin embargo como podemos ver en la tabla, existen casos en los que se presentó el cáncer en edades inferiores así como superiores. Con estos valores se quiere encontrar algún patrón genético diferente en edades de aparición más tempranas de este cáncer con respecto a los rangos normales. Se sabe que la frecuencia del adenocarcinoma

prostático (al igual que la hiperplasia benigna) tiene un aumento de frecuencia con la edad llegando a alcanzar valores superiores al 90% de incidencia en edades por encima de los 90 años. Del mismo modo, que al avanzar la edad se produce un mayor daño en el ADN que se puede deber a cambios causados por estrés oxidativo, reacciones ROS que no funcionan tan correctamente al avanzar la edad [1].

Tabla 1: Información clínica pacientes y datos de controles.

<b>Variables</b>	<b>Pacientes No. 231</b>	<b>(%)</b>	<b>Controles No. 100</b>	<b>(%)</b>
<b>Edad de estudio</b>				
<69	171	74.03	88	88
70-79	49	21.21	12	12
>80	11	4.76		
<b>Estadío T</b>				
T1	25	8.5	NA	NA
T2	92	37.8	NA	NA
T3	88	37.5	NA	NA
T4	26	16.2	NA	NA
<b>Estadío N</b>				
N0	187	63.2	NA	NA
N1	44	36.8	NA	NA
<b>Estadío M</b>				
M0	170	76.3	NA	NA
M1	61	23.7	NA	NA
<b>Escala Gleason</b>				
2-6	107	46.2	NA	NA
7-8	98	45	NA	NA
9-10	26	8.8	NA	NA
<b>Niveles de PSA (ng/mL)</b>				
<10	49	23.3	NA	NA
10-19.99	51	23	NA	NA
>20	110	46.5	NA	NA
>100	21	7	NA	NA

NA: No aplicable.

El estudio empezó en 2007 y finalizó parcialmente en 2011. Todas las muestras fueron procesadas bajo consentimiento informado de los individuos que han participado en el estudio y mediante la aprobación del comité ético-científico del hospital.

Tanto las muestras de controles como las de pacientes han sido tomadas de dos formas: hisopado de las células epiteliales de la mucosa bucal y venopunción, obteniendo muestras de sangre periférica.

### **Normas éticas en el manejo de muestras de ADN humanas**

Al trabajar con muestras biológicas humanas, se deben de tener en cuenta unas consideraciones éticas relevantes. Entre las normas básicas, se han de destacar [3]:

- Codificación de muestras de acuerdo a los objetivos asistenciales y/o de investigación.
- Registro en un sistema informático mediante bases de datos en las que se almacena la información correspondiente a código y todos los datos de la muestra.
- Almacenamiento de las muestras de acuerdo a los objetivos primarios de la investigación.
- Obtención del consentimiento informado como requisito indispensable en la adquisición de la muestra y estructuración del mismo de acuerdo a los objetivos del trabajo a realizar. (Ver en anexo un modelo tipo de hoja de Consentimiento Informado).
- Solo en determinados casos, se requieren a la vez la existencia de un Comité de Ética Institucional que vele por el fiel cumplimiento de los principios éticos de los seres humanos en cada país. Como son, la *Declaración de Helsinki* de la Asociación Médica Mundial, establece los principios éticos para las investigaciones médicas de seres humanos [4]; y las *Guías Operacionales para Comités de Ética* que evalúan la Investigación Biomédica por la Organización Mundial de la Salud en el 2000 [5].

## 1. EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras de partida, tanto los hisopos bucales como las muestras de sangre, fueron obtenidas mediante extracción orgánica por fenol/cloroformo/alcohol isoamílico y proteinasa K (ver protocolo completo en el ANEXO 1 de este capítulo). Esta técnica nos permite obtener ADN de una gran pureza así como, grandes cantidades del mismo. Posteriormente el ADN extraído se purificó varias veces mediante el uso de Amicon<sup>®</sup> 100 (Millipore), con el objetivo de intentar eliminar mediante lavados con agua estéril los posibles restos proteicos que hayamos arrastrado en el método de extracción. Finalmente, se recuperó el ADN en un volumen de 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O del que se tomó un extracto para cuantificar.

## 2. CUANTIFICACIÓN

La cuantificación del ADN se realiza siempre como paso previo a la amplificación para ver la cantidad y calidad del ADN que posteriormente se amplificará.

Como método básico de cuantificación se usan geles de agarosa a una concentración de 0.8% [6].

Este análisis es tanto cuantitativo (ya que la intensidad de la banda es directamente proporcional a la cantidad de ADN de la muestra); como cualitativo, en el caso de ADN de baja calidad o degradado, se puede observar una banda de degradación en lugar de una única banda clara.

## 3. AMPLIFICACIÓN

### Amplificación del gen RNASEL

Para el estudio de este gen nos hemos centrado en la región del Exón 1 y 3. Debido al gran tamaño del Exón 1, se ha optado por dividirlo en tres

regiones (denominadas como Exón 1-1, Exón 1-2 y Exón 1-3) y de esta manera cubrir toda la región del Exón 1 (para más información ver Tabla 2) diseñando los primers mediante el programa Primer Express. Se ha optimizado la amplificación en torno a una cantidad de ADN de 5ng.

Tabla 2. Primers del gen RNASEL y secuencia.

<b>PRIMERS</b>	<b>Secuencias del primer (5'→3')</b>
<b>Exón 1-1 (F) -(1-377)</b>	TGGTAGCAGGTGGCATTTC
<b>Exón 1-1 (R) -(1-377)</b>	AAGCCATAAAAATCACACTCA
<b>Exón 1-2 (F) -(449-848)</b>	AATGTGAATTTGAGGCGAAAG
<b>Exón 1-2 (R) -(449-848)</b>	AGTTCAACAGCAAGCAGC
<b>Exón 1-3 (F) -(1070-1459)</b>	ATACCGCCCTATGATTGGCA
<b>Exón 1-3 (R) -(1070-1459)</b>	GCAGATCCTGGTGGGTGTATC
<b>Exón 3 (F)- (1567-1772)</b>	CTTCCCTCCCTAACAAGCCT
<b>Exón 3 (R)- (1567-1772)</b>	GCACCACCTTACCCTTCC

(F): primer forward; (R): primer reverse. Los números entre paréntesis indican la región que se cubre con cada primer en los distintos exones.

Las condiciones para la amplificación (Figura 1) de la región de interés se realizaron mediante la AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) [7]. Para ello, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25µl. Los reactivos usados fueron los siguientes:

- 12.5µl de AmpliTaq Gold<sup>®</sup> PCR Master Mix.
- 0.5µl de primer F y 0.5µl de primer R (10 µM-concentración-).
- 5ng/µl de ADN extraído.
- H<sub>2</sub>O estéril hasta completar un volumen final de reacción de 25µl.



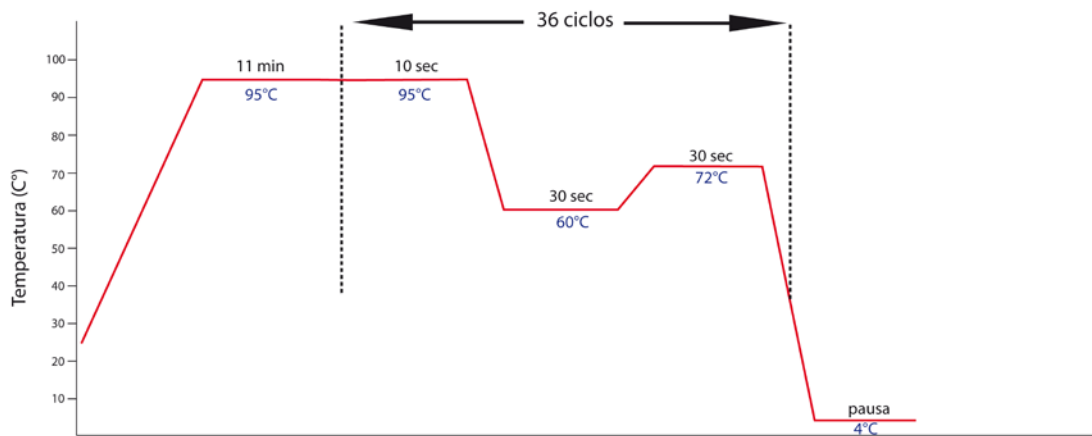


Figura 1: Condiciones de amplificación gen RNASEL.

En el proceso de amplificación, se añaden además de las muestras de interés dos controles, uno negativo (que sólo contiene agua, y por tanto no debe de existir amplificación en esta muestra) y otro positivo (estandarizado, que en condiciones óptimas debe de amplificar correctamente).

Tras finalizar el proceso de amplificación se debe evaluar si éste ha ocurrido de manera correcta en un gel de agarosa al 2%. En el caso de que las muestras y los controles hayan amplificado de forma correcta, debemos obtener una única banda de una cierta intensidad en las muestras y el control positivo.

## Amplificación de genes MSR1 y ELAC2

La mayor parte de las regiones de interés en estos genes se han procesado mediante la técnica de TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays [8]. Solamente las muestras que no se conseguían genotipar mediante la técnica de TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays se han procesado mediante la secuenciación clásica de Sanger.

Tabla 3. Primers de MSR1 y secuencia.

PRIMERS	Secuencias del primer (5'→3')
rs12718376	F- GGAATCGCTTTGCTTGACTGA R- TCCACCATCACCTCTCTCCC
rs918	F- GACAAGAAAATAAGCTCCCTGGTC R- ATTGCAAAATCTCCAATCCACA
rs1904577	F- CATTCAACATGCAAGGAGCAGT R- GTAAGGGTAAACAGAAGGCAATCAA
rs2127565	F- AATGCAACAGGGAAGAGTTCGA R- CCATGCCAAAGTAAAACATTGGA
rs3747531	F- TGGGACCTCGATCTCCTTTT R- TTGAGGCAATGTCATCCTCATT

Tabla 4. Primers de ELAC2 y secuencia.

PRIMERS	Secuencias del primer (5'→3')
rs11545302	F- GGTGGGACACAAACACAGCA R- CTCCTCAAAGCAAAGCAGGAGA
rs17552022	F-AGGGTGGCTTGCTTCTTCCT R- ATGATTCTGCAAATGCCT
rs5030739	F- GAAGACATTCTTGTGGCGCA R- GACTGTGGTGAGGGCACATTT
rs4792311	F- GCCCAGGAAGAAGGATCTGTT R- TGGCTGTCAGCTCACCTTGT

## Técnica de TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays

La mayor parte de las muestras analizadas para las regiones de MSR1 y ELAC2 fueron procesadas por esta técnica. El objetivo de este procedimiento es el mismo que se obtiene mediante una secuenciación, ya que lo que nos interesa es saber qué base ocupa el SNP en cuestión que estamos analizando. Es una técnica novedosa y optimizada; mediante una simple PCR a tiempo real

y con el uso de los reactivos de este protocolo se procede a genotipar el SNP de la región de interés.

Para ello, se usa TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix, al igual que se aplica en las condiciones normales de amplificación (Figura 2).

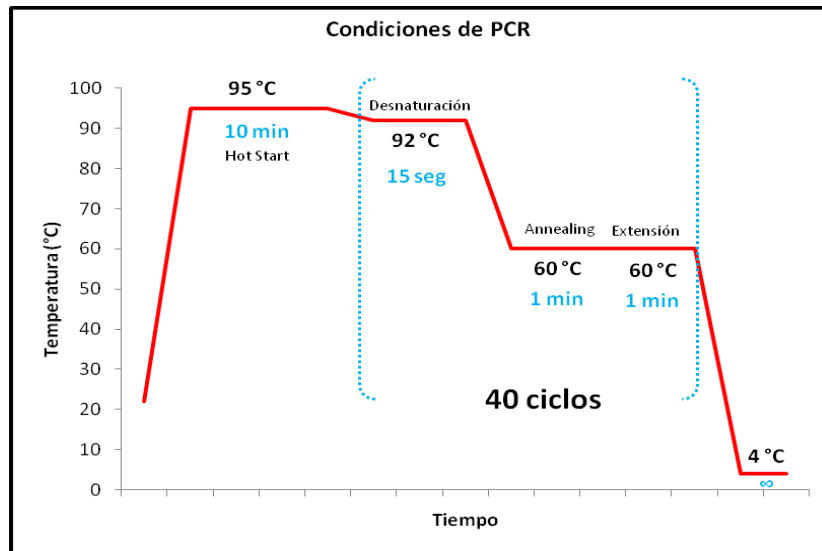


Figura 2: Condiciones TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays.

Se han empleado los siguientes reactivos:

- 1-20 ng de ADN purificado por pocillo.
- 20X SNP Genotyping Assay (contiene los primers F y R de secuencia específica a la región de interés).
- TaqMan Universal PCR Master Mix (2X).
- TaqMan<sup>®</sup> MGB, uno de ellos marcado con VIC (se asignará a un alelo, normalmente el salvaje) y otro con FAM (asignado al otro alelo).

El volumen de cada uno de estos componentes varía en función de que se realice en placas de 96 ó 384, y si se hace dejando secar el ADN (método seco) o bien añadiendo un determinado volumen del mismo sin dejarlo secar (método húmedo). Para mayor detalle ver Tabla 5 [8].

Tabla 5. Volúmenes de reactivos recomendados para la técnica SNP Genotyping.

Componentes	Técnica mojada de ADN		Técnica seca de ADN	
	µL/pocillo			
	384 pocillos	96 pocillos	384 pocillos	96 pocillos
TaqMan Universar PCR Master Mix	2.50	12.50	2.50	12.50
20X solución de trabajo SNP Genotyping Assay	0.25	1.25	0.25	1.25
H <sub>2</sub> O libre de DNAsas	-	-	2.25	11.25
Volumen total/pocillo	2.75	13.75	5.00	25.00

Tras el proceso de amplificación, se procede a la lectura a tiempo final mediante un sistema Real-Time PCR de Applied Biosystem (7900 HT Fast System). El software empleado como sistema de detección, usa las medidas de fluorescencia realizadas durante la lectura gráfica de la placa (Rn) y por extrapolación en los puntos obtenidos en cada medida (cada una de las muestras o pocillos) en la gráfica de fluorescencia se obtiene la diferenciación alélica. Para el correcto funcionamiento de este sistema, previamente se ha creado una placa en la que se asigna el documento SDS software de *allelic discrimination* (discriminación alélica). En cada visualización/discriminación alélica se coloca un control negativo (NTC) que sirve como control interno de amplificación así como de blanco para eliminar posibles reflejos a la hora de dibujar la curva patrón.

Un esquema gráfico del funcionamiento de la técnica se puede observar en la Figura 3 tomada del Manual TaqMan<sup>®</sup> SNP Genotyping Assays Protocol. Applied Biosystems.

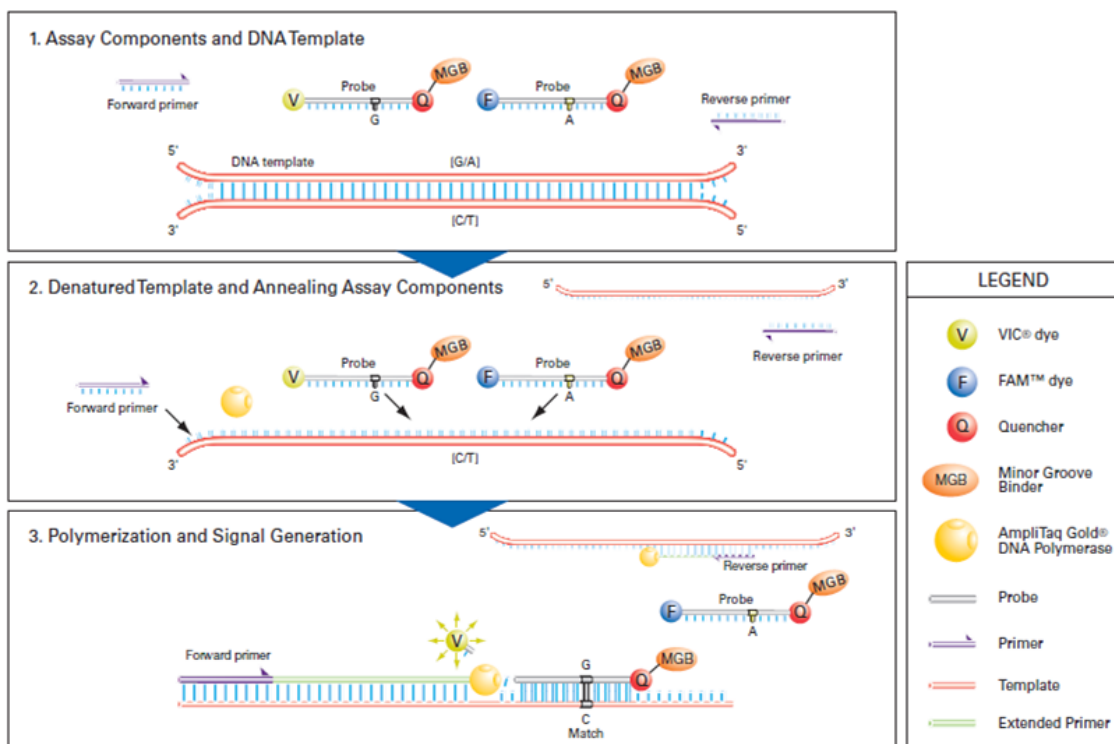


Figura 3. Técnica de SNP Genotyping (ensayo 5' nucleasa). Assay components and DNA template (Componentes del ensayo y ADN molde); Denatured template and annealing assay components (hebra molde desnaturizada y componentes del ensayo de annealing); Polymerization and signal Generation (proceso de polimerización y emisión de señal). Legend (Leyenda); VIC dye (marcador VIC); FAM dye (marcador FAM); quencher (inhibidor de fluorescencia); probe (sonda); minor groove binder (compuesto de unión al surco menor del ADN); extended primer (primer o cebador extendido).

Como se puede observar en la figura el *primer* complementario a la región que se quiere genotipar, tiene dos variedades en el punto SNP de interés, una unida al fluorocromo VIC y otra al FAM. De tal forma que, se puede observar bien fluorescencia derivada de VIC (correspondiente a homocigosis del alelo 1) o sólo fluorescencia del fluorocromo FAM (lo que implicaría homocigosis del alelo 2 en ese SNP) o ambos fluorocromos (VIC y FAM, en esa posición del SNP, lo que implicaría heterocigosis en dicho SNP).

### Amplificación del ADN mitocondrial

En todas las muestras, se ha amplificado la región HV1 completa (16.024 - 16.365) mediante los primers A1 y B1, con el kit AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA) [7]. En algunas de las muestras no

fue posible asignar los haplogrupos con esta información, por lo que se tuvo que recurrir a *primers* de la región HV2, C1 y D1. La amplificación se realizó en un termociclador GeneAmp System 2400 Biometra (T3 Thermocycler).

Las condiciones de amplificación se desarrollaron en un volumen final de 25  $\mu$ L. Los reactivos usados fueron los siguientes:

- 12.5 $\mu$ l de AmpliTaq Gold <sup>®</sup> PCR Master Mix (Applied Biosystems) por muestra.
- 0.5 $\mu$ l de cada primer (10 $\mu$ M).
- 1-2ng/ $\mu$ l de ADN extraído.
- H<sub>2</sub>O estéril hasta completar un volumen final de reacción de 25 $\mu$ l.

Tabla 6. Primers de mitocondrial y secuencia.

<b>PRIMERS</b>	<b>Secuencias de los primers (5'→3')</b>
<b>A1- L15996</b>	CTCCACCATTAGCACCCAAAGC
<b>B1- H16401</b>	TGATTTACGGAGGATGGTG
<b>C1- L48</b>	CTCACGGGAGCTCTCCATGC
<b>D1- H408</b>	CTGTTAAAAGTGCATACCGCCA

En el proceso de amplificación, se añaden como indicamos anteriormente, además de las muestras de interés, dos controles: uno negativo (que sólo contiene agua, y por tanto no debe de existir amplificación en esta muestra) y otro positivo (estandarizado, que en condiciones optimas debe de amplificar correctamente). Las condiciones de amplificación quedan esquematizadas en la Figura 4.

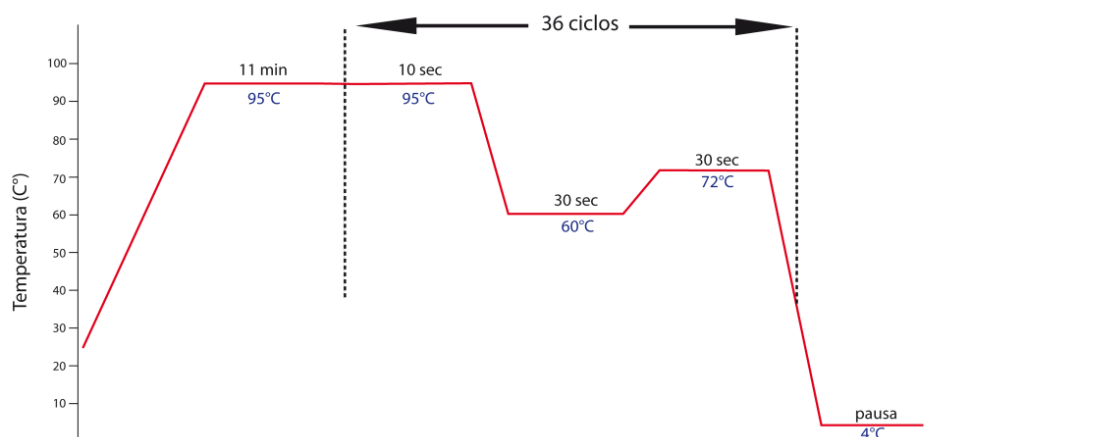


Figura 4. Condiciones de amplificación del ADN mitocondrial

Al igual que en el gen RNASEL, tras finalizar el proceso de amplificación se debe evaluar si éste ha ocurrido de manera correcta en un gel de agarosa al 2%.

#### 4. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE PCR

En el caso del material de amplificación que posteriormente se va a secuenciar, debemos purificarlo para eliminar los nucleótidos marcados (dNTPs) y primers que no se han utilizado en la reacción de PCR y que podrían interferir negativamente en la posterior reacción de secuenciación.

- *Purificación del producto de PCR RNASEL, MSR1 y ELAC2:*

En estos casos, se realiza la purificación mediante la incubación con 2 µl de ExoSap-it para la eliminación de los restos de primers. El sistema ExoSAP-IT consiste en dos enzimas hidrolíticas, la exonucleasa I (de E.coli) y la SAP (una fosfatasa alcalina de gamba, *Shrimp Alkaline Phosphatase*), ambas unidas en un buffer que permite eliminar los primers y dNTPs del producto de PCR que no nos interesan y nos interferirían en procesos posteriores.

El tratamiento con exonucleasa I degrada los primers de PCR residuales mientras que la SAP defosforila los dNTPs restantes. Tras la inactivación por calor de ambas enzimas puede utilizarse el producto de PCR para secuenciación automática. Los detalles sobre el procesamiento con esta enzima se pueden ver en el ANEXO II. En el protocolo de purificación de ExoSAP-IT, se realiza una incubación durante 30 minutos a 37°C que genera una incubación enzimática, por lo tanto, posteriormente se procede a la inactivación enzimática al someter las muestras a 80°C durante 15 minutos.

- *Purificación del producto de PCR mitocondrial:*

Para purificar el producto resultante de la amplificación del ADN mitocondrial, se emplean filtros Amicon® YM-100 (Millipore, Billerica, MA. USA) que retienen el ADN. Con un tamaño de poro 100 kDa, el ADN queda retenido en el filtro y a su vez se realizan varios lavados con H<sub>2</sub>O estéril. De esta forma,

el ADN queda retenido en la malla superior y los restos de sustancias que actuarían de inhibidores filtrarían al fondo del tubo. (Ver ANEXO III).

## 5. SECUENCIACIÓN

Mediante este procedimiento se pretende determinar o bien el orden exacto de los nucleótidos (en el caso del ADNmt) o bien conocer la presencia, ausencia o cambio de nucleótidos en una determinada posición. La técnica de secuenciación usada es la clásica del método de Sanger realizada mediante la aplicación del kit Big Dye v3.1 (Applied Biosystems).

Este método, se basa en la reacción de elongación mediada por una ADN polimerasa, con la peculiaridad de presencia de deoxinucleótidos (ddATP, ddCTP, ddTTP, ddGTP), marcados con fluorocromos y alterados en la región 3' por la falta de un OH. Esto produce una parada de la reacción de secuenciación al unirse a este ddNTP.

La preparación de la reacción de secuenciación se llevó a cabo en un volumen final de 10 $\mu$ l, de los cuales:

- 2 $\mu$ l de kit de secuenciación BigDye v3.1.
- 3 $\mu$ l de primer (1  $\mu$ M).
- 3 $\mu$ l de producto de PCR purificado (ADN).
- 2 $\mu$ l de buffer 10x BigDye Terminator v.3.1 kit.

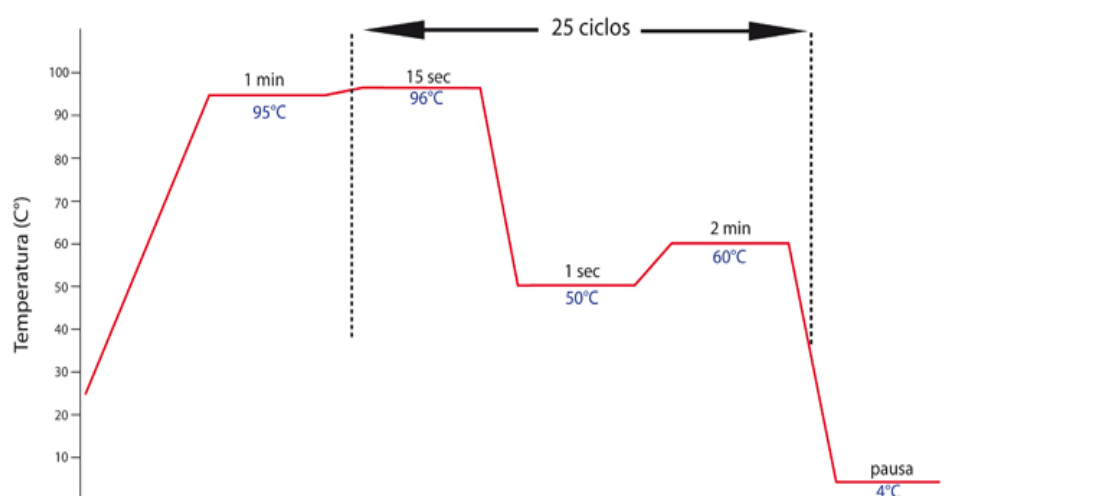


Figura 5. Esquema del proceso de secuenciación.



## 6. PURIFICACIÓN DEL PRODUCTO DE SECUENCIACIÓN

Mediante este paso se pretende la purificación del producto de secuenciación con el objetivo de eliminar el exceso de *primers* y terminadores (ddNTPs) que no se hayan unido durante el proceso de secuenciación y que podrían generarnos sucesivos reflejos a la hora de visualizar los resultados en el analizador genético.

Se realizó la purificación del producto de secuenciación mediante el uso de columnas Centrisep (Applied Biosystems) para los genes RNASEL, MSR1 y ELAC2; y columnas DTR para el ADNmt. (Ver ANEXO IV y V).

En ambos casos, se procede con centrifugaciones sucesivas que nos permiten limpiar los terminadores, bien por unión a la resina DTR o por percolación en el filtro.

Para la purificación del ADNmt se puede usar además, la técnica de precipitación por Etanol-Acetato (para mayor detalle ver ANEXO V).

## 7. VISUALIZACIÓN DE LOS RESULTADOS

### 7.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

Tras obtener el producto de secuenciación correctamente purificado, todas las muestras secuenciadas se someten a un proceso de electroforesis capilar mediante el equipo automatizado ABI Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems. Foster City, CA) en el que los diferentes fragmentos de ADN se separan en función del tamaño [9]. Para ello, previamente se preparan las muestras con formamida Hi-Di (Applied Biosystems. Foster City, CA) que se añade al producto de secuenciación purificado.

Mediante el proceso de electroforesis capilar no sólo hay una separación por tamaño y carga, sino que además, al ir marcados con fluorocromos; se detectan por el equipo acoplado y permiten una caracterización del fragmento. La electroforesis capilar consta de un soporte de separación de las muestras que es un polímero (de concentración variable) incluido en un capilar (de

longitud variable: largo: 22 - 80 cm de largo; diámetro interno: 50-70-100  $\mu\text{m}$ ; diámetro externo: 300- 400) de sílica de unos 50 $\mu\text{m}$  [10]. Mediante la combinación de estos dos factores podemos conseguir unas separaciones de fragmentos de distinto tamaño.

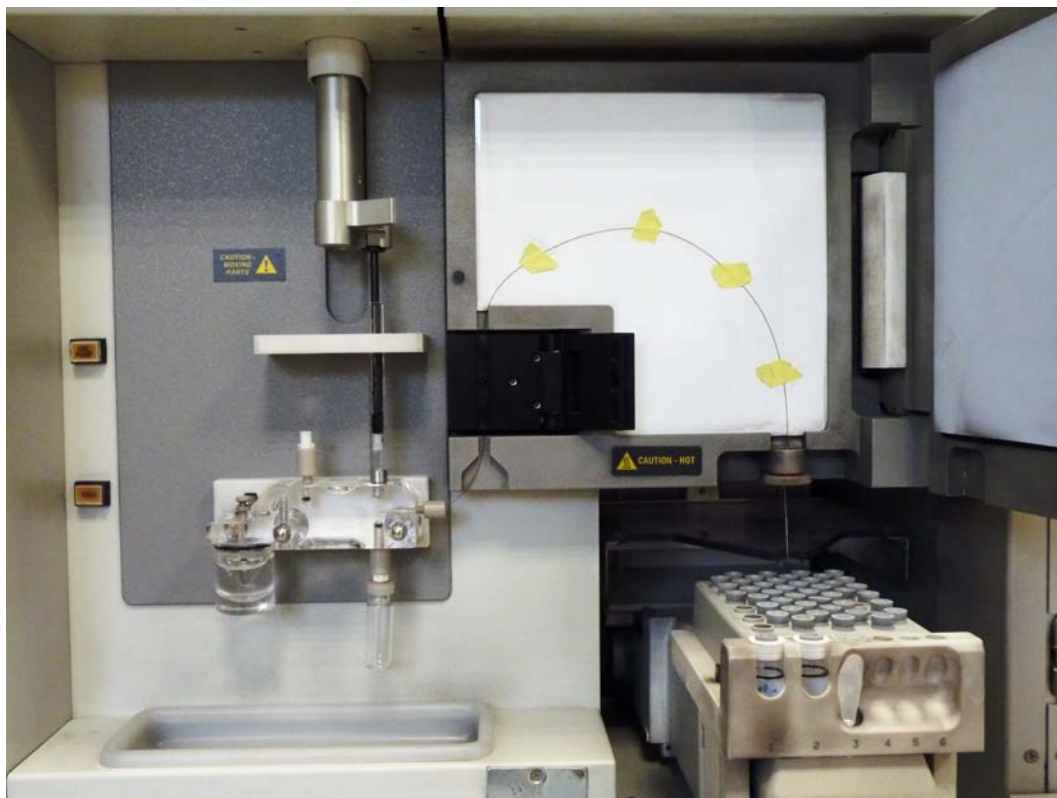


Figura 6: Equipo de electroforesis capilar ABI 310.

Uno de los factores fundamentales de la electroforesis capilar es que el ADN se amplifique con una pareja de primers que estén marcados con fluorocromos en el extremo 5'. La fluorescencia emitida por los fragmentos, al ser excitados con un rayo de argón, es detectada a través de una cámara de detección CCD que se encarga de convertir la información proporcionada por la fluorescencia en información electrónica que a su vez, se transfiere al ordenador que contiene el software necesario para traducir la fluorescencia emitida (RFUs) en variables alélicas o en secuencias de ADN que posteriormente podremos interpretar mediante el software SeqScape<sup>®</sup> v.2.6. [11].

## 7.2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

El software *SeqScape*® *Software for Mutation Profiling v2.6* [12] asigna cada nucleótido en la posición determinada de la secuencia. Contiene funciones de llamadas de base de datos, ensamblando las secuencias y realizando el alineamiento de las mismas. Ofrece una solución integrada con un sistema de medida de calidad y posibilidades de edición. En el caso de la secuenciación, se debe comparar la secuencia obtenida con una secuencia de referencia.

El procedimiento es similar tanto en el caso de la secuenciación de mitocondrial como con los genes RNASEL, MSR1 y ELAC2; lo que difiere es la secuencia de referencia para comparar. En el caso de secuenciación mitocondrial, se compara con la secuencia de Anderson, de la que se marcan las mutaciones obtenidas por variación en esta secuencia consenso. En el resto de genes, se compara con la secuencia del gen en cuestión, teniendo especial cuidado en las regiones en las que estamos buscando el SNP o mutación determinada.

## 8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

Como todo un ensayo clínico, se ha diseñado de tal forma que se han seleccionado las muestras de los pacientes de una población de referencia según la enfermedad de interés. En este caso se examinan a los pacientes con el fin de conocer los resultados en los diferentes parámetros objeto de estudio (escala de Gleason, PSA y estadio, principalmente). Lo que se considera como clave en un análisis estadístico es evitar la inclusión de sesgos como grupos de pacientes o controles que puedan alterar el estudio. A lo largo de todos los análisis, se tomaron como valores estadísticamente significativos aquellos con un p-valor  $\leq 0.05$ , tomando como valor de significación  $p = 0.05$ .

### 8.1. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS GENES RNASEL, MSR1 Y ELAC2

En el caso de los genes RNASEL, MSR1 y ELAC2; se realizó una anotación de los distintos SNP y un estudio analítico mediante el programa estadístico SPSS v15.0 con el que se comprobaron los test de  $X^2$  mediante tablas de

contingencia, test de Monte Carlo, test exacto de Fisher y estadísticas de ANOVA. Mediante estos análisis en tablas 2x2, se pretende estimar si existe asociación entre dos variables cualitativas. Del mismo modo, las estas tablas nos calculan los valores observados y esperados [13]. A través de estos test se realizaron comparaciones entre cada locus y los datos de información clínica (PSA, edad, estadio y escala de Gleason). Los porcentajes de pacientes y controles para cada genotipo se calcularon mediante una hoja de cálculo (Microsoft Office Excel 2007).

Además, se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada variante genética y el análisis de desequilibrio de linkaje entre cada variante genética del loci del gen RNASEL mediante el software ARLEQUIN v.3.5.

## **8.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DEL ADN MITOCONDRIAL**

En el caso del ADNmt se realizó el cálculo de las frecuencias de haplotipos en los dos grupos establecidos (pacientes y controles) mediante una hoja de cálculo (Microsoft Office Excel 2007). Del mismo modo se calculó el número de polimorfismos presentes. Gracias al programa estadístico Arlequín v3.5 [14].

Los haplogrupos de ADN mitocondrial se calcularon mediante cuatro programas: Haplogroup Prediction Tool del "The Geographic Project" [15], Aplo haplogroup search por el Dr. Enrico Fabrini [16], mtDNAManager [17] y Haplogrep ([haplogrep.uibk.ac.at/](http://haplogrep.uibk.ac.at/)) [18] basado en Phylotree.org; todos ellos pertenecen al software disponible en la red. Los resultados obtenidos por el programa se confirman mediante el cálculo de presencia o ausencia de las posiciones diagnósticas que nos darán el haplogrupo definitivo.

Para analizar la posible relación entre los haplogrupos mitocondriales y los datos clínicos de la población de estudio se realizan una serie de test estadísticos mediante el software SPSS v15.0. Del mismo modo, se ha calculado el riesgo relativo u Odds Ratio (O.R.) con un intervalo de confianza de un 95%. Mediante el O.R. se comprueba cuánto más probable es que ocurra el suceso en el primer grupo (pacientes) frente al segundo (controles).

Por otro lado, se ha comparado la frecuencia de aparición de las diferentes mutaciones en pacientes y controles, así como con la población europea registrada en la base de datos *Human Mitochondrial Genome Database* [19].

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] D.G. Bostwick, H.B. Burke, D. Djakiew, S. Euling, S.M. Ho, J. Landolph, et al., Human Prostate Cancer Risk Factors. *Cancer*. 101(10 Suppl) (2004) 2371-2490.
- [2] D.I. Gregorio, L. Huang , L.M. Dechello, H. Samociuk, M. Kulldorff, Place of Residence Effect on Likelihood of Surviving Prostate Cancer. *Ann Epidemiol*. 17 (2007) 520-524.
- [3] M. González-Coira, Aspectos éticos en el manejo de muestras humanas de ADN. *Revista de Bioética Latinoamericana*. 7 (2011) X-X.
- [4] Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial, 2008. 2011 (2008) X.
- [5] Guías Operacionales para Comités de Ética que evalúan investigación Biomédica OMS. 2011 (2000) x.
- [6] Agarose gel electrophoresis (basic method). 2011 (2008).
- [7] Applied Biosystems, AmpliTaq Gold ® PCR Master Mix. P/N 4317621 Rev. C, (2010) 24.
- [8] Applied Biosystems, TaqMan® SNP Genotyping Assays Protocol. Part Number 4332856 Rev. D ed., Applied Biosystems, USA, 2010.
- [9] ABI PRISM®310 Genetic Analyzer User's Manual Part Number 903565D Printed in the USA, 12/2001 © Copyright 2001, Applied Biosystems.
- [10] J.M. Castagnino, Electroforesis capilar. *Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana*. 23 (3) (1999) 297-329.
- [11] H. Shintani, J. Polonsky, Handbook of Capillary Electrophoresis Applications, Blackie Academic & Professional. (1997).
- [12] Applied Biosystems, SeqScape(R) Software v2.6 User Guide Part Number 4359442 Rev.A, (2007).

- [13] G. Garrido, *SPSS aplicado a las Ciencias de la Salud*. RA-MA 2002 ed., RA-MA, Madrid, 202.
- [14] L. Excoffier, H.E.L. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. Arlequin suite ver 3.5. 10 (2010) 564-567.
- [15] The Genographic Project, Haplogroup Predictor Tool.
- [16] E. Fabrini, Aplo haplogroup search, 2009 (2009).
- [17] H.Y. Lee, I. Song, E. Ha, S.B. Cho, W.I. Yang, K.J. Shin, mtDNAManager: a Web-based tool for the management and quality analysis of mitochondrial DNA control-region sequences, *BMC Bioinformatics*. 9 (2008) 483.
- [18] A. Kloss-Brandstätter, D. Pacher, S. Schönherr, H. Weissensteiner, R. Binna, G. Specht, et al., HaploGrep: A fast and reliable algorithm for automatic classification of mitochondrial DNA haplogroups, *Hum.Mutat.* 32 (2011) 25-32.
- [19] M. Ingman, U. Gyllensten, mtDB: Human Mitochondrial Genome Database, a resource for population genetics and medical sciences, *Nucleic Acids Res.* 34 (2006) D749-D751.

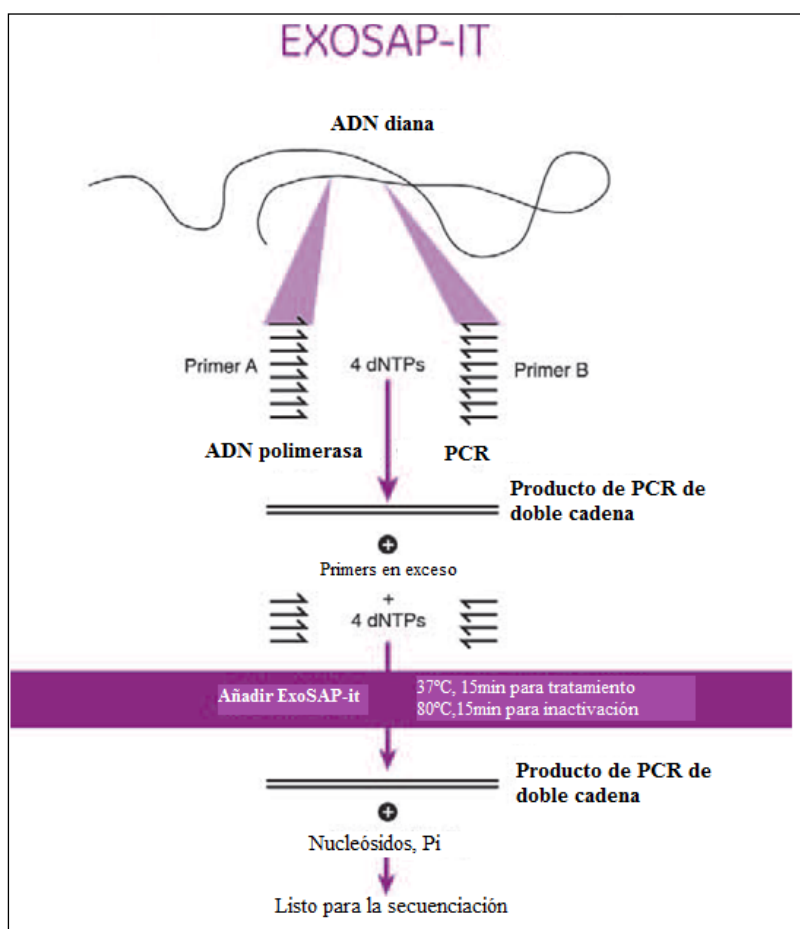
## ANEXOS

### ANEXO I: Protocolo de Extracción Orgánica (Fenol/cloroformo/alcohol isoamílico)

1. Cortar el extremo del hisopo con un bisturí esterilizado y depositarlo en un tubo eppendorff.
2. Añadir a cada muestra 300µl de buffer de extracción (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 39mM DTT, 10 mM EDTA, 2% SDS), 7.5µl de proteinasa K (10 mg/mL) y 12µl de DTT (1M).
3. Agitar a baja velocidad durante un segundo y centrifugar en una nanofuga durante 2 segundos. A continuación incubar a 56°C toda la noche (12-18horas).
4. Una vez terminada la incubación, se elimina el algodón del hisopo con una punta de pipeta, presionando contra las paredes del eppendorf para no arrastrar nada de muestra.
5. En una campana extractora, se añaden 300µl de fenol:cloroformo:isoamilalcohol 24:25:1 (saturado con 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA, Sigma<sup>®</sup>) agitar hasta conseguir una emulsión de consistencia lechosa y centrifugar en microcentrifuga 3 minutos a máximas revoluciones (13.000 rpm).
6. Una vez separada la fase orgánica y la acuosa se recupera la acuosa que contiene el ADN y se transfiere a un tubo Amicon-100 (Amicon YM-100, Millipore<sup>®</sup>) al cual previamente se le ha añadido 100µl de H<sub>2</sub>O estéril.
7. Centrifugar a 2500 rpm durante 20 minutos, o en su defecto hasta que filtre.
8. Eliminar el filtrado y añadir 200 µl de H<sub>2</sub>O estéril para limpiar la membrana.
9. Centrifugar a 2500 rpm durante 20 minutos o hasta que filtre.
10. Añadir 100µl de H<sub>2</sub>O estéril, resuspender varias veces con la pipeta, pasar a un tubo limpio invertir la membrana y centrifugar a 4900 rpm 5 minutos. Descartar la membrana y cerrar el tubo.

## ANEXO II: Purificación por ExoSAP-IT

- Añadir 2 µl de ExoSap-it a cada 10 µl de volumen de reacción de PCR.
- Sellar el producto de amplificación con la enzima para mezclarlo al agitarlos brevemente.
- Realizar una incubación durante 30 minutos a 37°C que genera una incubación enzimática. Posteriormente se procede a la inactivación enzimática al someter a 80°C durante 15 minutos.



Esquema del funcionamiento de la ExoSAP-IT. Imagen modificada de la original (Schematic diagram of the ExoSAP-IT PCR clean-up method. GE Healthcare. Data File 18-1150-14 AB Polymerase Chain Reaction (PCR). ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit)



### **ANEXO III: Purificación del producto de amplificación mediante filtros AMICON 100kDa**

1. Añadir todo el producto de amplificación a un tubo Amicon® 100, hidratado con 400 µl de agua estéril.
2. Centrifugar 7 minutos a 5600rpm. Descartar el filtrado y comprobamos que el filtro está seco; en este caso procedemos al siguiente paso. Si no, volvemos a centrifugar a igual rpm.
3. Añadir 400 µl de agua estéril y centrifugamos 7 minutos a 5.600rpm. Descartamos el filtrado y comprobamos que el filtro está seco; en este caso procedemos al siguiente paso. Si no, volvemos a centrifugar a igual rpm.
4. Añadir la cantidad de agua oscilante entre 30-50 µl, y resuspender. Dar la vuelta al filtro en un tubo nuevo y centrifugamos 5min a 11600rpm.
5. Descartar la membrana y cerrar el tubo que contiene el ADN purificado.

#### **ANEXO IV: Purificación del producto de secuenciación mediante columnas DTR**

1. Centrifugar las columnas 3 min a 850 x g.
2. Transferir la columna a un eppendorf de 1.5 mL.
3. Añadir el producto de secuenciación al centro de la columna y cerrar el tubo.
4. Centrifugar 3 min, a 850g.
5. Utilizar el eluido directamente para colocar en el analizador genético (se añaden 12µl de formamida desionizada para evitar que se evapore la muestra).

### **ANEXO V: Purificación del producto de secuenciación por precipitación de etanol-acetato**

- 1- Preparar la mezcla etanol-acetato por muestra (14.5µl H<sub>2</sub>Oe + 62.5µl etanol absoluto+3µl de acetato sódico) no guardar más de 3 días.
- 2- Añadir a un tubo eppendorf de tapón plano 80µl de la mezcla de etanol acetato.
- 3- Añadir todo el producto de secuenciación.
- 4- Agitar y esperar durante 10 minutos.
- 5- Centrifugar a máximas revoluciones durante 20 minutos.
- 6- Frenado manual, sacar y volcar rápidamente.
- 7- Tras 3 minutos volcar los tubos y añadir 250µl de etanol al 70%.
- 8- Centrifugar 20 minutos a máximas revoluciones.
- 9- Frenado manual, sacar y volcar rápidamente.
- 10- Incubar a 56° hasta que el etanol se haya evaporado totalmente.
- 11- Añadir 20µl de formamida y pasados 15 minutos agitar suavemente de menos a más fuerza.

## ANEXO VI: Modelo de hoja de Consentimiento Informado.

**Consentimiento informado:** *Código:* Muy importante codificar la muestra para trabajar anónimamente durante todo el proceso.

### CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA DONANTES DE MUESTRAS CONTROL

Apellidos:

Nombre:

Fecha:

Contacto: Correo electrónico:

Teléfono:

### DONACIÓN VOLUNTARIA DE SALIVA/O SANGRE PERIFÉRICA PARA INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

**Finalidad:** Indicar la finalidad del trabajo.

**Descripción del proceso:** Indicar la descripción del procesamiento de la muestra.

#### DECLARACIONES Y FIRMAS

Lea por favor la siguiente información con detenimiento y si está de acuerdo fírmela.

#### **Declaración del donante:**

He sido informado por el profesional abajo mencionado que:

- Mi participación en este proyecto es completamente voluntaria.
- Las ventajas e inconvenientes de este procedimiento.
- El lugar de obtención, almacenamiento y proceso de mis datos y muestras personales.

– El fin para el que se utilizarán mis muestras y datos personales (estudios genéticos, de salud pública o estadísticos, que cumplan todos los requisitos que exigen la ley y los comités externos Científico y de Ética de Centro donde se realiza el procesamiento de la muestra).

– Mis muestras y datos personales serán proporcionados de forma anónima a los investigadores que trabajen con ellas.

–En cualquier momento puedo revocar mi consentimiento y solicitar la eliminación de mis datos personales y muestras que permanezcan almacenados en el Centro donde se realiza el procesamiento de la muestra.

– En cualquier momento puedo solicitar información genérica sobre los estudios para los que se han utilizado los productos de mis muestras.

–Tengo derecho de acceso a mis datos personales archivados en el Centro donde se realiza el procesamiento de la muestra.

–No tendré acceso a los resultados específicos de cada estudio.

–He comprendido la información recibida y he podido formular las preguntas que he creído oportunas.

Accedo a que el Centro donde se realiza el procesamiento de la muestra contacte en el futuro en caso de que se estime oportuno añadir nuevos datos a los recogidos en el cuestionario de salud y/o a la toma de nueva muestra.

Sí

No

Nombre: ..... Firma: .....

## **CAPÍTULO 1**

### **Búsqueda de la relación en las mutaciones del Gen RNASEL con el cáncer de próstata esporádico**

## ABSTRACT

The aim of this study is to determine if there is a relation between the genotypes observed in the different SNPs in RNASEL (Ribonuclease L) gene and prostate cancer. Similar studies have been previously performed but non-conclusive results have been obtained. A population from South Europe (Granada) affected and non-affected by prostate cancer has been genetically analyzed for RNASEL gene. Clinical information has also been obtained for both groups (Gleason score, T-stage, PSA levels...). The results might be used as an extra tool for the detection of prostate cancer and to avoid false results derived from the present biomarkers such as the determination of PSA levels. Through the analysis of the information given by this gene, a more specific follow-up and treatment for each patient (individualized medicine) is aimed.

HPC1 (Hereditary prostate cancer 1) gene has been considered one of the key points of susceptibility in this cancer. However, there is not many information about the population of South Europe. In this analysis, it has been demonstrated that individuals with A/G, A/A and G/G genotypes in the variants I97L, R462Q and D541E respectively in RNASEL gene have worst clinical features and faster progression of the tumor than other genotypes. Patients with these genotypes could be considered as high risk group and a closer and more specific follow might be given. In contrast, patients with genotypes A/C in I97L variant; G/G in R462Q variant and T/T in D541E variant have a better clinical evolution of the cancer.

Genotyping RNASEL gene in individuals affected by prostate cancer could be a preventive measure for the progression of this cancer. Furthermore, in familial prostate cancer, genotyping could be also offered to others members to avoid a late detection and a quick progression of this pathology.

## 1. INTRODUCCIÓN

La complejidad y la alta tasa de prevalencia del cáncer de próstata han hecho necesarios una gran cantidad de estudios con la finalidad de descubrir factores que causen una mayor o menor predisposición a padecerlo. Los diversos análisis de ligamiento sugieren que un número de regiones cromosómicas se comportan como genes susceptibles al desarrollo del cáncer de próstata [1]. Sin embargo, la falta de consistencia entre los distintos estudios propone que este cáncer es un desorden genéticamente heterogéneo en el que están implicados múltiples factores genéticos y ambientales [2]. Uno de los puntos en los que se ha realizado mayor énfasis y en el que se centran gran cantidad de los estudios del adenocarcinoma prostático es el referido a sus características moleculares. Eventos genéticos y epigenéticos causan la transformación de las células epiteliales prostáticas benignas a malignas desde un estadio local a otro metastásico.

El gran número de casos epidemiológicos y los estudios de asociación realizados en este ámbito, marcan a los factores genéticos como una de las mayores causas de este cáncer, por ello se ha centrado el estudio en varias regiones genéticas de considerada importancia. Si bien, debemos señalar que nos enfrentamos a un cáncer de etiología muy compleja influenciado tanto por una gran variedad de factores de riesgo: genéticos, étnicos, hormonales (andrógenos), dietéticos y otro tipo de factores ambientales [3].

En el campo de la genética se han descrito gran cantidad de genes que parecen ejercer un papel crucial tanto en el desarrollo como en la evolución del cáncer prostático. En este caso, vamos a centrarnos en el gen HPC1 o RNASEL, ya que diversos estudios lo encuadran como un fuerte candidato, sugiriendo que las mutaciones en este gen generan una mayor incidencia de cáncer de próstata así como una mayor agresividad [4,5]. Si bien, no son los únicos puntos en los que se está analizando una posible atribución de determinados factores con el desarrollo del cáncer. Hay estudios en los que se establecía una posible relación entre las rutas antivirales del interferón con la genética del



cáncer de próstata [6] ambas relacionadas por la regulación de la endorribonucleasa codificada por RNASEL.

### **1.1. GEN RNASEL (HPC1)**

El gen RNASEL codifica para una ribonucleasa, en concreto la 2´-5´-oligoisoadenilato (2-5 A) sintetasa ribonucleasa L dependiente RNasa L, que juega un papel importante en la proliferación celular, apoptosis celular, además de señalarse como un gen supresor de tumores.

Este gen se localiza en el cromosoma 1q22 y está formado por 8 exones comprendiendo un total de 13kb. La proteína resultante de este gen forma parte de la familia de las ribonucleasas que son un grupo de enzimas que intervienen en el procesamiento y degradación del ARN uniéndose en los enlaces fosfodiester generando múltiples y variadas consecuencias biológicas [7], además de estar implicadas en el mecanismo molecular de los interferones (IFNs). El impacto en la expresión génica puede ser muy elevado, ya que en ausencia de mecanismos reguladores, las endorribonucleasas pueden generar un gran impacto a nivel de expresión génica porque una simple fisura en el ARNm genera la inactivación génica. Por ello, el organismo ha respondido generando un sistema de regulación estricto de estas endorribonucleasas.

Por tanto, se hace evidente que este tipo de factores (como ncRNAs, RBPs y RNasas) producen una regulación génica a nivel del ARNm. En el momento en el que este tipo de factores se ven alterados, se producen procesos de tumorigénesis o progresión tumoral. De hecho, alteraciones en las RNasas de mamíferos se señalan ya como asociadas al desarrollo de tumores, tanto por su papel regulador, como por ejercer funciones de oncoproteínas, influyendo en el crecimiento celular, angiogénesis o bien apoptosis, todos, eventos claramente relacionados con el desarrollo tumoral [7]. Entre todas ellas, las hay que están directamente implicadas en las rutas convencionales de degradación del ARNm, como CCR4, PARN y XRN1. Otras, como RNasa L, IRE1 y PMR1; requieren una determinada señal para activarse [7] como es el caso de RNasa L que necesita unirse a un pequeño oligonucleótido 2-5 A.

Parece que la función supresora de tumores de la RNasa L se relaciona con la señalización via interferón. La RNasa L degrada el ARNm mitocondrial, el cual puede derivar en la liberación del citocromo c y la activación de la caspasa-3 en apoptosis inducida por el interferón- $\alpha$  o agentes anticancerígenos [7]. Se cree que tiene un papel importante en la regulación del ARN mediante la destrucción de miRNAs inhibitorios o rARNs que pueden desencadenar la activación de la maquinaria transcripcional. Se ha descubierto que puede ejercer un papel como regulador *downstream* del gen BRCA-1, supresor de tumores, que se activa mediante interferón- $\gamma$ .

Parece también claro también, el papel que ejerce como efector en el sistema 2-5 A (RNasa L) en la ruta de apoptosis celular, bien por respuesta a infección vírica y a varios estímulos externos. La apoptosis iniciada por la RNasa L requiere la actividad de la caspasa 3 y se caracteriza por la aparición citosólica de citocromo c (por lo que la mitocondria se ve implicada en este evento) [3]. Los primeros estudios que indicaban un posible papel de RNasa L en apoptosis se basan en las observaciones con respecto a la activación de la ribonucleasas, que ocurren durante apoptosis y eliminación vírica. Además, se ha demostrado que la RNasa L es un regulador de ARN de cadena sencilla y tiene un papel relevante en el mecanismo de defensa induciendo la apoptosis celular en respuesta a una infección vírica [8].

El gen RNasa L se ha estudiado en gran profundidad debido a su papel relevante en el cáncer de próstata hereditario (conocido también como HPC) y está mapeado en una región ligada a susceptibilidad al cáncer hereditario prostático. Se han descrito diversas variantes confinadas en los exones 1 y 3 del gen RNASEL que producen actividades y efectos diferentes del mismo. Así mismo, se pueden destacar, variantes de proteína truncada como E265X, que produce la falta del dominio de unión 2-5-A por lo que produce una proteína inactiva. La variante R462Q genera una reducción en la actividad de esta enzima y hay quien sugiere una posible asociación con los estadios tempranos del cáncer de próstata al igual que un mayor riesgo a padecerlo [9,10]. Por último, destacar que la variante D541E a diferencia de las anteriores no produce una disminución o pérdida de actividad. Sin embargo, los individuos

homocigóticos E/E presenta un riesgo mayor a padecer cáncer de próstata que los individuos homocigotos D/D o los heterocigotos D/E.

Sin embargo, estas variantes no se asocian sólo al cáncer de próstata, sino que también se relacionan con otros tipos de cánceres. De hecho, la variante R462Q se asocia con cáncer colorrectal y páncreas [7]. Y las anomalías genéticas en RNasa L generan respuestas anómalas apoptóticas se ha relacionado éste con procesos oncológicos [3,11-13].

Como se ha visto, todos ellos se asocian con un aumento de agresividad y metástasis creando grupos de mayor riesgo en determinados cánceres y genotipos.

## 1.2. VARIANTES DEL GEN RNASEL

Existen gran cantidad de variantes que se sugieren como efectoras de un papel tumoral en el cáncer de próstata. Se han identificado además una amplia diversidad en las distintas poblaciones, pudiendo destacar E265X, R462Q, 471delAAAG, I97L, M1I, G59F, S113S, I220V, E262X, S406F, Y530C y D541E, entre otros (Figura 1). De todas las variantes mencionadas anteriormente, se describen genotipos distintos en pacientes y controles que pueden interpretarse como una mayor o menor predisposición a padecer el cáncer de próstata o bien poder padecerlo de una forma más agresiva.

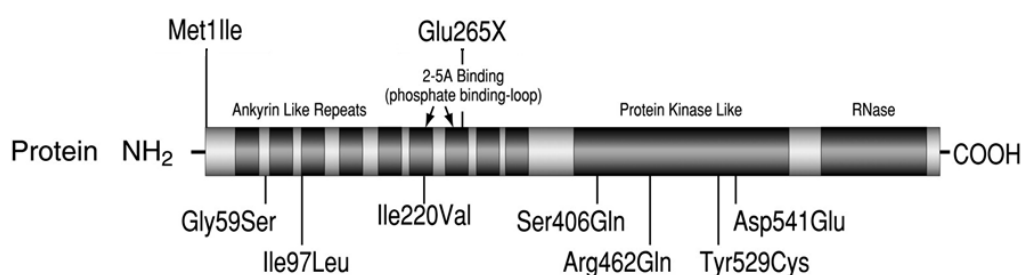


Figura 1. Representación de las mutaciones más relevantes del gen RNASEL.

El diseño de este estudio se ha centrado en comparar, a nivel de secuencia de ADN, los exones 1 y 3 del gen RNASEL (HPC1) en individuos diagnosticados de cáncer de próstata y en individuos control para comprobar si las diferencias, en cuanto a frecuencias de polimorfismos y mutaciones encontradas, son significativas entre ambos grupos en la población nuestro estudio. Así,

mediante este diseño se cubren las mutaciones que se pueden observar en la Tabla 1.

Tabla 1. Mutaciones cubiertas en cada exón.

EXON 1-R1(1-377)	EXON 1-R2 (449-848)	EXON 1-R3 (1070-1459)	EXON 3(1567-1772)
M1I (3 G>A)	Del 471 AAAG	S406F (1217C>T)	Y530C (A>G)
G59F (175 G>A)	I220V (661 A>G)	R462Q ( 1384 G>A)	D541E (1623 T>G)
I97L (289 A>G)	E262X ( 784 G>T)		
S113S (339 T>C)	E265X (793 G>T)		

Si se analiza en detalle cada una de las mutaciones descritas en el gen de RNASEL, se pueden ver los resultados tan diversos que derivan de cada una de estas regiones:

- 471delAAAG (Del 471 AAAG): es la primera mutación null descrita en el gen HPC que se asocia con un riesgo potencialmente mayor a padecer cáncer de próstata en la población judía [14] tratándose de una delección de 4 pares de bases en el codón 157. Esta mutación parece principalmente confinada a la población judía ya que diversos estudios en otras poblaciones (población japonesa [15]) no presentan una frecuencia de mutación tan elevada y en otras poblaciones (europeos y asiáticos) no detectan esta delección [14]. De igual forma, se ha intentado testar si esta mutación es frecuente en otro tipo de cánceres (vejiga, mama, ovario o colon) pero no se han encontrado evidencias significativas entre pacientes y controles [16]. Sin embargo, puede tener repercusión en el cáncer de mama y ovario entre la población judía [17].
- M1I (rs74315365): o también conocido como Met1Ile se corresponde con una mutación *missense* localizada en el codón de iniciación. Se ha descrito en casos de poblaciones de ancestros afroamericanos [18] y parece generar una disminución de la actividad de la enzima RNASa L.
- E265X (Glu256X) (rs74315364): mutación de proteína truncada descrita principalmente en familias de descendientes europeos [19,20], en concreto, presentan una elevada frecuencia en familias finesas [21]. Es una mutación de parada, *nonsense*, que parece producir una disminución de la actividad enzimática del gen RNASEL [22]. Se produce la pérdida del alelo *wildtype*

generando la expresión de la proteína en el tejido tumoral del paciente en familias con esta variante [20]. Estudios desarrollados en poblaciones suecas [2,23] y alemanas [19] no encuentran diferencias significativas entre pacientes y controles, en contraposición con poblaciones geográficamente cercanas como Finlandia donde se han descrito tasas más elevadas en pacientes de cáncer de próstata hereditario [20,24].

- S113S (rs3606971); Y530C; I221V (rs14948082); S406F; G59F: estas variantes han sido analizadas en numerosos estudios, y en principio; se pensaba que podrían ejercer algún efecto como factor de riesgo en este cáncer. Sin embargo, en algunos estudios funcionales no se han encontrado diferencias en los niveles de actividad de la enzima RNasa L entre el mutante y el *wildtype*. La mayoría de estas mutaciones son *missense*, como es el caso de G59S, I220V y S406F [20].
- I97L (rs56250729): mutación *missense* que se localiza en el sitio de repetición 3 y 7 del dominio ankirina del gen RNASEL [25]. Al igual que el grupo de mutaciones descritas con anterioridad, se señalaba como una mutación con un efecto importante en el cáncer de próstata. Sin embargo pocos estudios han conseguido resultados positivos que lo avalen [26] y la mayoría no encuentran diferencias en la actividad de la enzima Rnasa L. Existen análisis además también en cánceres de cérvix, cabeza, cuello y mama encontrando resultados similares que en el cáncer de próstata [25].
- E262X: mutación de proteína truncada que se ha analizado en varios estudios de cáncer hereditario de próstata; en los que un 4,3% de los varones de los casos familiares tenían esta mutación y parece más crítica en casos con gran número de varones afectados [20]. Estos resultados se han corroborado mediante otro análisis en una población fina, en el que se analizaron individuos afectados con cáncer de próstata asegurándose que las muestras no eran de tipo familiar (HPC). No se encontraron diferencias significativas entre los portadores de la mutación [27].
- R462Q (rs486907): mutación *missense* de tipo germinal también denominada Arg462Gln. Según algunos estudios [28], parece que esta variante provoca una disminución de la actividad enzimática de la RNasa L

con respecto a la variante *wildtype* lo que desencadena el cáncer de próstata. También, se señalan a los varones heterocigotos con un 50% mayor de riesgo a padecer este cáncer comparado con los individuos que no portan ninguna alteración, aumentando hasta el doble en individuos homocigotos. Sin embargo, la dificultad y variedad de este cáncer se hace patente al consultar otros estudios. Así, resultados derivados de los trabajos de Xiang et al. [26] indican que la variante R462Q reduce la habilidad de la enzima RNasa L para generar la respuesta apoptótica como respuesta a la activación de la enzima en 2-5 A. Sin embargo, otros estudios en poblaciones suecas no encuentran diferencias significativas entre controles y pacientes en esta variante [2].

- D541E (rs627928): mutación *missense*. Al igual que hemos visto en los ejemplos anteriores, varían los resultados según la población en la que se enfoque el estudio. En este caso, en poblaciones japonesas se ha encontrado un aumento de riesgo para el cáncer de próstata en individuos que poseen esta variante [15], mientras que otros estudios no encontraron este tipo de asociación [20,28,29]. Estudios en poblaciones europeas han descrito casos de mayor riesgo de cáncer de próstata en individuos con al menos una componente del alelo G y una disminución de un 36% de riesgo en varones homocigóticos para el alelo T [4].

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

NOTA: Debido a que existe un capítulo concreto titulado MATERIALES Y MÉTODOS, en este apartado sólo se hace una breve reseña de los datos más importantes. Para mayor información consultar este capítulo.

### 2.1. POBLACIÓN Y MUESTRA

Esta población se ha subdividido en dos grupos, población control (no afectada por cáncer de próstata) y pacientes (individuos afectados por cáncer de próstata).

#### Individuos Control:

Principalmente la población control se ha usado en el estudio para comprobar las diferencias genóticas entre los controles y pacientes en los SNPs analizados. La idea es poder usar así un SNP que nos pueda diferenciar entre población control y paciente.

#### Individuos Pacientes:

Con respecto a este grupo de  $n=231$ , tenemos la información clínica detallada de algunos parámetros urológicos relevantes para el estudio de este cáncer y que nos permitirán realizar una posible asociación genética clínica de los pacientes.

### 2.2. ANÁLISIS GENÉTICOS

Tras el proceso de recepción de la muestra se procedió, según el reglamento ético establecido, a la disociación de los datos y codificación de los mismos y se creó una base de datos con toda la información clínica procedente de ella. Posteriormente, se realizó el procedimiento de extracción, cuantificación y amplificación.

La amplificación del gen RNASEL se realizó mediante la técnica de fragmentos solapantes en el caso del exón 1, debido a su gran tamaño. Posteriormente, se procedió a la secuenciación mediante el kit Big Dye Terminator v.3.1 (Applied Biosystems) y la visualización de los resultados se

llevó a cabo en secuenciador capilar ABI 3130 (Applied Biosystems), utilizando el software SeqScape v2.6 (Applied Biosystems). (Ver detalle en la Figura 2).



Figura 2: Esquema del procesamiento de las muestras para obtener ADN.

### 2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Mediante el software del programa estadístico SPSS v.15.0 se realizaron análisis estadísticos de  $\chi^2$  mediante tablas de contingencia, test de Monte Carlo ANOVA y test exacto de Fisher. A través de estos test estadísticos se desarrollaron comparaciones entre cada locus y los datos de información clínica (PSA, edad, estadio y escala de Gleason). De los datos derivados tanto del análisis del test de  $\chi^2$ , como del estadístico de ANOVA, se confirmaron los resultados de las variantes que ejercían un mayor o menor efecto en los pacientes analizados. Se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada variante genética y el análisis de desequilibrio de linkaje entre cada variante genética del loci del gen RNASEL mediante el software ARLEQUIN v.3.5. Todos los datos se representaron mediante gráficos de barras y otros gráficos generados por SPSS v.15.0.



### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De todas las variantes cubiertas en el proceso de secuenciación del gen RNASEL (E265X, R462Q, 471delAAAAG, I97L, M1I, G59F, S113S, I220V, E262X, S406F, Y530C y D541E) en la población europea analizada; sólo se encontraron diferencias genotípicas entre pacientes y controles en las variantes D541E, R462Q y I97L. El resto de variantes no presentan diferencias genéticas significativas entre individuos control y pacientes, aunque sí describen con un papel relevante en diversas poblaciones, como en Suecia [2], Finlandia [20] e Israel [17], entre otras.

Un resumen general de los resultados de los genotipos obtenidos tanto en la población control como en los pacientes se detalla en la Tabla 2.

Tabla 2: Representación de las mutaciones analizadas para el gen RNASEL.

Mutación	Genotipos y porcentajes de pacientes	Genotipos y porcentajes de controles	p-valor
<b>M1I</b>	100% G/G	100% G/G	N.A
<b>G59F</b>	100% G/G	100% G/G	N.A
<b>471delAAAAG</b>	100% delAAAAG	100% delAAAAG	N.A
<b>I220V</b>	100% A/A	100% A/A	N.A
<b>S406F</b>	100% C/C	100% C/C	N.A
<b>Y530C</b>	100% A/A	100% A/A	N.A
<b>E265X</b>	100% G/G	100% G/G	N.A
<b>S113S</b>	100% T/T	100% T/T	N.A
<b>E262X</b>	100% G/G	100% G/G	N.A
<b>I97L</b>	0.85% A/G 1.27% A/C 96.17% A/A	100% A/A	0.771
<b>R462Q</b>	15.62% A/A	16.67% A/A	0.498
	50.63% G/A	56.94% G/A	
	33.75% G/G	26.39% G/G	
<b>D541E</b>	32.91% G/G	36.11% G/G	0.748
	52.32% T/G	47.22% T/G	
	14.77% T/T	16.67% T/T	

N.A.:No aplicable.

Como podemos observar en la Tabla 2 sólo hay diferencias entre los genotipos de controles y pacientes en las variantes I97L, R462Q y D541E. Para el resto de las variantes descritas no se han encontrado diferencias genotípicas entre las dos cohortes analizadas en nuestra población.

En la población de estudio, en la variante E265X tanto controles como pacientes poseen el mismo genotipo (G/G), no mostrando diferencias significativas a diferencia de lo que se describe en poblaciones del Norte de Europa (Finlandia) dónde se encuentran tanto genotipos homocigotos como heterocigotos para esta región [21]. En relación a las variantes de las que encontramos diferencias significativas entre controles y pacientes en nuestra población. En la variante *missense* D541E, se describe una elevada frecuencia alélica tanto en poblaciones europeas [2,30], como asiáticas [15] y americanas [31] a diferencia de otras variantes descritas con anterioridad como el caso de 471delAAAG que son exclusivas de determinados grupos poblacionales [17]. Por lo que era de esperar que la existencia de la delección 471delAAAG estuviese ausente en nuestra población europea, ya que parece exclusiva de la población judía.

### 3.1. D541E

Esta mutación de tipo *missense* descrita con un mayor riesgo a desarrollar cáncer de próstata en poblaciones japonesas [15]. Mediante la herramienta estadística SPSS v.15.0, se ha realizado un procesamiento de los datos genéticos en la población control y afectada de la región Sur Europea (España, Andalucía). Existen determinados parámetros clínicos para los cuales el p-valor cumple los requisitos de  $\alpha \leq 0.05$  en la variante D541E, por lo que implica una asociación significativa entre esta variable y varios parámetros clínicos como son el estadio del cáncer ( $\alpha = 0.001$ ), el PSA ( $\alpha = 0.021$ ) y la escala de Gleason ( $\alpha = 0.008$ ).

Del análisis de esta variante, se han descrito tres genotipos G/G, T/G y T/T, de los cuales tras ser representados y procesados por el programa SPSS podemos obtener la información que se representa en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados estadísticos de la variante D541E para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante G/G FO-FE - %	Variante T/G FO-FE- %	Variante T/T FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	6- 6.2 - 8%	11- 10.2 -8.9%	2-2.6 – 6.5%	0.986
Edad 56-60	8- 7.5 - 10.7%	13-12.4-10.6%	2-3.1-6.5%	
Edad 61-65	16- 15.7 – 21.3%	26- 25.8- 21.1%	6-6.5-19.4%	
Edad > 65	45- 45.5- 60.0%	73-74.7-59.3%	21-18.8-67.7%	
<b>ESTADIO</b>				
A	2-2.9-2.7%	6- 4.8- 4.9%	1-1.2-3.2%	0.001
B	31 – 47.3 - 41.9%	87-77.9-71.3%	27-19.8-87.1%	
C	26-16.0-35.1%	20-26.3-16.4%	3-6.7-9.7%	
D	15-7.8-20.3%	9-12.9-7.4%	0-3.3-0%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	0-0.3-0%	1-0.5-0.9%	0-0.1-0%	0.021
4.1-10	30-32.7-43.5%	53-52.6- 47.7%	17-14.7-54.8%	
10.1-20	17-21.3-24.6%	38-34.2-34.2%	10-9.5-32.3%	
>20	16-11.8-23.3%	16-18.9-14.4%	16-18.9-14.4%	
>1000	6-2.9-8.7%	3-4.7-2.7%	3-4.7-2.7%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
2-6	41-48.9-55.4%	86-78.6-72.3%	21-20.5-67.7%	0.008
7	17-15.9-23%	21-25.5-17.6%	10-6.6 -32.3%	
8-10	16-9.3-21.6%	12-14.9-10.1%	0- 3.9- 0%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de D541E.

NOTA: Como lo que nos resulta de interés es conocer los rasgos en la población de pacientes hemos representado solo los datos estadísticos referidos a este grupo poblacional.

La distribución por edades de los diferentes genotipos encontrados para la variante D541E, muestra como el genotipo T/T tiene una baja representación en las edades comprendidas en rangos menores de 65 años. En cambio, los genotipos G/G y T/G, aún presentando grandes porcentajes del grupo de edad mayor de 65 años, aparecen también en los grupos de edades por debajo de este rango. Como sabemos, el cáncer de próstata tiene una aparición tardía presentándose normalmente en hombres mayores de 40 años y con una frecuencia aumentada en edades superiores a los 50 años. Por tanto, una aparición más temprana de este cáncer implica una mayor agresividad de esta patología, ya que esta enfermedad se considera como rara en individuos menores de 50 años (menos del 1% de la población con esta edad lo presentan). Si bien, la incidencia de cáncer de próstata aumenta con la edad y es en los casos de pacientes más jóvenes cuando muestra peor el pronóstico. De hecho, el poseer un nivel de PSA elevado a edades inferiores a 50 años se considera entre los principales factores personales de riesgo [32].

Con respecto a la escala de Gleason podemos observar que en el genotipo homocigoto T/T no existen individuos dentro del rango 8-10 y el genotipo G/G presenta un mayor porcentaje de individuos dentro de este rango. Resultados similares se describen en el resto de parámetros clínicos como son el estadio del cáncer, de cual valores elevados del mismo (estadio 4) no se describen en individuos con genotipo T/T, mientras que los homocigotos G/G poseen los porcentajes más elevados de este estadio. Por tanto, como vemos la variante G/G posee representación de las características clínicas de peor pronóstico (mayores proporciones de los estadios 3 y 4, mayores porcentajes de escalas de Gleason 7, 8-10, y valores de PSA por encima de 20 ng/mL y mayores de 1000ng/mL). En contraposición, el genotipo T/T posee las condiciones clínicas menos severas; incluso ausencia de parámetros clínicos elevados en el caso de PSA.

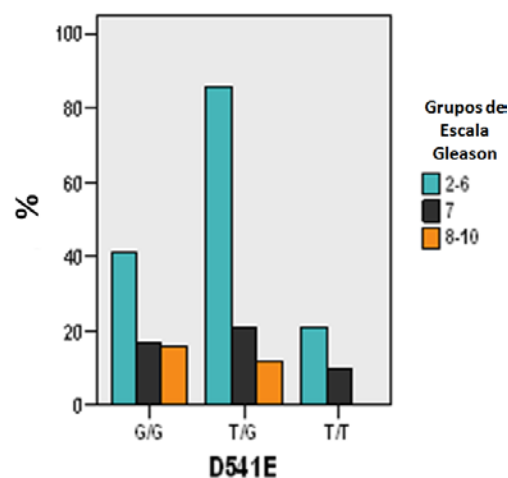
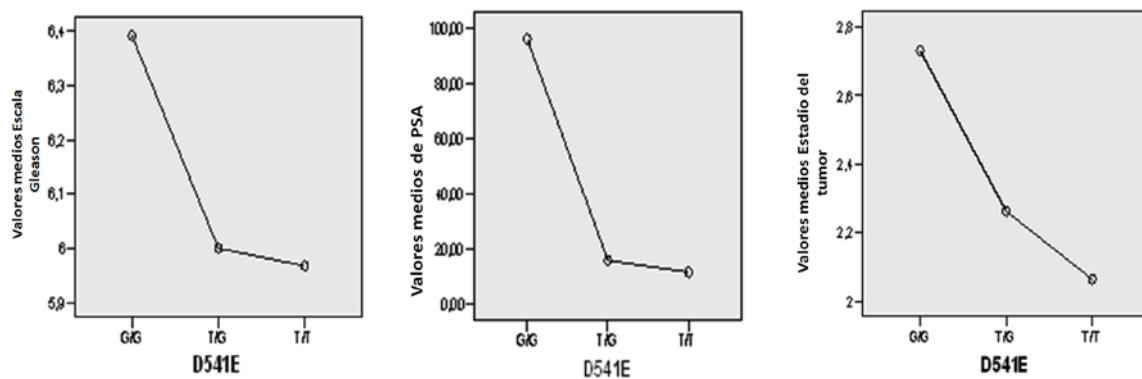


Figura 3 Representación escala Gleason en los genotipos de la variante D541E.

Al realizar análisis estadísticos de ANOVA mediante el software SPSS v.15, se encontraron resultados similares a los descritos con anterioridad. Como se destaca en las representaciones obtenidas del análisis de la ANOVA, el genotipo T/T alcanza siempre los valores más bajos en todos los parámetros clínicos analizados (escala de Gleason, PSA y estadio del tumor) mientras que el genotipo G/G alcanza los niveles más altos en todos los casos.



Figuras 4, 5 y 6: Representación de estadísticos de ANOVA y variables clínicas (escala de Gleason, PSA y estadio del tumor) en la región D451E.

En el caso de la variante D541E, se han realizado análisis para los cuales los pacientes hispanos europeos con genotipos G/G tienen estadísticamente un aumento de riesgo para el desarrollo del cáncer de próstata comparado a los individuos con genotipo T/T y G/T [30]. El genotipo G/T parece más frecuente en controles tanto en la variante R462Q como en la D541E en poblaciones afroamericanas, pero no se han encontrado datos que corroboren este hecho en poblaciones hispano europeas [10]. En esta variante se encuentra también una gran diversidad de expresión poblacional. Mientras que en poblaciones japoneses con polimorfismos Asp/Asp se han descrito asociaciones con un aumento de riesgo en cáncer de próstata familiar[15], en poblaciones finesas [20], blancos no hispánicos [29], suecos [2], alemanes [19] y americanos europeos [31], no se han encontrado diferencias genotípicas entre pacientes y controles. Para casos concretos de cáncer de próstata esporádico, se ha observado que los individuos que poseen el genotipo Asp/Glu o Glu/Glu, tienden a tener un mayor riesgo de cáncer de próstata que aquellos con genotipo Asp/Asp [5].

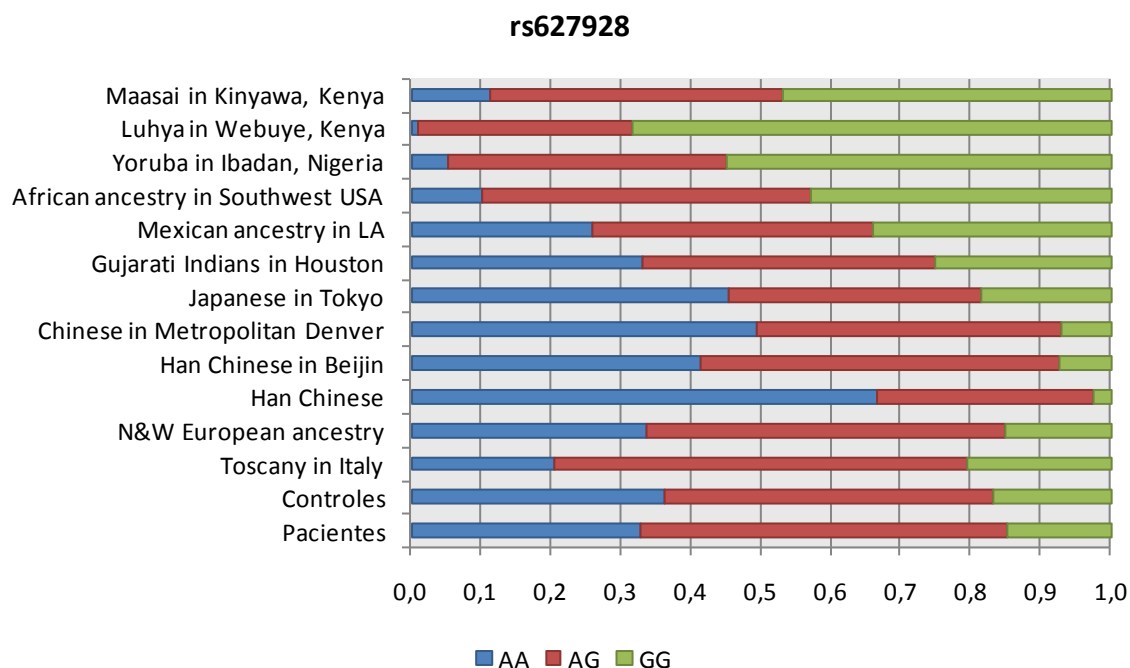


Figura 7: Distribución de los genotipos observados en la variante D541E en diferentes poblaciones. Datos obtenidos de Hapmap III [33].

### 3.2. R462Q

La variante R462Q es también de tipo *missense* y a diferencia de la anterior no se observa en la población india (asiática). Parece que la principal función la ejerce mediante la disminución de la capacidad apoptótica del gen RNasa L en respuesta a la activación de la enzima 2-5A [26].

De los análisis estadísticos obtenemos valores significativos en las siguientes asociaciones de las variables R462Q con la edad ( $\alpha = 0.047$ ), con el estadio del tumor ( $\alpha \leq 0.001$ ), con la escala Gleason ( $\alpha = 0.001$ ) y niveles de PSA ( $\alpha = 0.015$ ). Como vemos, todos cumplen el requisito de poseer un p-valor que cubre el rango de  $\alpha \leq 0.05$ . Para mejor visualización de los resultados, se han realizado representaciones en gráfico de barras mediante los datos del programa estadístico SPSS v.15.

Tabla 4: Resultados estadísticos de la variante R462Q obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante A/A FO-FE - %	Variante G/A FO-FE- %	Variante G/G OF-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	3- 3,1- 8,1%	9- 9,7 -7,7%	7-6,2- 9,3%	0,047
Edad 56-60	8- 3,7 - 21,6%	12-11,8-10,3%	3-7,5- 4,0%	
Edad 61-65	8- 7,8 - 21,6%	29- 24,5- 24,8%	11-15,7-14,7%	
Edad > 65	18- 22,5- 48,6%	67-71-57,3%	54- 45,5-72,0%	
<b>ESTADÍO</b>				
A	1-1,5-2,7%	5-4,6-4,3%	3-3-4%	0,000
B	7-23,6-18,9%	84-73,5-73%	54-47,9-72%	
C	17-8- 45,9%	16-24,8-13,9%	16-16,2-21,3%	
D	12-3,9-34,4%	10-12,2-8,7%	2-7,9-2,7%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	0-0,2-0%	0-0,5-0%	1-0,3-1,4%	0,006
4.1-10	11-16,1-32,4%	53-51,2-49,1%	36-32,7-52,2%	
10.1-20	7-10,5-20,6%	38-33,3-35,2%	20-21,3-29%	
>20	11-5,8-32,4%	14-18,4-13%	11-11,8-15,9%	
>1000	5-1,5-14,7%	3- 4,6 -2,8%	1-2,9-1,4%	
<b>ESCALA</b>				
<b>GLEASON</b>	19-24,4-51,4%	82-75,3-71,9%	47-48,2-64,4%	0,001
2-6	6-7,9-16,2%	22-24,4-19,3%	20-15,6-27,4%	
7	12-4,6-32,4%	10-14,3-8,8%	6-9,1-8,2%	
8-10				

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de R462Q.

Al analizar los parámetros clínicos se observa como los valores más elevados se concentran en el genotipo A/A y los menores en el G/G.

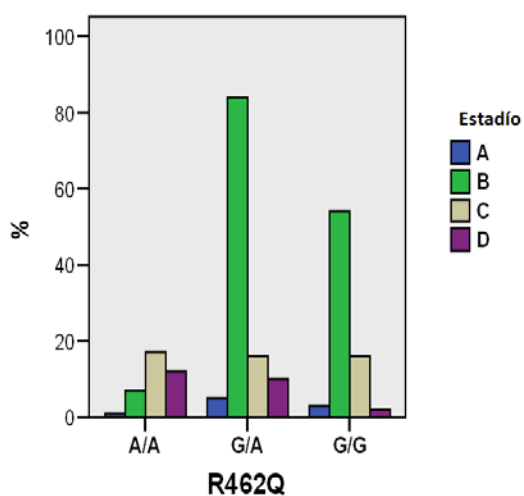


Figura 8: Estadio del tumor - Genotipos R462Q

Así para el caso del estadio del tumor, se puede observar cómo en el genotipo A/A se encuentran los valores más elevados para los estadios más agresivos como son el C y el D, y sin embargo los de menor agresividad presentan valores muy bajos o prácticamente inexistentes (como es el caso del estadio A). Tanto el genotipo G/A como el G/G predomina claramente en individuos con estadio B.

Sin embargo, al estudiar la escala de Gleason, la diferencia no es tan clara. El genotipo A/A donde concentra el mayor porcentaje de individuos dentro del rango 8-10, y a su vez el menor porcentaje de individuos en el rango 2-6. En el resto de genotipos (G/A y G/G), hay una proporción predominantemente clara de un mayor porcentaje de individuos en los rangos de la escala Gleason entre los valores 2-6.

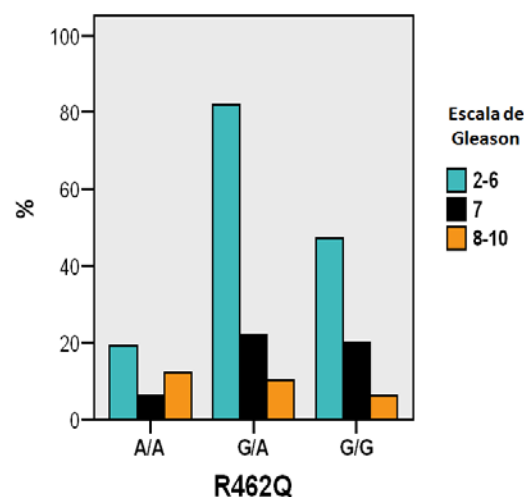


Figura 9: Escala de Gleason- Genotipos R462Q.

Con esto se ve que, los individuos con el genotipo A/A poseen básicamente cánceres regionales y metastásicos, mientras que los individuos con genotipos G/A y G/G cánceres principalmente locales según el estadio del tumor [34].

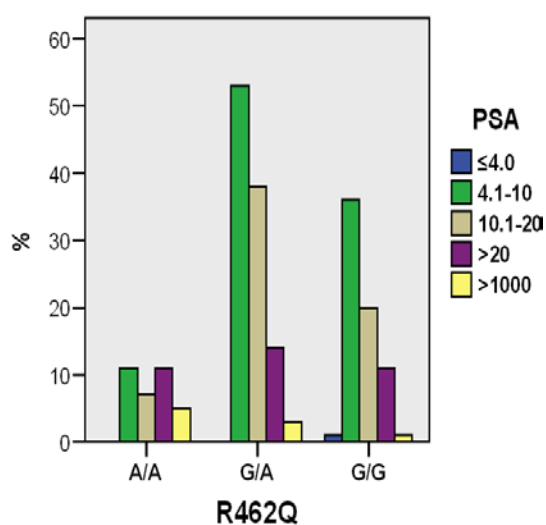


Figura 10: PSA- Genotipos R462Q.

Estos resultados se confirman si analizamos los datos sobre valores de PSA, para los que se ve que los individuos con genotipo A/A presentan proporciones más elevadas de los rangos de peor pronóstico como son valores mayores de 20 ng/mL y valores por encima de 1000 ng/mL. Del mismo modo, los individuos con este genotipo presentan bajos porcentajes de los valores de PSA

menos graves, que sin embargo se concentran con porcentajes entorno a un 60 y 40% en los individuos con genotipos G/A y G/G respectivamente.

Por lo tanto, se vuelve a corroborar que los pacientes con genotipo A/A presentan características de un cáncer de peor pronóstico y evolución.

Si realizamos una representación de los valores medios obtenidos de cada una de los parámetros clínicos y la ANOVA, se obtienen los mismos resultados. Es decir, en la variante R462Q el genotipo A/A se presenta en edades menos



avanzadas y posee los valores más elevados en las características clínicas analizadas (estadio del tumor, escala de Gleason y nivel de PSA). En contraposición, el genotipo homocigótico G/G se localiza en los valores de edad más elevados y valores más bajos dentro de las características clínicas analizadas en la población. Con todo ello, se puede pensar que los individuos de genotipo A/A tienen unas características más agresivas de este tumor, ya que aparecen a edades tempranas (dentro del rango característico de este cáncer) y las características clínicas de los mismos son de peor pronóstico como estadios 3 y 4; mayor porcentaje de valores de escala Gleason por encima de 6; y rangos de PSA 10 A 1000 ng/mL. (Para mayor detalle figuras 16-19).

Para el caso de la variante R462Q, estudios en el Norte de Estados Unidos (Detroit, Ohio y Michigan) un 38% de los individuos afectados por cáncer de próstata presentan genotipo G/G frente al 44% de controles; un 47% de pacientes con genotipo G/A frente al 45% en controles y un 15% de pacientes con genotipo A/A frente al 11% en controles [28]. En esta población estadounidense el genotipo más predominante en pacientes y controles es G/A al igual que ocurre en esta población europea. Sin embargo, en poblaciones europeas de países nórdicos como Suecia no se encuentra ninguna relación evidente entre pacientes y controles en esta región [2]. Otros estudios realizados en poblaciones europeas [18,28,35], indican similares resultados a los obtenidos en esta población, señalando que el genotipo homocigótico A/A, parece causar en la población europea una sustitución aminoacídica que genera una disminución enzimática. Epidemiológicamente se traduce en un aumento del riesgo a padecer cáncer de próstata, afectando a la progresión de este cáncer. Este riesgo se hace mucho mayor en poblaciones afroamericanas que en las hispano europeas para el genotipo A/A en comparación con el G/G [10].

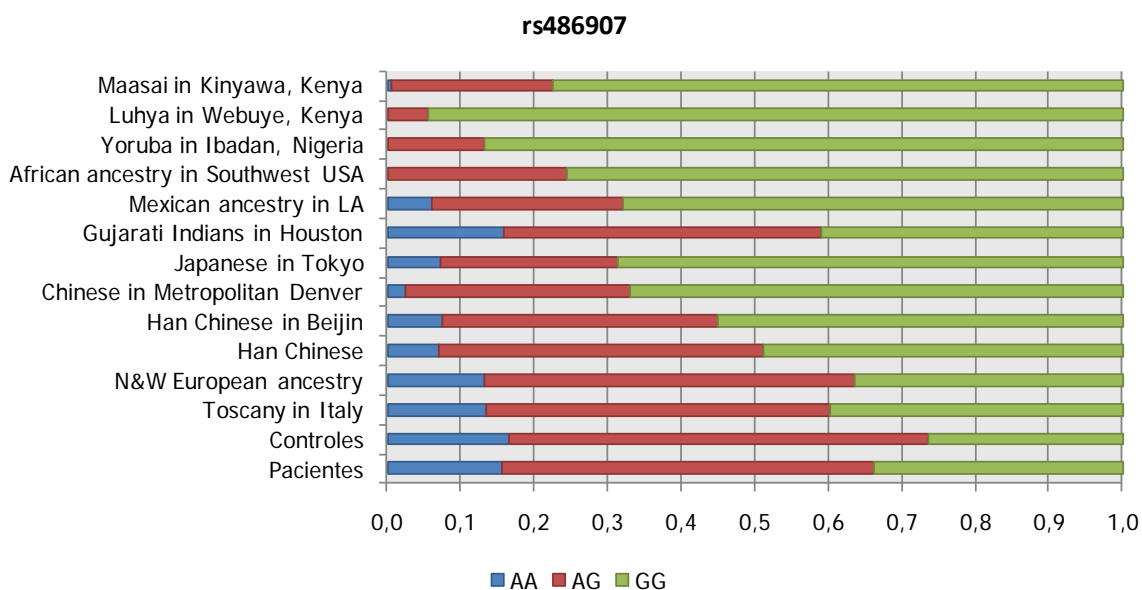
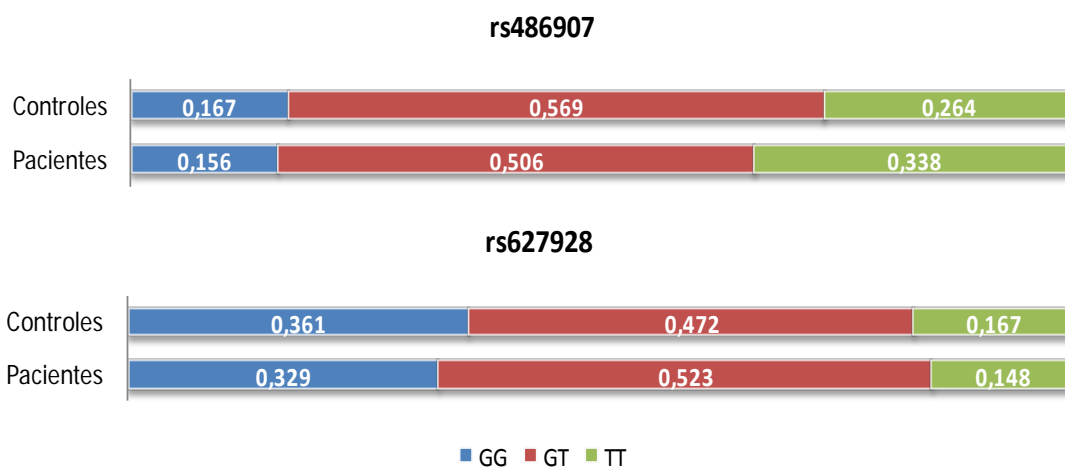


Figura 11: Distribución de los genotipos observados para la variante R462Q en diferentes poblaciones. Datos obtenidos de Hapmap III.

En ambos casos, tanto en la variante D541E (rs627928) como R462Q (rs486907) encontramos en la población control la presencia de las tres posibilidades genotípicas descritas para la cohorte de pacientes pero con porcentajes que difieren levemente de los pacientes.



Figuras 12 y 13: Representación del porcentaje en controles y pacientes de las variantes en rs486907 y rs627928.

### 3.3.197L

Mutación de tipo *missense* que parece ejercer un efecto importante en el cáncer de próstata aunque pocos estudios han conseguido resultados positivos que lo avalen [26].

En el caso de la variante 197L, la mayor parte de los pacientes presentan el genotipo A/A, sin embargo, también existe un bajo porcentaje de individuos con los genotipos A/G y A/C. Según los análisis estadísticos mediante el programa SPSS v.15.0 y las representaciones gráficas obtenidas del mismo, parece que la variante A/G posee inicialmente un peor pronóstico, ya que en ésta se concentran valores más elevados para determinados parámetros clínicos con escala de Gleason 7 y niveles de PSA que oscilan entre 10.1–20ng/mL.

Como vemos, la variante A/A es donde se concentra casi toda la población y por tanto, la mayor variedad de todas las características clínicas presentes. La variante A/G presenta bajo porcentaje poblacional pero con una características clínicas más agresivas, como menor edad, una escala Gleason elevada (7) y niveles PSA de 10.1–20ng/mL. Hay diferencias significativas entre el parámetro PSA, donde aparecen valores estadísticamente representativos con un  $\alpha = 0.002$ .

Se han realizado estudios en poblaciones alemanas y americanas [9,19] para la variante 197L y no encontrando ningún tipo de asociación entre esta mutación y el desarrollo del cáncer de próstata.

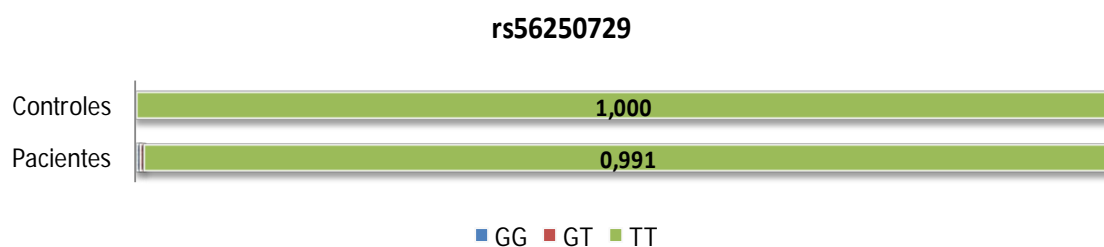


Figura 14: Representación del porcentaje en controles y pacientes de las variantes en rs56250729.

Como resumen poblacional descrito en la bibliografía hasta el momento sobre las variantes descritas en el gen RNASEL, podemos exponer el siguiente resumen en la Tabla 5.

Tabla 5: Resumen de las principales mutaciones en RNASEL en distintas poblaciones.

Variante	Población	Consideraciones
<b>471delAAAAG</b>	Descendiente de judíos Ashkenazi	-Implicado en predisposición cáncer de mama/ovario [17]. -No existe asociación en un riesgo elevado en cáncer de próstata [17,36].
<b>Met11Ile</b>	Afroamericanos	-Confiere un riesgo de cáncer de próstata, con mayor evidencia en casos tempranos [37].
<b>Glu265X (E265X)</b>	Familias finlandesas	-La edad media de aparición de la enfermedad (HPC) es 11 años menor que en los no portadores [20].
<b>Arg462Gln (R462Q) rs486907</b>	Familias finlandesas	-Los homocigotos muestran una asociación con HPC [20].
	Caucásicos hispanos y US	-El genotipo AA parece aumentar el riesgo de PC 4 veces al compararse con el genotipo GG [10].
	Afroamericanos	-El genotipo AA parece aumentar el riesgo de PC 10 veces al compararse con el genotipo GG [10][30].
	Caucásicos y japoneses	-El genotipo AA parece asociarse con una disminución en el riesgo de CP [15,29,36].
<b>Asp541Glu (D541E) rs627928</b>	Japoneses y americanos	-Los genotipos GG y TT se asociaron con un aumento de riesgo en PC [15,30,31].
	Suecos	-Asociación negativa significativa en los genotipos TT en CP [2].
	Caucásicos	-Asociados con un aumento de riesgo en CP [5].
<b>G59S</b>	Familias finlandesas	-Las frecuencias fueron significativamente diferentes en pacientes con PCH al compararse con controles [20].

## 4. CONCLUSIONES

Como vemos, debido a la gran prevalencia de esta patología junto con la gran diversidad genética descrita en la misma, hace que aún quede mucho por estudiar y describir. Sin embargo, mediante este estudio preliminar de factores clínicos y genéticos hemos podido observar que ambos pueden servir como información relevante sobre el control de este cáncer y nos permite encuadrarlo en un determinado grupo poblacional de mayor o menos riesgo. Además, se ha demostrado que en cada población, los datos genéticos tienen un valor pronóstico diferente. Este caso, se ha comprobado para el gen RNASEL; las distintas variantes descritas tienen diferente evolución clínica dependiendo de la población que está siendo analizada. Además, no son los mismos genotipos los que nos dirigen a un mismo tipo de evolución. Así, la información genética puede usarse como una herramienta importante para mejorar la evolución clínica de pacientes afectados por este cáncer. Pero debido a que hay muchas diferencias genéticas dependiendo de la población que está siendo analizada, no se puede olvidar nunca el componente poblacional a la hora de realizar el análisis genético.

Como hemos comprobado en este estudio, variantes que se han descrito cruciales en otras poblaciones parecen no ejercer ningún papel en la población europea que estamos analizando, ya que se han obtenido los mismos genotipos en individuos controles y en pacientes. Del mismo modo, las variantes D541E, R462Q y I97L, que hemos destacado en este estudio como relevantes en nuestra cohorte, no lo parecen en otros estudios realizados en distintos grupos poblacionales [2].

Además, saber que pacientes con un genotipo específico desarrollarán peores características de este cáncer, puede ayudar a enfocar un tratamiento clínico diferente con el que se evite una progresión rápida del cáncer y conseguir unas mejores calidades de vida al paciente. De esta forma, si sabemos que individuos con genotipos A/G, A/A y G/G en las variantes I97L, R462Q y D541E respectivamente presentan peores características clínicas y una evolución del tumor más rápida, se puede realizar un seguimiento más

controlado y menos espaciado en el tiempo que a individuos cuyos genotipos les confieren unas mejores características y una evolución del tumor menos agresiva.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] W.B. Isaacs, J. Xu, Linkage Studies of Prostate Cancer Families to Identify Susceptibility Genes. Second Edition ed., Human Press Inc, Totowa, New Jersey, 2007.
- [2] F. Wiklund, B.-. Jonsson, A.J. Brookes, L. Strömqvist, J. Adolfsson, M. Emanuelsson, et al., Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer, *Clinical Cancer Research*. 10 (2004) 7150-7156.
- [3] C. Bisbal, R.H. Silverman, Diverse functions of RNase L and implications in pathology. *Biochimie*. 89 (2007) 789-798.
- [4] M.S. Meyer, K.L. Penney, J.R. Stark, F.R. Schumacher, H.D. Sesso, M. Loda, et al., Genetic variation in RNASEL associated with prostate cancer risk and progression, *Carcinogenesis*. 31 (2010) 1597-1603.
- [5] H. Li, B.C. Tai, RNASEL gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res*. 12(19) (2006) 5713-5719.
- [6] R.H. Silverman. Implications for RNase L in Prostate Cancer Biology. *Biochemistry*. 42(7) (2003) 1805-1812.
- [7] W.C. Kima, C.H. Lee, The role of mammalian ribonucleases (RNases) in cancer. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. 1796 (2009) 99-113.
- [8] J. Castelli, K.A. Wood, R.J. Youle, The 2-5A system in viral infection and apoptosis. *Biomedecine & Pharmacotherapy*. 52 (1998) 386-390.
- [9] H. Rennert, C.M. Zeigler-Johnson, K. Addya, M.J. Finley, A.H. Walker, E. Spangler, et al., Association of susceptibility alleles in ELAC2/HPC2, RNASEL/HPC1, and MSR1 with prostate cancer severity in European American and African American men, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 14 (2005) 949-957.
- [10] S.J. Shook, J. Beuten, K.C. Torkko, T.L. Johnson-Pais, D.A. Troyer, I.M. Thompson, et al., Association of RNASEL variants with prostate cancer risk in Hispanic Caucasians and African Americans, *Clinical Cancer Research*. 13 (2007) 5959-5964.

- [11] J.C. Castelli, B.A. Hassel, A. Maran, J. Paranjape, J.A. Hewitt, X.L. Li, et al., The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ.* 5 (1998) 313-320.
- [12] A. Zhou, B.A. Hassel, R.H. Silverman, Expression cloning of 2-5A-dependent RNAase: A uniquely regulated mediator of interferon action, *Cell.* 72 (1993) 753-765.
- [13] A. Zhou, J. Paranjape, T.L. Brown, H. Nie, S. Naik, B. Dong, et al., Interferon action and apoptosis are defective in mice devoid of 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *Embo J.* 16 (1997) 6355-6363.
- [14] H. Rennert, D. Bercovich, A. Hubert, D. Abeliovich, U. Rozovsky, A. Bar-Shira, et al., A Novel Founder Mutation in the RNASEL Gene, 471delAAAG, Is Associated with Prostate Cancer in Ashkenazi Jews. *Am. J. Hum. Genet.* 71 (2002) 981-984.
- [15] H. Nakazato, K. Suzuki, H. Matsui, N. Ohtake, S. Nakata, H. Yamanaka, Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on familial prostate cancer risk in a Japanese population. *Br J Cancer.* 89 (2003) 691-696.
- [16] A. Orr-Urtreger, A. Bar-Shira, d. Bercovich, N. Matarasso , U. Rozovsky, S. Rosner, et al., RNASEL Mutation Screening and Association Study in Ashkenazi and Non-Ashkenazi Prostate Cancer Patients., *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 15 (2006) 474.
- [17] E. Dagan, Y. Laitman, N. Levanon, A. Feuer, A.A. Sidi, J. Baniel, et al., The 471delAAAG mutation and C353T polymorphism in the RNASEL gene in sporadic and inherited cancer in Israel, *Familial Cancer.* 5 (2006) 389-395.
- [18] J. Carpten, N. Nupponen, S. Isaacs, a. et, Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1. *Nat Genet.* 30 (2002) 181-184.
- [19] C. Maier, J. Haeusler, K. Herkommer, Z. Vesovic, J. Hoegel, W. Vogel, et al., Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene, *Br.J.Cancer.* 92 (2005) 1159-1164.
- [20] A. Rökman, T. Ikonen, E.H. Seppälä, N. Nupponen, V. Autio, N. Mononen, et al., Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at



1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet.* 70(5) (2002) 1299-1304.

[21] T. Visakorpi, The molecular genetics of prostate cancer. *UROLOGY.* 62 (2003) 3-10.

[22] B. Dong, R.H. Silverman. Alternative function of a protein kinase homology domain in 2',5'-oligoadenylate dependent RNase L. *Nucleic Acids Res.* 27 (1999) 439-445.

[23] F. Wiklund, B.A. Jonsson, A.J. Brookes, L. Strömquist, J. AdolfssoN, M. Emanuelsson, et al., Genetic Analysis of the *RNASEL* Gene in Hereditary, Familial, and Sporadic Prostate Cancer., *Clinical Cancer Research.* 10 (2004) 7150-7156.

[24] B.L. Chang, W. Liu, J. Sun, a. et, Integration of somatic deletion analysis of prostate cancers and germline linkage analysis of prostate cancer families reveals two small consensus regions for prostate cancer genes at 8p., *Cancer Res.* 67 (2007) 4098-4103.

[25] B.E. Madsen, E.M. Ramos, M. Boulard, K. Duda, J. Overgaard, M. Nordmark, et al. Germline Mutation in *RNASEL* Predicts Increased Risk of Head and Neck, Uterine Cervix and Breast Cancer. *PLoS ONE.* 3(6) (2008) e2492.

[26] Y. Xiang, Z. Wang, J. Murakami, Effects of RNase L mutations associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates. *Cancer Res.* 63(20) (2003) 6795-6801.

[27] H. Chen, A.R. Griffin, Y.Q. Wu, L.P. Tomsho, K.A. Zuhlke, E.M. Lange, et al. *RNASEL* mutations in hereditary prostate cancer. *J Med Genet.* 40 (2003) e21.

[28] G. Casey, P.J. Neville, S.J. Plummer, Y. Xiang, L.M. Krumroy, E.A. Klein, et al. *RNASEL* Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nature genetics.* 32 (2002) 581-583.

[29] L. Wang, S.K. McDonnell, D.A. Elkins, S.L. Slager, E. Christensen, A.F. Marks, et al., Analysis of the *RNASEL* gene in familial and sporadic prostate cancer, *Am.J.Hum.Genet.* 71 (2002) 116-123.

[30] J. Beuten, J.A.L. Gelfond, J.L. Franke, S. Shook, T.L. Johnson-Pais, I.M. Thompson, et al., Single and multivariate associations of *MSR1*, *ELAC2*, and

RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 19 (2010) 588-599.

[31] F.C. Noonan-Wheeler, W. Wu, K.A. Roehl, A. Kim, J. Haugen, B.K. Suarez, et al., Association of hereditary prostate cancer gene polymorphic variants with sporadic aggressive prostate carcinoma. *Prostate*. 66 (2006.) 49-56.

[32] C. Allepuz-Losa, A. Borque-Fernando, L.A. Rioja-Sanz, Cuál es el algoritmo diagnóstico más apropiado para el cribado del cáncer de próstata?, *Actas Urol Esp*. 29(5) (2005).

[33] D.M. Altshuler, R.A. Gibbs, L. Peltonen, E. Dermitzakis, S.F. Schaffner, F. Yu, et al., Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations, *Nature*. 467 (2010) 52.

[34] W. Dyckes, *Cáncer de próstata*. 2011 (2006).

[35] B.R. Packer, a. et, Cancer: a public resource for sequence validation, assay development, and frequency analysis for genetic variation in candidate genes. *Nucleic Acids Res*. 34 (2006) 617-621.

[36] I. Agalliu, S.M. Leanza, L. Smith, J.M. Trent, J.D. Carpten, J.E. Bailey-Wilson, et al., Contribution of HPC1 (RNASEL) and HPCX variants to prostate cancer in a founder population, *Prostate*. 70 (2010) 1716-1727.

[37] J. Simard, M. Dumont, D. Labuda, D. Sinnett, C. Meloche, M. El-Alfy, et al., Prostate cancer susceptibility genes: Lessons learned and challenges posed, *Endocr.Relat.Cancer*. 10 (2003) 225-259.

[38] G. Claros, V. Saladrigas, D. González-Halphen. Vocabulario inglés-español de bioquímica y biología molecular (3.<sup>a</sup> entrega). *Panace@*. 4 (12) (2003).

## ANEXO

### • TERMINOLOGÍA ESPECÍFICA DE ESTE CAPÍTULO

#### Tablas sobre códigos de mutaciones usados:

Tabla 1 Anexo- Código IUPAC ADN.

Código Nucleotídico	Base	Código Nucleotídico	Base
<b>A</b>	Adenina	<b>W</b>	A o T
<b>C</b>	Citosina	<b>K</b>	G o T
<b>G</b>	Guanina	<b>M</b>	A o C
<b>T</b>	Timina	<b>B</b>	C o G o T
<b>U</b>	Uracilo	<b>D</b>	A o G o T
<b>R</b>	A o G	<b>H</b>	A o C o T
<b>Y</b>	C o T	<b>V</b>	A o C o G
<b>S</b>	G o C	<b>N</b>	Cualquier base

Tabla 2 Anexo- Código IUPAC Proteínas.

Código aminoácido	Código en 3 letras	Aminoácido
<b>A</b>	Ala	Alanina
<b>B</b>	Asx	Acidos Aspartico o Asparragina
<b>C</b>	Cys	Cisteína
<b>D</b>	Asp	Ácido Aspártico
<b>E</b>	Glu	Ácido Glutámico
<b>F</b>	Phe	Fenilalanina
<b>G</b>	Gly	Glicina
<b>H</b>	His	Histidina
<b>I</b>	Ile	Isoleucina
<b>K</b>	Lys	Lisina
<b>L</b>	Leu	Leucina
<b>M</b>	Met	Metionina
<b>N</b>	Asn	Asparagina
<b>P</b>	Pro	Prolina
<b>Q</b>	Gln	Glutamina
<b>R</b>	Arg	Arginina
<b>S</b>	Ser	Serina
<b>T</b>	Thr	Treonina
<b>V</b>	Val	Valina
<b>W</b>	Trp	Triptófano
<b>X</b>	Xaa	Ningún aminoácido
<b>Y</b>	Tyr	Tirosina
<b>Z</b>	Glx	Glutamina o Ácido Glutámico

**Definiciones de mutaciones:**

**Mutación missense:** Es un tipo de mutación aminoacídica puntual que cambia un codón codificante (*sense codon*) por otro que especifica un aminoácido distinto en el ARNm transcrito. La proteína correspondiente contendrá, pues, un aminoácido diferente del original y ello afectará a su función según el sitio en que se produjo la mutación y la naturaleza del reemplazo de aminoácidos. Cualquier sustitución de aminoácidos constituye una *missense mutation*, pero en la práctica éstas sólo se manifiestan fenotípicamente si producen una modificación de la actividad de la proteína [38].

**Mutación null:** Mutación que produce un cambio a nivel de síntesis, este tipo de cambio es fenotípico y no produciendo la proteína.

Mutación IDEL: indica una variación en el genoma por inserción o delección. En el caso descrito en este capítulo se refiere a una delección (Del 471 AAAG).

## **CAPÍTULO 2**

**Búsqueda de la relación en las mutaciones de los  
Genes ELAC2 y MSR1 con el cáncer de próstata  
esporádico**

### ABSTRACT

In addition to RNASEL gene, other nuclear genes like ELAC2 and MSR1 among others, which seem to have an important role in the development of prostate cancer. ELAC2 gene (elaC homolog 2 (*E. coli*)) is also known as HPC2 (Hereditary prostate cancer gene 2). There are at least 23 variants of this gene which make an effect in the developing of prostate cancer. There are a wide range of nonsense and missense mutations, as well as intronic and exonic changes. The main mutations in most populations are Ser217Leu and Ala541Thr. In our cohort analyzed we found statistical significances in all the variants of ELAC2 between patients and controls and a sketch of prevalence is noted among patients. In this analysis, it has been demonstrated that individuals with GA, TT, GG and GG genotypes in the SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 and rs4792311 respectively in ELAC2 gene have worst clinical features and faster progression of the tumor than other genotypes. In contrast, patients with genotypes GG, CC, AA and AA in SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 and rs4792311 respectively in ELAC2 gene have a better clinical evolution of the cancer.

MSR1 gene is the alias of macrophage scavenger receptor 1. Similar results than previous ones have been obtained when analyzing statistically clinical features in patients. In this case patients with CC, GG, AA, GG and GG genotypes in the SNPs rs12718376, rs918, rs1904577, rs2127565 and rs3747531 respectively, are linked to severe clinical features like C and D stages, Gleason scores above 7 and PSA levels higher than 4.1 ng/mL. In comparison to those results, genotypes TT, AA and GG are related to better clinical characteristics in rs12718376, rs918 and rs1904577. Apart from prostate cancer, this gene has also been implicated in many macrophage-associated physiological and pathological processes including atherosclerosis, Alzheimer's

disease, and host defence. The main function of this gene is related to be membrane glycoprotein which is implicated in the pathologic deposition of cholesterol in arterial walls during atherogenesis.

Both genes have been processed using the technique of TaqMan® SNP Genotyping Assays (Applied Biosystem), which allows obtaining the data of the different SNPs in a quick and reliable way. Finally, we have compared the results in our population of Andalucía with the clinical parameters and others populations around the world by using previous studies published in Hapmap.

## 1. INTRODUCCIÓN

Debido a la complicada etiología de este cáncer, se les atribuyen a los marcadores genéticos un papel bastante relevante en su desarrollo. Cuando se habla de susceptibilidad genética del cáncer de próstata, se destacan como genes más relevantes algunos como BRCA 1 y el BRCA 2 (genes típicamente relacionados con el desarrollo del carcinoma de mama y de ovario). Sin embargo, los candidatos nombrados como de alto riesgo son el gen ELAC2 (situado en el cromosoma 17p11); RNASEL (localizado en el cromosoma 1q22) y MSR1 (en la región 8p) [1].

Al igual que en otras enfermedades, la búsqueda de genes que influyan en el desarrollo del cáncer se realiza mediante estudios de *linkaje*. En el cáncer de próstata el objetivo principal no era otro que buscar genes de susceptibilidad considerados como raros y con una alta penetrancia. Debido al desarrollo de esta búsqueda a lo largo de muchos años, hoy en día tenemos gran información de posibles genes que pueden actuar en el desarrollo de este adenocarcinoma [2]. La Tabla 1 muestra un resumen de todos los genes candidatos descritos.

Tabla 1. Representación esquemática de los principales loci estudiados para el cáncer de próstata [2].

<b>Locus</b>	<b>Localización cromosómica</b>	<b>Gen candidato</b>
<b>HPC1</b>	1q24-q25	RNASEL
<b>PCAP</b>	1q42.2-q43	No existe
<b>CAPB</b>	1p36	No existe
<b>HPCX</b>	Xq27-q28	No existe
<b>HPC2</b>	17p11	ELAC2
<b>HPC20</b>	20q13	No existe
<b>8p</b>	8p21-p23	MSR1
<b>3p</b>	3p25-p26	No existe
<b>8q</b>	8q24	No existe



### 1.1. GEN ELAC 2 (HPC2)

El gen ELAC 2 se denomina también como HPC2 (gen del cáncer de próstata hereditario 2) por analogía al gen RNASEL o HPC1. Tiene una secuencia variante del homólogo *elaC 2* en *Escherichia coli*. Se localiza en el cromosoma 17p11 y posee una longitud de 27kb codificando para 24 exones y para una proteína de 826 aminoácidos con función 3' tRNasa [2]. Partes de este gen se encuentran muy conservadas en varias especies tan divergentes como arqueas y humanos [3].

Mediante estudios de asociación familiar ha sido identificado como un gen que confiere riesgo a desarrollar cáncer de próstata con identificación de una serie de mutaciones que parecen ser las responsables de este hecho. Inicialmente, se le atribuía la codificación de una hidrolasa metal-dependiente evolutivamente conservada, lo que parecía a su vez lógico con el desarrollo del cáncer de próstata. Esta hidrolasa podía explicar cómo los factores medioambientales afectaban por interacción con las células epiteliales prostáticas humanas. Sin embargo, actualmente se piensa que el papel fundamental lo ejerce por la codificación de una endorribonucleasa 3', una enzima encargada de eliminar la región 3' del precursor de ARNt y poder interactuar con la  $\gamma$ -tubulina, que es un componente del aparato mitótico lo que establece una unión entre el gen ELAC2 y el control del ciclo celular [4]. Esta enzima, mediante la actividad 3' tRNasa; posee una función esencial para la biosíntesis del ARNt. Su función en relación con la transcripción, replicación y segregación del ADN así como, regulación del ARNm y se describe por la similitud con la secuencia aminoacídica de otras proteínas que actúan en regiones 3' del ARNm o factores específicos de poliadenilación [5].

Los productos génicos guardan una cierta similitud en la secuencia aminoacídica con dos familias proteicas, la denominada PSO2 y SNM1, proteínas de reparación intercatenaria de *crosslinking* en el ADN y la subunidad de 73 kD del ARNm 3' del factor específico de poliadenilación (CPSF73) [6].

Las mutaciones en ELAC2 no son muy comunes, sin embargo, del análisis de la secuencia de ELAC2 podemos identificar cambios *missense* como piensa que las principales mutaciones (en concreto las tipo *nonsense* o de generación

de proteína truncada) afectan principalmente impidiendo la actividad de esta enzima, lo que desencadena la progresión del cáncer.

Ciertos estudios atribuyen entre un 2% y un 5% de las causas del cáncer de próstata a las diversas mutaciones del gen ELAC2 [7].

## 1.2. VARIANTES DEL GEN ELAC2

Diversos estudios realizados en casos de cáncer de próstata hereditario y esporádico han señalado variaciones o alteraciones en el gen ELAC2 (HPC2) que parecen jugar un determinado papel en la susceptibilidad genética de este cáncer. De hecho, se han descrito actualmente hasta 23 variantes que ejercen algún tipo de efecto en el desarrollo del cáncer de próstata. Dentro de estas alteraciones, existen tanto cambios intrónicos como exónicos (mutación de proteína truncada, mutación *nonsense* y tipo *missense*) [8].

Como se ha citado anteriormente, las mutaciones Ser217Leu y Ala541Thr destacan como alteraciones que más afectan al desarrollo y progresión del cáncer de próstata al igual que se presentan en un mayor número de poblaciones.

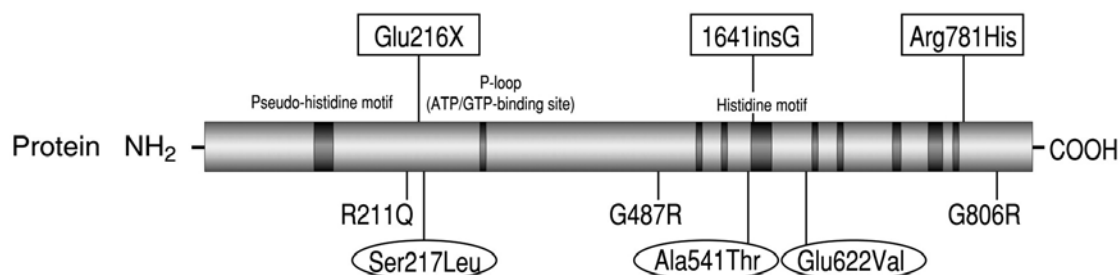


Figura 1: Imagen que representa esquemáticamente las principales mutaciones en el gen ELAC2 [9].

- 1641insG: mutación denominada *frameshit* o de cambio del marco de lectura. Esta mutación junto con la mutación Arg781His se han descrito en dos pedigríes en una población de EEUU [7].
- rs119484086 (Arg781His): mutación *missense* considerada como rara en el cáncer de próstata [7].

- rs4792311 (Ser217Leu): mutación tipo *missense* que se localiza en el segmento hidrofílico de la secuencia proteica y la sustitución del residuo hidrofóbico de Leucina puede alterar la estructura proteica [10]. Se observa una gran variedad de esta mutación en las distintas etnias, así en una población asiática tomada como grupo control ocupa un 1.94%, mientras que al tomar la población caucásica como grupo control representa un porcentaje de 29.01%. El alelo Leu217 es indicado según los estudios de Xu, B. et al [10] como asociado a un aumento de riesgo de cáncer de próstata al compararse con el alelo Ser217 en poblaciones caucásicas y asiáticas. Otros estudios destacan una incidencia de un 30% tanto en la población americana de europeos descendientes como en la población afroamericana [3]. Esta mutación parece disminuir la expresión proteica, alterando la función de ELAC2 [10].
- rs5030739 (Ala541Thr): mutación tipo *missense* en la que según los estudios de Xu, B. et al [10], el alelo Thr541 se asocia con un mayor riesgo a padecer cáncer de próstata si se compara con el alelo Ala541, y además este riesgo parece aumentado en poblaciones asiáticas. Al igual que ocurría con la mutación Leu217, en este caso la mutación Thr541 parece disminuir la expresión proteica alterando la función de ELAC2. Sin embargo, esta mutación se presenta con un rango de incidencia menor que oscila entre un 3% y un 4% en la población americana de descendientes europeos y un 1% en la población afroamericana [3].
- rs119484087 (Glu622Val): se han descrito individuos homocigotos portadores de esta mutación *missense* diagnosticados con cáncer de próstata en una edad altamente joven, de 45 años (edad temprana si consideramos los parámetros normales de esta enfermedad) [11].
- rs11545302 (Thr520Thr) y rs17552022 (Thr631Thr): en ambas mutaciones se han descrito cambios de la base A → G y T, produciendo un cambio de residuo aminoacídico de Thr. Ambos SNPs rs11545302 localizado en el exón 17 y rs17552022 situado en el exón 20 del gen ELAC2 han demostrado ejercer un riesgo significativo en cáncer de próstata en poblaciones caucásicas [12].

Las tres mutaciones más relevantes en el gen ELAC2 con respecto al cáncer de próstata son las mutaciones Ser217Leu, Ala541Thr y Arg781His. Similar a como ocurría en el gen RNASEL, existe una gran controversia entre el efecto de estas mutaciones y el desarrollo del cáncer de próstata. Hay quienes atribuyen un papel claro a las mutaciones *missense* Ser217Leu y Ala541Thr. Sin embargo, hay quienes contradicen esa asociación, como ocurre en los estudios realizados en poblaciones de Reino Unido donde estadísticamente no se encuentran diferencias significativas entre la población control y la afectada por cáncer de próstata [13,14].

Según estudios realizados por Vesprini et al [15]; en diferentes poblaciones subdivididas en controles y casos existen una serie de diferencias entre las distintas etnias y las mutaciones descritas en ELAC2 (Ver detalles en Tabla 2).

Tabla 2: Prevalencia de las variantes alélicas en el gen ELAC2 en distintos grupos étnicos (casos – controles).

<b>Polimorfismos y Etnias</b>	<b>Casos</b>	<b>Controles (Varones)</b>	<b>Controles (Mujeres)</b>	<b>Controles (Combinado)</b>
<b><i>Ser217Leu</i></b>				
<b>Pob. blanca</b>	197 (52.0%)	227 (54.7%)	380 (51.1%)	607 (52.4%)
<b>Pob. negra</b>	11 (29.7%)	18 (36.7%)	32 (38.6%)	50 (37.9%)
<b>Pob. asiática</b>	2 (20.0%)	5 (11.9%)	11 (13.1%)	16 (12.1%)
<b>Otros grupos poblacionales</b>	1 (20.0%)	4 (57.1%)	47 (57.3%)	51 (57.3%)
<b><i>Ala541Thr</i></b>				
<b>Pob. blanca</b>	27 (7.1%)	34 (8.2%)	49 (6.6%)	83 (7.2%)
<b>Pob. negra</b>	0	0	0	0
<b>Pob. asiática</b>	0	0	4 (4.8%)	4 (3.2%)
<b>Otros grupos poblacionales</b>	0	1 (14.3%)	9 (11.0%)	10 (11.2%)

Pob.: siglas de población.

Como observamos del estudio de Vesprini et al. [15], no existen diferencias significativas para estas variantes analizadas. Un dato que nos ha llamado la atención es el hecho de que la población negra (según palabras del Vesprini) no posee presencia de la mutación Ala541Thr, siendo esta población una de las más destacadas y susceptibles a padecer cáncer de próstata. Sin embargo, también tenemos que destacar que este estudio carece de un gran número de réplicas lo que hace que no sea altamente representativo.

### 1.3. GEN MSR1

Se ha comprobado una estrecha relación entre el cáncer de próstata y una pérdida de heterocigosidad (LOH) en el brazo corto del cromosoma 8. A raíz de esta observación diversos autores como Xu et al., Visakorpi et al. y Cunningham et al., entre otros, realizaron estudios de linkaje en diversas familias génicas en la región 8p, encontrando cosegregación entre esta patología y el gen MSR1 en la región 8p22 [2].

Este gen recibe sus siglas de *Macrophage scavenger receptors*, en concreto codifica para los receptores de macrófagos tipo *scavenger* de clase A. Estos receptores de macrófagos han sido también relacionados con patologías tan diversas como el Alzheimer, la arterioesclerosis, y la xantomatosis. En esta cascada de señales parece que los receptores scavenger (SR) se unen a las células apoptóticas pudiendo intervenir en procesos de apoptosis celular [16].

#### **Receptores de macrófagos tipo *scavenger***

Por su traducción del inglés también se les conoce como receptores basureros o barredores. Son una familia de glicoproteínas de superficie celular caracterizadas por poder unir a lipoproteínas modificadas (oxidadas o acetiladas). Se diferencian principalmente tres tipos de receptores SR, los de clase A, los de clase B y los de clase C; pero también se han encontrados otros como los de clase E (LOX 1), los de clase F (SREC-I SREC-II), los de clase G (SR-PSOX) y los de clase D (CD 68). Podemos establecer a su vez subclases, así

dentro de los de clase A diferenciamos a su vez los tipos 1 y 2, en la clase B diferenciamos los CD36 [17].

Los receptores scavenger clase A, se conocen con las siglas SR-A y según sean de tipo 1 ó 2 se describirán como SR-A1 ó SR-A2. Estructuralmente son trímeros de un peso molecular que oscila entre 205 y 220 kDa. Principalmente unen a LDL modificado por ácido acético u oxidado y poseen un dominio tipo colágeno, lo que les proporciona su función esencial como unión de ligando. Como ejemplos de algunos de los componentes de esta clase destacamos:

- SR-A1 (SCARA1) o MSR1: poseen un dominio rico en cisteína y se pueden encontrar en algunos receptores de membrana o en proteínas solubles.
- SR-A2 (SCARA2) o MARCO: poseen dominios ricos en colágeno y cisteína.

Podríamos señalar también otros tipos, pero de menor importancia como son SCARA3, SCARA4 o COLEC12 y SCARA5 [18,19].

Entre los receptores scavenger clase B se encuentran en los receptores CD36 y SCARB1 y principalmente se concentran en caveolas. La función principal de SCARB1 es la interacción con HDL y LDL, mientras que CD36 (o SCARB3) está involucrado en la adhesión celular, metabolismo de los ácidos grasos y fagocitosis de células apoptóticas [17,20].

Los receptores scavenger clase C, son receptores con dominios similares a la mucina [17].

#### **1.4. VARIANTES DEL GEN MSR1**

- Arg293X: Mutación tipo *nonsense* descrita por primera vez por Xu et al., en estudios familiares de individuos afectados por cáncer de próstata todos de descendientes europeos [21]. Parece específica de individuos afectados por carcinoma prostático distinto del tipo hereditario. La mutación de proteína truncada Arg293X produce la delección de la mayor parte de los dominios de colágeno, incluyendo la región de unión al ligando y los dominios ricos en cisteína.

Asp175Tyr: mutación tipo *missense* y descrita por primera vez en estudios familiares de individuos de raza afroamericana [21]. Se ha observado que esta mutación conforma una secuencia crucial de heptapéptidos 173IDEISKS en el dominio helicoide del receptor MSR1 que actúa como punto funcional de acción para la correcta polimerización de las tres cadenas que conforman el receptor MSR1[21].

- rs12718376: se localiza en el extremo 3' de la región no traducida del gen MSR1. Se caracteriza por ser una de las regiones del gen MSR1 que representa un mayor aumento de riesgo de cáncer de próstata entre la población caucásica [12].
- rs918, rs1904577: mutaciones en la que no hay mucho descrito pero en los casos analizados, se determina un cambio de A → G [21].
- rs2127565: al igual que en los casos anteriores, se trata de una mutación en la que no hay mucho descrito pero en los casos analizados, se determina un cambio de C a G [21].
- rs3747531 (Ala275Pro): mutación en la que se determina un cambio de C a G y un cambio aminoacídico de prolina a alanina [21,22] .
- Se han descrito también mutaciones como His441Arg; Val113Ala e Ile54Val. De estas mutaciones no existe mucha información a parte de una posible influencia en el desarrollo y progresión del cáncer de próstata [21].

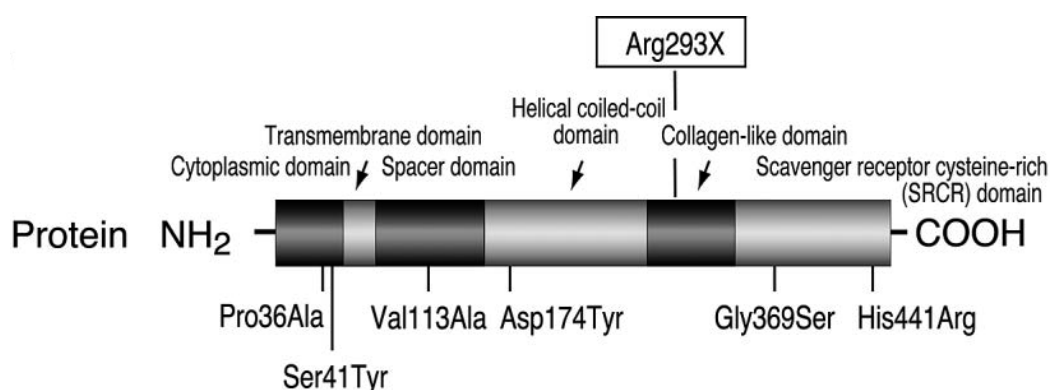


Figura 2: Imagen que representa esquemáticamente las principales mutaciones en el gen MSR1 [1].

## **2. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **2.1. ANÁLISIS GENÉTICOS**

Debido a que las muestras estaban almacenadas y analizadas para otras regiones génicas, ya cumplían con los requisitos de codificación establecidos a la hora de trabajar con muestras biológicas humanas.

El objetivo del análisis de estas regiones cromosómicas es poder realizar el genotipado de los SNPs de interés en los genes ELAC2 y MSR1.

Para ello, actualmente disponemos de varias herramientas que nos permiten obtener información de SNPs, como son SNaPshot (o minisequenciación) y la técnica de TaqMan® SNP Genotyping Assays de Applied Biosystem. La mayoría de las muestras analizadas en este proyecto se han procesado mediante la metodología de TaqMan® SNP Genotyping Assays de Applied Biosystem, sin embargo, algunas muestras no se han podido caracterizar usando esta técnica y se ha realizado un procedimiento de amplificación de la región de interés y posterior secuenciación.

### **2.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

De forma análoga a los estudios realizados en el capítulo 1, mediante el programa estadístico SPSS v.15.0 se han realizado los análisis de estadísticos descriptivos en tablas de contingencia, método de Chi cuadrado, test de Monte Carlo y test exacto de Fisher. A través de estos test se realizaron comparaciones entre cada locus y los datos de información clínica (PSA, edad, estadio y escala de Gleason). También se realizaron test estadísticos de ANOVA (análisis de la varianza) con el fin de comprobar una asociación entre pacientes y alguna de las características clínicas analizadas. Del mismo modo, se comprobó el equilibrio de Hardy-Weinberg para cada variante genética y el análisis de desequilibrio de linkaje entre cada variante genética de los loci de los genes ELAC2 y MSR1 mediante el software ARLEQUIN v.3.5.



Mediante el uso de los mismos tests estadísticos se estudiaron los distintos parámetros clínicos dentro de la población de pacientes, usando la base de datos de Hapmap.

En todo momento se tomaron como valores estadísticamente significativos aquellos con un p-valor  $\leq 0.05$ , si tomamos como valor de significación  $p = 0.05$ .

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al estar estudiando una serie de variantes en dos genes, se van a exponer los resultados en cada uno de ellos.

#### 3.1. GEN MSR1

De todas las variantes cubiertas en el proceso de genotipado del gen MSR1 en este estudio, no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre controles y pacientes en rs918 y rs2127565. Regiones como rs12718376 y rs3747531 se encuentran con valores próximos a la significatividad y el rs1904577 es estadísticamente significativo (Tabla 3).

Tabla 3. Representación de las mutaciones analizadas en el gen MSR1 en controles y pacientes.

Mutación	Genotipos y porcentajes PACIENTES	Genotipos y porcentajes CONTROLES	p-value
<b>rs12718376</b> <b>*366A&gt;G</b> <b>(3'UTR)</b>	60.8% CC 33.2% CT 6.0% TT	67.2% CC 22.4% CT 10.4% TT	0.071
<b>rs918</b> <b>*516G&gt;A</b> <b>(3'UTR)</b>	1.3% AA 14.7% AG 84.0% GG	1.5% AA 13.4% AG 85.1% GG	0.478
<b>rs1904577</b> <b>(región intrónica)</b>	66.7% AA 24.7% AG 8.7% GG	49.2% AA 23.8% AG 27.0% GG	≤0.001
<b>rs2127565</b> <b>(región intrónica)</b>	12.1% CC 17.9% CG 70.0% GG	14.3% CC 20.6% CG 65.1% GG	0.760
<b>rs3747531</b> <b>Ala275Pro</b>	7.6% CC 4.0% CG 88.4% GG	1.5% CC 2.9% CG 95.6% GG	0.059

- **rs12718376**

Para este caso podemos observar que en la población de controles el genotipo predominante es el CC, seguido del genotipo CT y TT respectivamente. Al realizar un análisis estadístico de Chi<sup>2</sup> de Pearson obtenemos un p-valor 0.071; lo que significa que las diferencias entre controles y pacientes no son estadísticamente significativas pero sí es próximo a la significatividad.

Si comparamos los resultados de nuestra población (representados en la Figura 3 como controles y pacientes) con los obtenidos en otras poblaciones, vemos que los parámetros genéticos obtenidos en España son similares a los obtenidos en regiones europeas como Italia y descendientes del Norte y Oeste Europeo; mientras que divergen de regiones más alejadas geográficamente como Kenya o China (Figura 3). Hecho congruente con lo que se refleja en el trabajo de Beuten et al., en el cual este SNP se destaca como uno de los que confiere un mayor riesgo entre la población caucásica con un *odds ratio* (OR) de 0.32 [12].

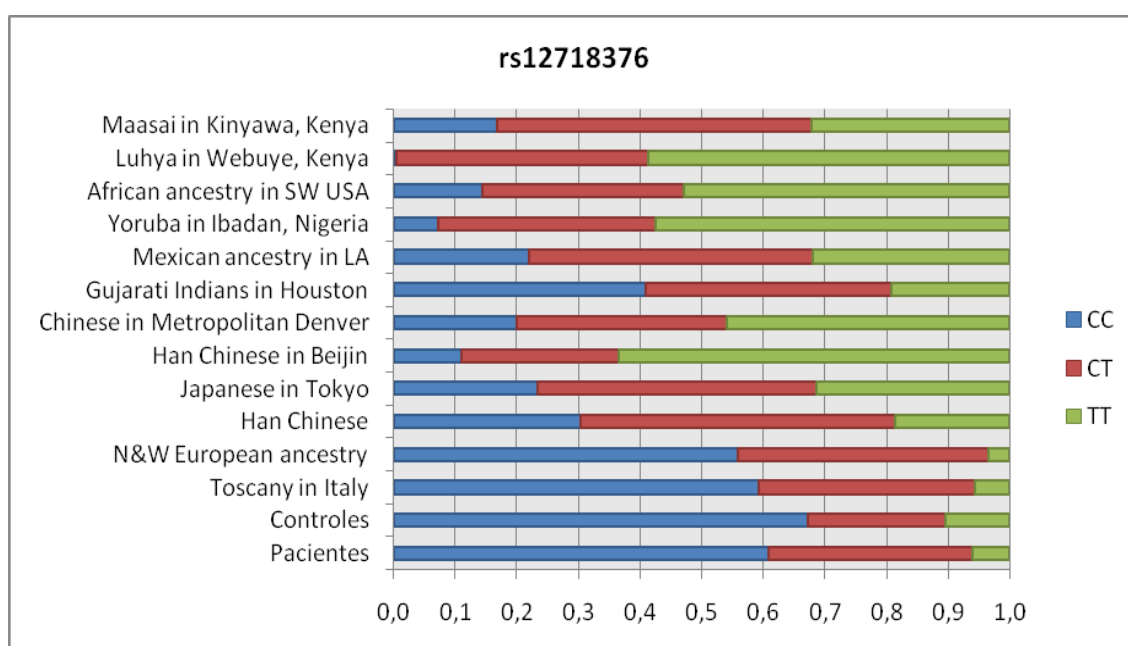


Figura 3: Comparación poblacional de individuos afectados de cáncer de próstata en diferentes poblaciones del mundo.

Al analizar las características clínicas de los pacientes en nuestra población mediante el programa estadístico SPSS v15.0, obtenemos los resultados resumidos en la tabla 4. Como se puede observar, aunque ninguna variable clínica es estadísticamente significativa para este marcador en pacientes se sigue un patrón de distribución de los valores. De tal forma que el genotipo CC posee concentrados los valores más elevados de estadio B, C y D al compararse con CT y TT. El mismo patrón se repite en el genotipo CC con los parámetros clínicos de PSA (valores por encima de 4 ng/mL) y escala Gleason

(valores por iguales y/o mayores de 7). De igual forma, las edades más tempranas desde inferiores de 55 a 60 años se encuentran en un porcentaje más elevado en este genotipo.

Tabla 4. Resultados estadísticos de la variante rs12718376 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante C/C FO-FE - %	Variante C/T FO-FE- %	Variante T/T FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	24-23.4-10.6%	11-12.2-4.8%	3-2.3-1.3%	0.920
Edad 56-60	68-67.8-30.0%	34-35.4-15.0%	8-6.8-3.5%	
Edad 61-65	40-40.7-17.6%	23-21.2-10.1%	3-4.1-1.3%	
Edad > 65	8-8-3.5%	5-4.2-2.2%	0-0.8-0.0%	
<b>ESTADIO</b>				
A	5-5.5-2.2%	3-2.9-1.3%	1-0.6-0.4%	0.435
B	90-87.7-40.0%	47-46.4-20.9%	6-8.9-2.7%	
C	30-30.1-13.3%	16-15.9-7.1%	3-3-1.3%	
D	13-14.7-5.8%	7-7.8-3.1%	4-1.5-1.8%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	1-0.6-0.5%	0-0.3-0.0%	0-0.1-0.0%	0.545
4.1-10	63-61.2-30.1%	30-33.5-14.4%	7-5.3-3.3%	
10.1-20	43-39.2-20.6%	19-21.4-9.1%	2-3.4-1.0%	
>20	20-25.7-9.6%	20-14.1-9.6%	2-2.2-1.0%	
>1000	1-1.2-0.5%	1-0.7-0.5%	0-0.1-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
2-6	91-90.1-41.0%	48- 48.3-21.6%	8-8.6-3.6%	0.248
7	31-29.4-14.0%	16-15.8-7.2%	1-2.8-0.5%	
8-10	14-16.5-6.3%	9-8.9-4.1%	4-1.6-1.8%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs12718376.

NOTA: Como lo que nos resulta de interés es conocer los rasgos en la población de pacientes hemos representado solo los datos estadísticos referidos a este grupo poblacional, en esta y las siguientes tablas.

#### • rs918

En esta región, según los datos obtenidos podemos ver que en nuestra población analizada tanto controles como pacientes presentan unos perfiles genéticos en proporciones muy similares (Tabla 3), lo que significaría que esta región no sería informativa para usar como biomarcador en nuestra población.

Según la información registrada en Hapmap [23] pese al existir poblaciones próximas geográficamente a la estudiada en este trabajo, como es el caso de Italia y población europea descendiente, sin embargo difieren respecto a los resultados obtenidos. En nuestra población existe una presencia de genotipos

AA mientras que se encuentran ausentes en las dos poblaciones mencionadas anteriormente (Figura 4). Con respecto al resto de poblaciones analizadas en esta base de datos, si existe una presencia de todas las variantes posibles en la región rs918. Estudios realizados por Hsing, A.W. et al. en 86 muestras de la población de China (Shanghai) describen el cambio nucleotídico de G por A característico de este SNP. En concreto, el alelo A presenta una frecuencia de un 20% en esta población [24]. Si comprobamos este dato de Hsing con lo que se observa en la Figura 4 el alelo A presenta una frecuencia más elevada en regiones asiáticas como Tokyo y Beijin; al igual que en regiones africanas como Kenya.

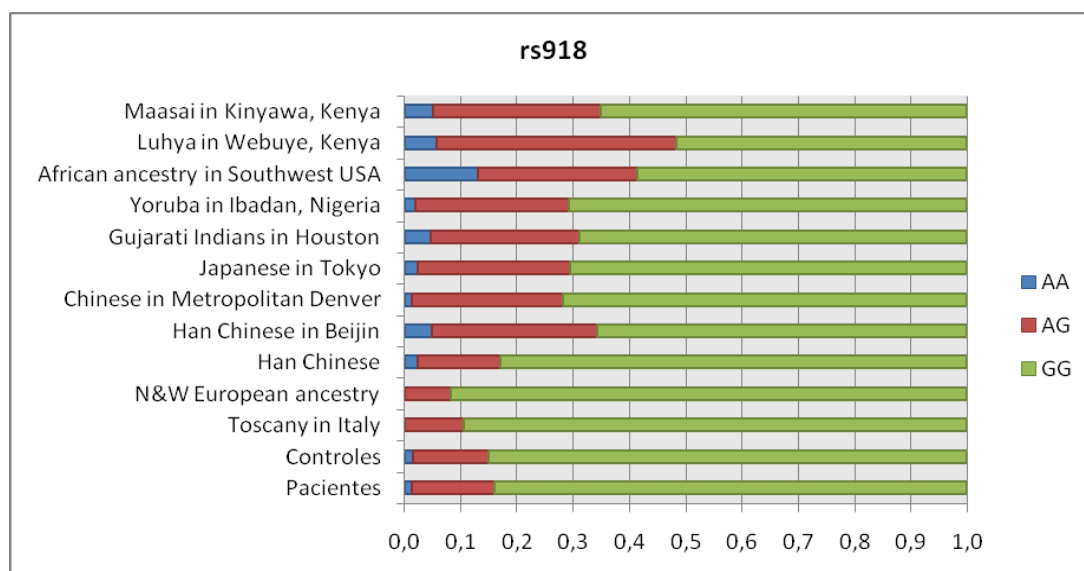


Figura 4: Representación genotipos en la región rs918 en varias poblaciones

Al analizar individualmente la relación estadística entre este marcador y las variables clínicas, observamos que existe una relación estadísticamente significativa entre el valor clínico PSA y el SNP rs918, en concreto la mayor parte de las variables clínicas más agresivas alcanzan porcentajes más elevados en el genotipo GG (Tabla 4). En contraposición escasa (0,5%) e incluso nula aparición de casos de individuos con genotipo AA, se presenta en parámetros clínicos considerados de agresividad como son valores de PSA mayores de 20 ng/mL, estadio D y bajos porcentajes en escala Gleason 8-10.

Tabla 5. Resultados estadísticos de la variante rs918 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante G/G FO-FE - %	Variante G/A FO-FE- %	Variante A/A FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	29-30.6-12.8%	7-5.5-3.1%	2-1.8-0.9%	0.395
Edad 56-60	95-88.7-41.9%	10-16.0-4.4%	5-5.3-2.2%	
Edad 61-65	49-53.2-21.6%	13-9.6-5.7%	4-3.2-1.8%	
Edad > 65	10-10.5-4.4%	3-1.9-1.3%	0-0.6-0.0%	
<b>ESTADIO</b>				
A	9-7.2-4.0%	0-1.3-0.0%	0-0.4-0.0%	0.478
B	115-115.0-51.1%	19-21-8.4%	9-7.0-4.0%	
C	37-39.4-16.4%	10-7.2-4.4%	2-2.4-0.9%	
D	20-19.3-8.9%	4-3.5-1.8%	0-1.2-0.0%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	0-0.8-0.0%	0-0.2-0.0%	1-0.0-0.5%	0.002
4.1-10	81-79.4-38.8%	14-15.8-6.7%	5-4.8-2.4%	
10.1-20	50-50.8-23.9%	10-10.1-4.8%	4-3.1-1.9%	
>20	33-33.4-15.8%	9-6.6-4.3%	0-2.0-0.0%	
>1000	2-1.6-1.0%	0-0.3-0.0%	0-0.1-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
2-6	115-117.9-51.8%	24-21.9-10.8%	8-7.3-3.6%	0.339
7	43-38.5-19.4%	3-7.1-1.4%	2-2.4-0.9%	
8-10	20-21.6-9.0%	6-4.0-2.7%	1-1.3-0.5%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs918.

#### • rs1904577

Con un valor p de  $\leq 0.001$ , se observa que las diferencias entre controles y pacientes en la región rs1904577 son estadísticamente significativas.

Si hacemos una comparativa de este SNP a nivel poblacional (Figura 5), podemos observar que en este caso existe una mayor heterogeneidad en la población, no pudiendo asemejarse claramente el patrón obtenido en nuestro grupo poblacional con el de otras poblaciones. Estudios de análisis realizados en los genes RNASEL, MSR1 y ELAC2 por Beuten et al., demostraron que en el gen MSR1 existía un haplotipo predominante G-A-C-G-C-G para los SNPs rs918-rs1904577-rs2127565-rs12718376-rs3747531-rs351572 respectivamente. Esto significaba un aumento del riesgo a padecer cáncer de próstata en poblaciones caucásicas confirmado estadísticamente por los siguientes datos (OR, 1.58; 95% CI, 1.23-2.04;  $p = 4.02 \times 10^{-4}$ ) [12]. En el caso de este SNP, los estudios de Beuten confirman lo que hemos obtenido nosotros en este análisis.

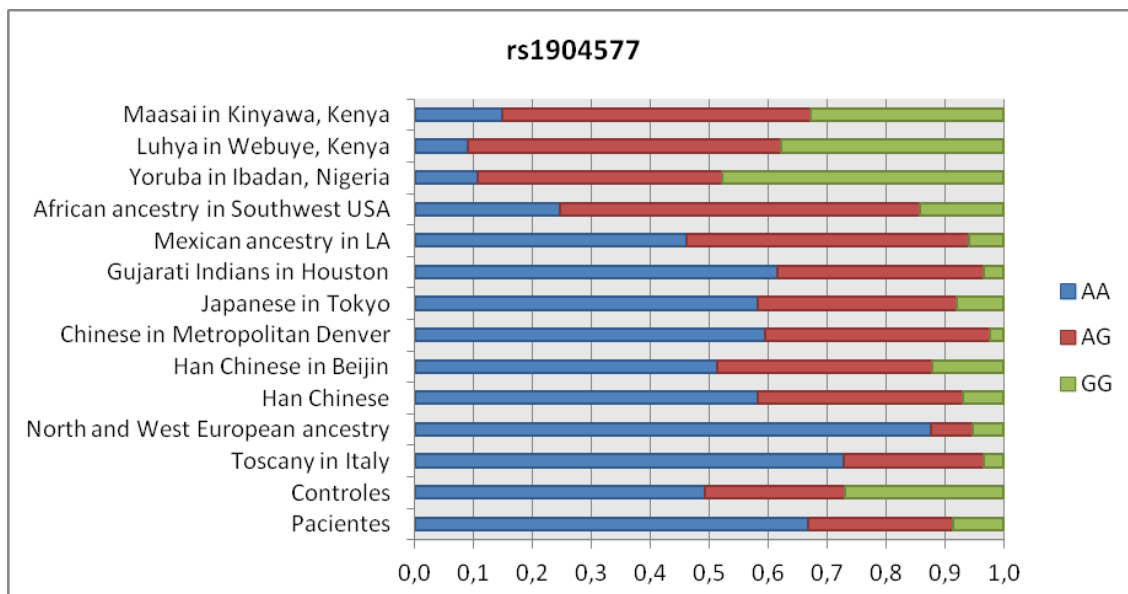


Figura 5: Representación genotipos en la región rs1904577 en varias poblaciones.

En el caso del SNP rs1904577 estadísticamente no se validan ninguno de los parámetros clínicos analizados. Sin embargo, de igual forma que en casos anteriores existe un patrón de distribución de los genotipos en la población. Así, el genotipo AA se corresponde con porcentajes más elevados en las edades más bajas y los parámetros clínicos más críticos como son estadio C y D, PSA por encima de 10 ng/mL y Gleason mayor de 7. El genotipo homocigoto GG se corresponde en este caso con unas características clínicas menos agresivas con porcentajes prácticamente inexistentes de estadios C y D, PSA mayor de 20 ng/mL y Gleason 8-10. La variante heterocigota se encuentra en unas características intermedias de las dos descritas anteriormente (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados estadísticos de la variante rs1904577 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante A/A FO-FE - %	Variante G/A FO-FE- %	Variante G/G FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	29-27.9-12.8%	5-7.1-2.2%	4-3.0-1.8%	0.779
Edad 56-60	83-80.1-36.7%	19-20.3-8.4%	7-8.7-3.1%	
Edad 61-65	46-48.5-20.4%	14-12.3-6.2%	6-5.3-2.7%	
Edad > 65	8-9.5-3.5%	4-2.4-1.8%	1-1.0-0.4%	
<b>ESTADIO</b>				
A	7-6.6-3.1%	2-1.6-0.9%	0-0.7-0.0%	0.728
B	100-104.6-44.6%	28-26.0-12.5%	14-11.4-6.3%	
C	40-36.1-17.9%	7-9.0-3.1%	2-3.9-0.9%	
D	18-17.7-8.0%	4-4.4-1.8%	2-1.9-0.9%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	1-0.7-0.0%	0-0.2-0.0%	0-0.1-0.0%	0.634
4.1-10	69-72.6-33.2%	23-18.8-11.1%	8-8.7-3.8%	
10.1-20	45-45.7-21.6%	11-11.8-5.3%	7-5.5-3.4%	
>20	35-30.5-16.8%	4-7.9-1.9%	3-3.6-1.4%	
>1000	1-1.5-0.5%	1-0.4-0.0%	0-0.2-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
2-6	108-106.4-48.9%	27-27.7-12.2%	11-11.9-5.0%	0.678
7	32-35.0-14.5%	10-9.1-4.5%	6-3.9-2.7%	
8-10	21-19.7-9.5%	5-5.1-2.3%	1-2.2-0.5%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs1904577.

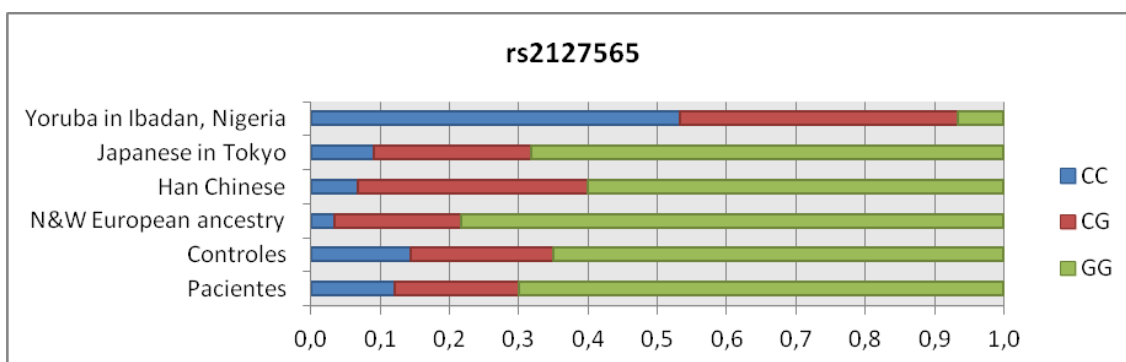
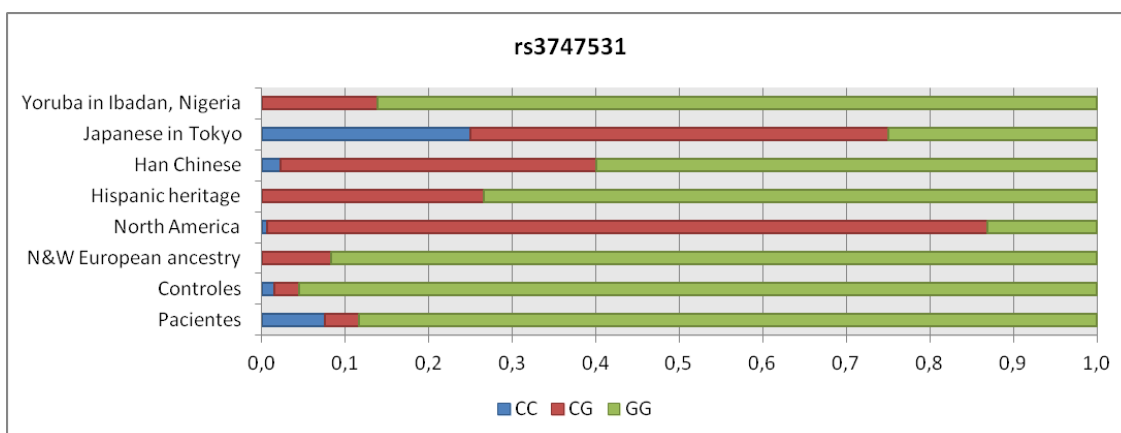
- **rs21277565 y rs3747531**

Para las regiones rs21277565 y rs3747531 se han obtenido valores estadísticamente no significativos con p-valor de 0.760 y 0.059 en el estadístico de Chi<sup>2</sup> respectivamente. Como vemos, en la región rs3747531 se encuentra muy próximo a la significatividad.

De forma análoga como hemos realizado anteriormente, si comparamos los resultados obtenidos con los de otras poblaciones mundiales, podemos observar las grandes diferencias en estas regiones. En el rs21277565, existe un patrón genotípico muy diferente entre la población española analizada y poblaciones de Nigeria. En esta última población, vemos que no existe prácticamente presencia de GG mientras que éste es mayoritario en nuestra población (Figura 6). Estudios realizados por Beuten et al., destacan al genotipo AA como asociado a un aumento de riesgo en poblaciones caucásicas [12].



Con respecto a la región rs3747531, poblacionalmente también se marcan diferencias importantes como es la ausencia de genotipos CC en poblaciones de Nigeria, hispánicos y descendientes del Norte y Oeste de Europa. Poblaciones del Norte de América presentan predominantemente el genotipo heterocigoto CG, mostrando por tanto un patrón muy diferente del habitual en el resto del mundo (Figuras 6 y 7). Según los estudios de Beuten et al, desarrollados en poblaciones caucásicas destacan al genotipo CC como el de alto riesgo a padecer cáncer de próstata en estas poblaciones [12].



Figuras 6 y 7: Representación genotipos en las regiones rs21277565 y rs3747531 en varias poblaciones.

Con respecto a los SNPs rs2127565 y rs3747531, sólo es estadísticamente significativo el parámetro PSA con el SNP rs2127565. Sin embargo, en ambos casos, la variante GG alcanza un mayor porcentaje en las variantes más agresivas con respecto a la heterocigótica CG y homocigótica CC (Tabla 7 y 8). Estudios como los realizados por Wang, L. [25], al igual que en nuestro estudio,

no encuentran diferencias estadísticas significativas entre los pacientes y ninguna característica clínica para el SNP rs3747531.

Tabla 7. Resultados estadísticos de la variante rs2127565 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante G/G FO-FE - %	Variante G/C FO-FE- %	Variante C/C FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	21-25.0-9.2%	8-7.5-3.5%	8-4.5-3.5%	0.295
Edad 56-60	82-75.6-36.0%	21-22.6-9.2%	9-13.8-3.9%	
Edad 61-65	44-44.6-19.3%	14-13.3-6.1%	8-8.1-3.5%	
Edad > 65	7-8.8-3.1%	3-2.6-1.3%	3-1.6-1.3%	
<b>ESTADIO</b>				
A	6-6.1-2.7%	1-1.8-0.4%	2-1.1-0.9%	0.469
B	95-98.2-42.0%	34-29.5-15.0%	16-17.3-7.1%	
C	36-32.5-15.9%	8-9.8-3.5%	4-5.7-1.8%	
D	16-16.2-7.1%	3-4.9-1.3%	5-2.9-2.2%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	1-0.7-0.0%	0-0.2-0.0%	0-0.1-0.0%	0.005
4.1-10	63-68.3-30.0%	24-20.7-11.4%	14-12.0-6.7%	
10.1-20	43-43.3-20.5%	15-13.1-7.1%	6-7.6-2.9%	
>20	35-28.4-16.7%	4-8.6-1.9%	3-5.0-1.4%	
>1000	0-1.4-0.0%	0-0.4-0.0%	2-0.2-1.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
2-6	98-100.2-43.9%	30-30.5-13.5%	20-17.3-9.0%	0.316
7	31-32.5-13.9%	13-9.9-5.8%	4-5.6-1.8%	
8-10	22-18.3-9.9%	3-5.6-1.3%	2-3.1-0.9%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs2127565.

Tabla 8. Resultados estadísticos de la variante rs3747531 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante G/G FO-FE - %	Variante G/C FO-FE- %	Variante C/C FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	30-32.9-41.3%	4-2.4-1.8%	4-2.7-1.8%	0.484
Edad 56-60	93-93.6-41.3%	8-6.7-3.6%	7-7.7-3.1%	
Edad 61-65	59-57.2-26.2%	2-4.1-0.9%	5-4.7-2.2%	
Edad > 65	13-11.3-5.8%	0-0.8-0.0%	0-0.9-0.0%	
<b>ESTADIO</b>				
A	6-7.8-2.7%	1-0.6-0.4%	2-0.6-0.9%	0.623
B	124-122.0-55.6%	8-8.9-3.6%	9-10.1-4.0%	
C	42-42.4-18.8%	4-3.1-1.8%	3-3.5-1.3%	
D	21-20.8-9.4%	1-1.5-0.4%	2-1.7-0.9%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	1-0.9-0.0%	0-0.1-0.0%	0-0.1-0.0%	0.990

<b>4.1-10</b>	87-86.1-42.0%	5-6.2-2.4%	7-6.7-3.4%	
<b>10.1-20</b>	56-55.7-27.1%	4-4.0-1.9%	4-4.3-1.9%	
<b>&gt;20</b>	34-35.7-16.4%	4-2.6-1.9%	3-2.8-1.4%	
<b>&gt;1000</b>	2-1.7-1.0%	0-0.1-0.0%	0-0.1-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
<b>2-6</b>	126-125.9-57.3%	8-9.2-3.6%	11-9.9-5.0%	0.901
<b>7</b>	41-41.7-18.6%	4-3.1-1.8%	3-3.3-1.4%	
<b>8-10</b>	24-23.4-10.9%	2-1.7-0.9%	1-1.8-0.5%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs3747531.

Una representación esquemática de los parámetros clínicos dentro de pacientes en las variantes del gen MSR1 se correspondería con lo representado en la Tabla 9.

Tabla 9. Resumen de las variantes de MSR1 y los p-valores con las características clínicas analizadas.

<b>Pacientes</b>	<b>Edad</b>	<b>PSA</b>	<b>Estadio</b>	<b>Escala Gleason</b>
<b>rs12718376</b>	0.920	0.545	0.435	0.248
<b>rs918</b>	0.395	<b>0.002</b>	0.478	0.339
<b>rs1904577</b>	0.779	0.634	0.728	0.678
<b>rs2127565</b>	0.295	<b>0.005</b>	0.469	0.316
<b>rs3747531</b>	0.484	0.990	0.623	0.901

Se ha realizado también un análisis de los diferentes haplotipos encontrados que puedan tener un mayor riesgo según las características clínicas analizadas. De esta forma, los individuos con haplotipo **CT-GG-AA-GG-GG**, en **rs12718376-rs918-rs1904577-rs2127565-rs3747531** respectivamente; muestran diferencias estadísticamente significativas en la escala de Gleason ( $p=0.022$ ), 35% con valores de 7. Los individuos **CC-GG-GA-GC-GG**, (**rs12718376- rs918- rs1904577- rs2127565- rs3747531**) presentan diferencias estadísticamente significativas en la escala de PSA ( $p= 0.018$ ).

### 3.2. GEN ELAC2

De igual forma, como se ha realizado en la región de MSR1, vamos a analizar gráfica y estadísticamente las variaciones en las distintas regiones de ELAC2. En todos los marcadores analizados se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y controles (Tabla 10).

Tabla 10. Representación de las mutaciones analizadas en el gen ELAC2 en controles y pacientes.

Mutación	Genotipos y porcentajes PACIENTES	Genotipos y porcentajes CONTROLES	p-value
<b>rs11545302</b> Thr520Thr	44.7% AA 45.5% AG 9.80% GG	63.5% AA 33.8% AG 2.70% GG	0.012
<b>rs17552022</b> Thr631Thr	5.20% CC 29.2% CT 65.7% TT	2.90% CC 12.9% CT 84.3% TT	0.009
<b>rs5030739</b> Ala541Thr	0.90% AA 26.6% AG 72.5% GG	0.0% AA 65.4% AG 34.6% GG	≤0.001
<b>rs4792311</b> Ser217Leu	12.0% AA 41.3% AG 46.7% GG	4.30% AA 30.4% AG 65.2% GG	0.027

- **rs11545302**

Beuten et al., asocian este SNP como uno de los que poseen un mayor riesgo al cáncer de próstata en poblaciones caucásicas confirmado con los siguientes datos estadísticos (OR, 2.19; 95% CI, 1.25-3.82; p = 0.006) [12].

A nivel poblacional, no existen muchos estudios registrados. Al comparar nuestros datos con la población norte americana se encuentran parámetros similares de distribución de los distintos genotipos en los pacientes en la población española (Figura 8).

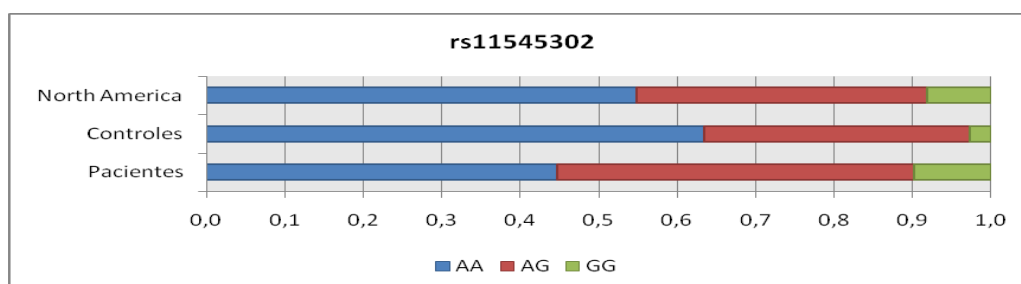


Figura 8: Representación de los genotipos en la región rs11545302 con la población norte americana.

Al analizar los parámetros clínicos en este SNP comprobamos que estadísticamente ningún parámetro clínico cumple el requisito de p inferior a 0.05. Sin embargo, el mayor porcentaje de individuos con los parámetros clínicos (estadio, PSA y Gleason) más avanzados, se encuentran en el genotipo GA. El genotipo GG, parece que confiere un menor riesgo ya que existen porcentajes bajos o prácticamente inexistentes en los estadios C y D, PSA > 20 ng/mL y Gleason 8-10 (Tabla 11).

Tabla 11. Resultados estadísticos de la variante rs11545302 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante A/A FO-FE - %	Variante G/A FO-FE- %	Variante G/G FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				
Edad ≤ 55	16-17.1-7.0%	19-17.4-8.4%	3-3.5-1.3%	0.961
Edad 56-60	50-49.4-22.0%	48-50.4-21.1%	12-10.2-5.3%	
Edad 61-65	29-29.7-12.8%	32-30.2-14.1%	5-6.1-2.2%	
Edad > 65	7-5.8-3.1%	5-6.0-2.2%	1-1.2-0.4%	
<b>ESTADIO</b>				
A	5-4.0-2.2%	4-4.2-1.8%	0-0.8-6.2%	0.324
B	65-63.6-28.9%	64-66.1-28.4%	14-13.3-4.0%	
C	21-21.8-9.3%	26-22.6-11.6%	2-4.6-0.9%	
D	9-10.7-4.0%	10-11.1-4.4%	5-2.2-2.2%	
<b>PSA</b>				
≤ 4.0	0-0.4-0.0%	1-0.5-0.5%	0-0.1-0.0%	0.687
4.1-10	43-44.0-20.6%	44-46.9-21.1%	13-9.1-6.2%	
10.1-20	31-28.2-14.8%	29-30.0-13.9%	4-5.8-1.9%	
>20	17-18.5-8.1%	23-19.7-11.0%	2-3.8-1.0%	
>1000	1-0.9-0.5%	1-0.9-0.5%	0-0.2-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				
2-6	67-65.6-30.2%	69-68.2-31.1%	11-13.2-5.0%	0.197
7	25-21.4-11.3%	18-22.3-8.1%	5-4.3-2.3%	
8-10	7-12.0-3.2%	16-12.5-7.2%	4-2.4-1.8%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs11545302.

- **rs17552022**

Estudios realizados por Y.C.Chen et al. han demostrado en poblaciones caucásicas un cambio nucleotídico de T a C [5], por lo que el alelo T se considera como *wildtype* y el C alelo mutado. Estos estudios no encuentran resultados estadísticamente significativos con un p-valor de 0.36 en controles y de 0.21 en pacientes. En la población española analizada existe un mayor

porcentaje de homocigotos TT por lo que coincide con lo expuesto por los trabajos de Chen et al, y existe un p-valor de 0.009 entre controles y pacientes.

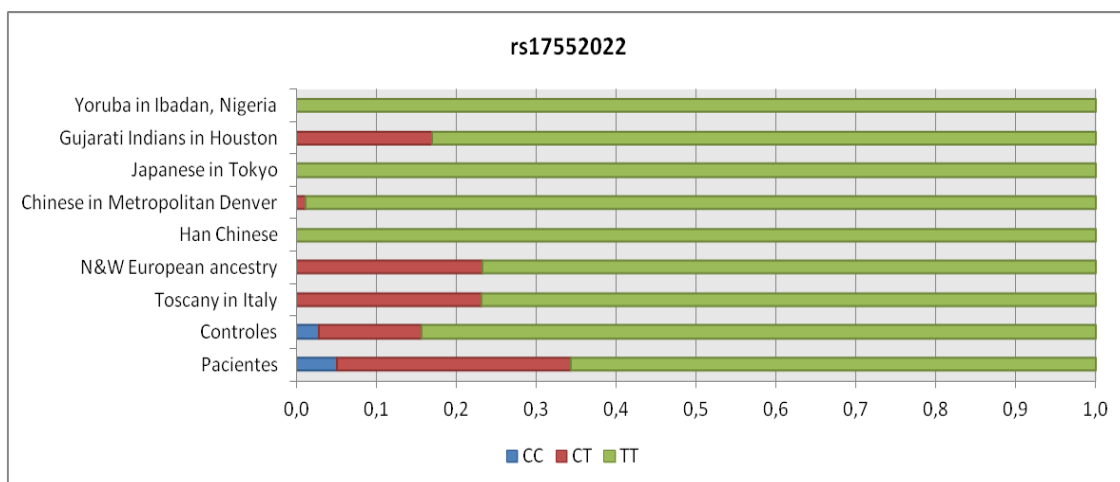


Figura 9: Representación de los genotipos en la región rs17552022 pacientes/controles y comparación genotípica con otras poblaciones.

A nivel poblacional, como observamos en la Figura 9, existe una gran diversidad genética en esta variante. En regiones como Nigeria ,Tokyo y China (concretamente en el grupo étnico Han) sólo se describe la presencia de genotipos TT. En otras poblaciones localizadas en regiones como Italia,Denver y poblaciones con ancestros europeos, sólo existe la presencia de los genotipos CT y TT. Sin embargo en la población española que estamos analizando encontramos la presencia de los tres genotipos posibles para esta variante como son CC,CT y TT.

Al analizar estadísticamente las características clínicas en el SNP rs17552022, no se aceptan como significativos ninguno de los parámetros estudiados. De igual forma que se ha hecho anteriormente, comprobamos el patrón de dsitribución poblacional en cada uno de los rangos clínicos. De este modo, se comprueba que un mayor porcentaje de la cohorte de pacientes con genotipo TT se acumulan en parámetros como estadio C y D; valores de PSA por encima de 4 ng/mL y escala de Gleason mayor de 7. De igual manera, los individuos de menor edad están concentrados en esta variante genética lo que implica que aparece en edades más tempranas y con unas características

clínicas más agresivas. En contraposición, individuos homocigotos CC no poseen prácticamente presencia poblacional (0.9,0.5 y 1.4 % respectivamente) en características clínicas como estadio D, PSA por encima de 20 ng/mL y escala de Gleason por encima de 7 (Tabla 12).

Tabla 12. Resultados estadísticos de la variante rs17552022 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante T/T FO-FE - %	Variante C/T FO-FE- %	Variante C/C FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				0.275
<b>Edad ≤ 55</b>	28-25.8-12.3%	8-10.5-3.5%	2-1.7-0.9%	
<b>Edad 56-60</b>	73-74.6-32.2%	29-30.5-12.8%	8-4.8-3.5%	
<b>Edad 61-65</b>	45-44.8-19.8%	21-18.3-9.3%	0-2.9-0.0%	
<b>Edad &gt; 65</b>	8-8.8-3.5%	5-3.6-2.2%	0-0.6-0.0%	
<b>ESTADIO</b>				0.780
<b>A</b>	6-6.1-2.7%	2-2.5-0.9%	1-0.4-0.4%	
<b>B</b>	97-96.6-43.1%	42-40.0-18.7%	4-6.4-1.8%	
<b>C</b>	33-33.1-14.7%	13-13.7-5.8%	3-2.2-1.3%	
<b>D</b>	16-16.2-7.1%	6-6.7-2.7%	2-1.1-0.9%	
<b>PSA</b>				0.483
<b>≤ 4.0</b>	1-0.7-0.5%	0-0.3-0.0%	0-0.0-0.0%	
<b>4.1-10</b>	62-67.9-29.7%	33-28.2-15.8%	5-3.8-2.4%	
<b>10.1-20</b>	51-43.5-24.4%	11-18.1-5.3%	2-2.4-1.0%	
<b>&gt;20</b>	27-28.5-12.9%	14-11.9-6.7%	1-1.6-0.5%	
<b>&gt;1000</b>	1-1.4-0.5%	1-0.6-0.5%	0-0.1-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				0.277
<b>2-6</b>	98-100.0-44.1%	44- 41.1-19.8%	5-6.0-2.3%	
<b>7</b>	36-32.6-16.2%	11-13.4-5.0%	1-1.9-0.5%	
<b>8-10</b>	17-18.4-7.7%	7-7.5-3.2%	3-1.1-1.4%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs17552022.

- **rs5030739**

En este SNP también denominado como Asp541Thr (A541T) observamos que en controles sólo se presentan los genotipos AG y GG, mientras que en pacientes aparece una baja proporción de genotipo AA. Estudios realizados por Robbins et al. en poblaciones de afroamericanos no han conseguido obtener resultados estadísticamente significativos [26]. Robbins et al., indican que en la variante A541T el genotipo GA se presenta con una frecuencia menor al 1% tanto en controles como en pacientes, lo que no permite establecer escalas de riesgo claras en esta población. Según los análisis de Xu et al., el alelo Thr541

del gen ELAC2 se asocia con un riesgo elevado de cáncer de próstata si se compara con el alelo Ala541 (OR=1.22, 95% CI: 1.00–0.48,  $p=0.131$ ) [10].

El estudio de Robbins et al, está desarrollado en poblaciones afroamericanas de 243 pacientes y 296 controles. En la cohorte de pacientes se destacan datos de cáncer familiar en el que todos presentan genotipo GG. En el caso de cáncer de próstata esporádico un 98.7% de los casos presentan genotipo GG, y el resto genotipo GA. Estos últimos porcentajes son muy similares a los descritos en controles [26]. Con respecto a nuestra población, el genotipo GG es también el predominante y existe menor porcentaje de genotipo GA (26.6% en pacientes y 65.4% en controles) pero elevado si lo comparamos con los resultados de Robbins et al en poblaciones afroamericanas. Según los datos obtenidos de Hapmap en poblaciones de Norte América, siguen un patrón muy similar de distribución al obtenido por Robbins et al. en poblaciones afroamericanas (Figura 10). Xu et al., realizan sus análisis en poblaciones caucásicas y asiáticas, encontrando un elevado riesgo entre las poblaciones asiáticas, en este marcador al compararse con la otras poblaciones analizadas (caucásicos y africanos) estadísticamente demostrado con los siguientes datos (OR=4.44, 95% CI: 1.84–10.69,  $p=0.941$ ) [10].

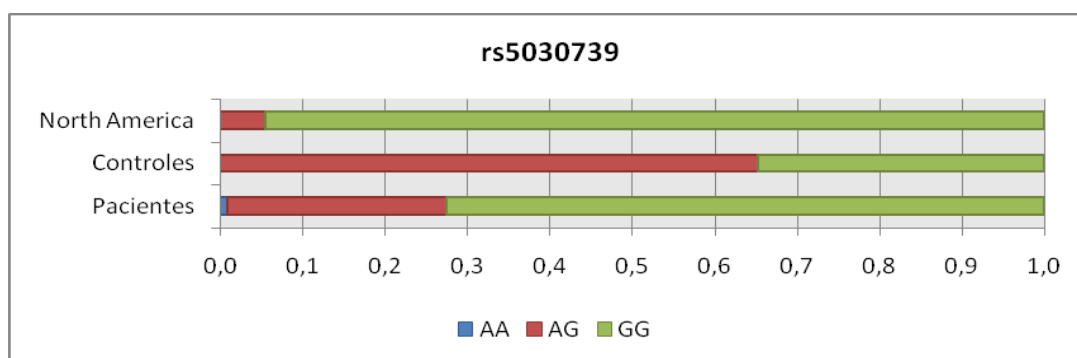


Figura 10: Representación poblacional de la variante rs5030739.

En el caso del SNP rs5030739 se acepta como estadísticamente significativo el parámetro edad con las variables genéticas analizadas (Tabla 13). En concreto, los individuos GG poseen un mayor porcentaje de pacientes con edades por debajo de 55 y en el rango de 56-60 años. De igual modo, los individuos con este genotipo, poseen un porcentaje más elevado de la cohorte pacientes en estadios C y D, en valores de PSA por encima de 4 ng/mL y escala



Gleason por encima de 7. En contraposición, el genotipo AA se encuentra prácticamente inexistente en los pacientes de este análisis.

Tabla 13. Resultados estadísticos de la variante rs5030739 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante G/G FO-FE - %	Variante G/A FO-FE- %	Variante A/A FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				0.033
<b>Edad ≤ 55</b>	31- 27.6- 13.7%	7-10.0-3.1%	0-0.3-0.0%	
<b>Edad 56-60</b>	86- 80.0- 37.9%	23-29.1-10.1%	1-1.0-0.4%	
<b>Edad 61-65</b>	43- 48.0- 18.9%	22- 17.4- 9.7%	1-0.6-0.4%	
<b>Edad &gt; 65</b>	5-9.4-2.2%	8-3.4-3.5%	0-0.1-0.0%	
<b>ESTADIO</b>				0.966
<b>A</b>	6-6.6-2.7%	3-2.4-1.3%	0-0.1-0.0%	
<b>B</b>	104-104.2-46.2%	38-37.5-16.9%	1-1.3-0.4%	
<b>C</b>	36-35.7-16.0%	12-12.8-5.3%	1-0.4-0.4%	
<b>D</b>	18-17.5-8.0%	6-6.3-2.7%	0-0.2-0.0%	
<b>PSA</b>				0.918
<b>≤ 4.0</b>	1-0.7-0.5%	0-0.3-0.0%	0-0.0-0.0%	
<b>4.1-10</b>	71-71.3-34.0%	27-27.8-12.9%	2-1.0-1.0%	
<b>10.1-20</b>	45-45.6-21.5%	19-17.8-9.1%	0-0.6-0.0%	
<b>&gt;20</b>	31-29.9-14.8%	11-11.7-5.3%	0-0.4-0.0%	
<b>&gt;1000</b>	1-1.4-0.5%	1-0.6-0.5%	0-0.0-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				0.312
<b>2-6</b>	106-106.6-47.7%	41-39.1-18.5%	0-1.3-0.0%	
<b>7</b>	35-34.8-15.8%	12-12.8-5.4%	1-0.4-0.5%	
<b>8-10</b>	20-19.6-9.0%	6-7.2-2.7%	1-0.2-0.5%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs5030739.

- **rs4792311**

Nombrado también como Ser217Leu o (S217L), está considerado como una de las de mayor riesgo de cáncer de próstata. De hecho, el alelo 217L según los estudios de Robbins, C.M. et al. se caracteriza como asociado a un alto riesgo con el cáncer de próstata en poblaciones afroamericanas con una evidencia estadística (OR=1.6; 1.0–2.6; p=0.03) [26]. Posteriores estudios realizados por Xu et al. [10], corroboran estos datos, asignando al alelo Leu217 (217L) un riesgo elevado en cáncer de próstata al compararse con el alelo Ser217.

Los porcentajes en los que aparecen los distintos genotipos en la población analizada por Robbins son similares a los de nuestra población. De esta forma el genotipo AA aparece en una proporción menor (12% en pacientes frente a 4.3% en controles) que el genotipo homocigoto GG (46,7% en pacientes frente

al 65.2% en controles) y en una posición intermedia el genotipo AG (41.3% en pacientes frente al 30.4% en controles) tanto en la población española de este estudio como en la afroamericana analizada por Robbins ( 2.5% vs 5.1% en AA; 56.8% vs 61.5% en GG y 40.7% vs 33.4%. – pacientes vs controles).

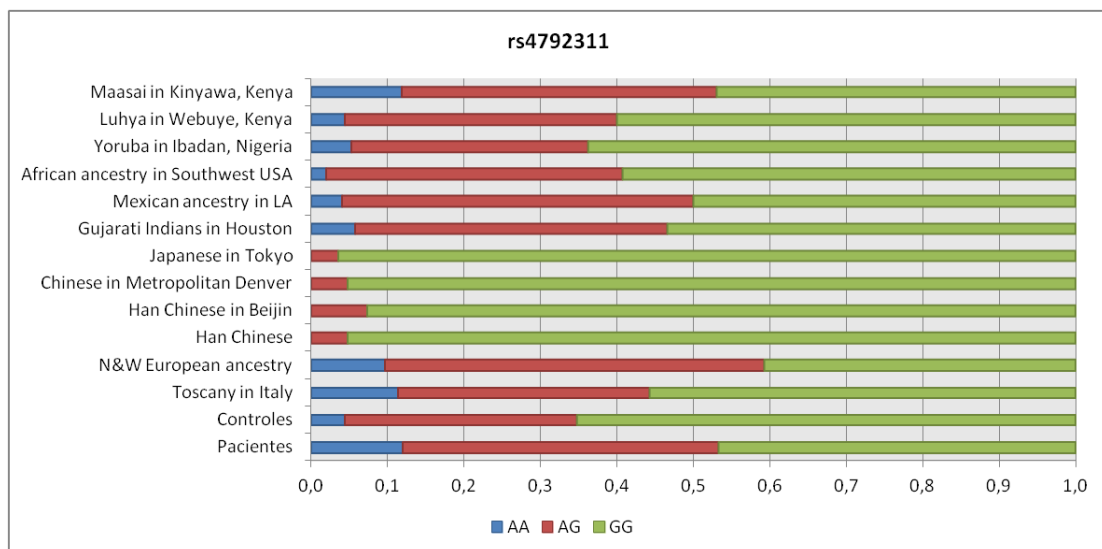


Figura 11: Representación poblacional de la variante rs4792611.

Poblacionalmente, como se observa en la Figura 11, la distribución de los perfiles genéticos de la población española analizada son similares a poblaciones geográficamente próximas como son la Toscana Italiana, y ancestros europeos. Sin embargo, un perfil similar también aparece en poblaciones más alejadas como Kenya. Cabe señalar, que en regiones asiáticas como son Tokyo y otras regiones de China sólo se presentan las variantes GG y AG, desapareciendo totalmente la presencia de genotipos AA. Además, estas regiones presentan un patrón similar de distribución correspondiendo con una pequeña presencia de genotipos AG siendo prácticamente mayoritarios la presencia de genotipos GG. Según estudios realizados por Xu et al., tanto en poblaciones asiáticas como en las europeas el polimorfismo Ser217Leu se asocia con un riesgo elevado con casos de cáncer de próstata, tanto esporádico como familiar [10].

Al comparar las características clínicas, el parámetro PSA se encuentra estadísticamente próximo a la significatividad (0.064) (Tabla 14). En este caso

aunque el genotipo GG presenta un porcentaje más elevado de presencia en estas y otras características clínicas más agresivas, el genotipo GA se encuentra con porcentajes muy similares a GG. Sin embargo el genotipo AA presenta un bajo porcentaje de presencia en pacientes y los porcentajes más elevados se encuentran en estadio B, PSA de 4.1-10 ng/mL y escala Gleason 2-6. Estudios realizados en la población de Australia por Severi G. et al., no consiguen encontrar ninguna asociación estadísticamente significativa entre PSA y los SNPs rs4792311 y rs5030739 [27].

Tabla 14. Resultados estadísticos de la variante rs4792311 para la cohorte pacientes obtenidos por el programa SPSS v.15.0.

Parámetros	Variante G/G FO-FE - %	Variante G/A FO-FE- %	Variante A/A FO-FE- %	P-valor
<b>EDAD</b>				0.976
Edad ≤ 55	17-18.1-7.5%	17-15.7-7.5%	4-4.2-1.8%	
Edad 56-60	53-52.3-23.3%	43-45.6-18.9%	14-12.1-6.2%	
Edad 61-65	31-31.4-13.7%	29-27.3-12.8%	6-7.3-2.6%	
Edad > 65	7-6.2-3.1%	5-5.4-2.2%	1-1.4-0.4%	
<b>ESTADIO</b>				0.309
A	5-4.2-2.2%	4-3.8-1.8%	0-1.0-0.0%	
B	67-67.4-29.8%	60-59.7-26.7%	16-15.9-7.1%	
C	24-23.1-10.7%	22-20.5-9.8%	3-5.4-1.3%	
D	10-11.3-4.4%	8-10.0-3.6%	6-2.7-2.7%	
<b>PSA</b>				0.064
≤ 4.0	0-0.5-0.0%	0-0.4-0.0%	1-0.1-0.5%	
4.1-10	44-46.4-21.1%	41-42.6-19.6%	15-11.0-7.2%	
10.1-20	33-29.7-15.8%	27-27.3-12.9%	4-7.0-1.9%	
>20	20-19.5-9.6%	19-17.9-9.1%	3-4.6-1.4%	
>1000	0-0.9-0.0%	2-0.9-1.0%	0-0.2-0.0%	
<b>ESCALA GLEASON</b>				0.262
2-6	69-70.2-31.1%	63- 60.9-28.4%	15-15.9-6.8%	
7	28-22.9-12.6%	16-19.9-7.2%	4-5.2-1.8%	
8-10	9-12.9-4.1%	13- 11.2-5.9%	5-2.9-2.3%	

FO: Frecuencia Observada; FE: Frecuencia Esperada; %: % de rs4792311.

- Comparación de parámetros clínicos en las variantes de ELAC2

Al analizar estadísticamente los datos clínicos en esta región encontramos una distribución de los pacientes de la siguiente forma (Tabla 15).

Tabla 15. Resumen de los estadísticos descriptivos (p-valor clínica) en los pacientes.

<b>Variantes</b>	<b>Escala</b>			
<b>ELAC2</b>	<b>Edad</b>	<b>PSA</b>	<b>Estadio</b>	<b>Gleason</b>
<b>rs11545302</b>	0.961	0.687	0.324	0.197
<b>rs17552022</b>	0.275	0.483	0.780	0.277
<b>rs5030739</b>	<b>0.033</b>	0.918	0.966	0.312
<b>rs4792311</b>	0.976	<b>0.064</b>	0.309	0.262

## 4. CONCLUSIONES

Uno de los principales objetivos de esta tesis es poder conseguir un biomarcador mediante el desarrollo de técnicas no invasivas que permitan una detección temprana del cáncer. El éxito de un buen biomarcador radicaría no sólo en la calidad de vida de pacientes sino en el rediseño de técnicas de *screening* y detección. Si bien, tenemos que tener en cuenta que para poder tener un marcador eficiente en el uso clínico se necesita una buena sensibilidad y especificidad, por lo que es recomendable su elección en función de la población en la que se vaya a usar para tener mejores valores predictivos. Para ello, hemos completado el análisis en los genes MSR1 y ELAC2.

Dentro del gen MSR1 los porcentajes entre controles y pacientes son prácticamente similares los SNPs rs918 y rs21277565 analizados en este gen, y por tanto sería poco informativo como biomarcador entre estas cohortes en nuestra población. Al realizar las comparaciones entre poblaciones, observamos que en las regiones rs12718376 y rs21277565 se presentan parámetros genéticos similares entre los de nuestra población y otras próximas como Italia y descendientes europeos. Sin embargo, diverge de otras poblaciones geográficamente más alejadas. Por otro lado, en regiones como rs918, rs1904577 y rs3747531 no se presentan unos patrones genéticos similares con grupos poblacionales como los descendientes europeos o regiones próximas geográficamente.

Estudios realizados por Beuten et al. para los SNPs rs918-rs1904577-rs2127565-rs12718376-rs3747531-rs351572 destacan a los haplotipos G-A-C-G-C-G en MSR1 con un mayor riesgo de cáncer de próstata en poblaciones caucásicas [12]. En nuestro análisis realizado de la población andaluza, destacamos que individualmente los genotipos CC, GG, AA, GG y GG se asocian con características clínicas más agresivas (estadios C y D; Gleason mayores de 7 y valores de PSA por encima de 4.1 ng/mL) en los SNPs rs12718376, rs918, rs1904577, rs2127565 y rs3747531, respectivamente. Del mismo modo, los genotipos TT, AA y GG parecen concentrarse en los pacientes analizados en las características menos agresivas (estadios A y B, Gleason menores de 7 y

valores de PSA por debajo de 4 ng/mL) en rs12718376, rs918 y rs1904577 respectivamente. De hecho, los estudios de Beuten [12] destacan a los SNPs rs12718376 y rs3747531, entre otros, como significativamente asociados a riesgo de cáncer de próstata en caucásicos. De hecho en este estudio citado, encuentra tanto en pacientes como en controles un porcentaje de distribución genotípica similar al de nuestra población (de mayor a menor porcentaje de individuos) CC, TC y TT, pero en este caso, con diferencias estadísticamente significativas entre ambas cohortes.

Con respecto al gen ELAC2, es estadísticamente significativo al compararse entre controles y pacientes en todos los SNPs analizados. Al hacer una comparación poblacional, sólo la región rs4792311 presenta similitudes genéticas con individuos de poblaciones cercanas como Italia. Si comparamos con los estudios de Beuten et al [12], en el SNP rs5030739 se manifiestan también patrones de distribución genéticos similares entre nuestra población española, la caucásica y asiática que este autor analiza. Sin embargo, en el resto de regiones analizadas (rs11545302 y rs17552022) no se han encontrado similitudes génicas con otras poblaciones.

Al analizar las variantes genéticas del gen ELAC2 con las características clínicas, observamos que los genotipos GA, TT, GG y GG en los SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 y rs4792311 respectivamente, se asocian con los parámetros clínicos más agresivos. En contraposición, los genotipos GG, CC, AA y AA, en los SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 y rs4792311 respectivamente, se asocian con unas características clínicas menos agresivas. Si comparamos con los resultados realizados por Beuten et al, en poblaciones de afroamericanos los haplotipos que se asocian con un mayor riesgo de cáncer de próstata en el gen ELAC2 para los SNPs rs2072262-rs2523-rs11545302-rs8077923-rs7218504, son los siguientes C-G-G-C-G, respectivamente[12]. Según Xu et al., los polimorfismos Ser217Leu y Ala541Thr, se asocian a un riesgo elevado en cáncer de próstata [10]. De igual forma Tavtigian et al.[6,28], y Vesprini et al.[15] descubrieron que la variante Ser217Leu se localizaba en el segmento de la secuencia proteica de ELAC2 y que sustituciones del residuo hidrofóbico de Leucina podrían alterar la estructura

proteica. Con respecto a la variante Ala541Thr, se encuentra adyacente al motivo de histidina lo que puede alterar la función proteica. Por lo que parece evidente, según los estudios previos que los alelos Leu217 y Thr541 quizás disminuyan la expresión proteica, alterando la función de ELAC2. Así también lo confirman estudios de Beuten et al., en el que sujetos con los alelos Leu217 y Thr541 se asocian con un riesgo de cáncer de próstata mayor que aquellos que portan el alelo wild-type [10]. En nuestro caso, no encontramos resultados similares en el rs4792311, ya que los individuos GG (Ser217) son los que se asocian con un mayor riesgo a cáncer de próstata.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Simard, M. Dumont, D. Labuda, D. Sinnett, C. Meloche, M. El-Alfy, et al., Prostate cancer susceptibility genes: Lessons learned and challenges posed, *Endocr.Relat.Cancer*. 10 (2003) 225-259.
- [2] E.A. Ostrander, J.L. Stanford, Genetic of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet*. 67 (2000) 1367-1375.
- [3] J.P. Heuvel-Vanden, G.H. Perdew, W.F. Greenlee, W.B. Mattes, Inherited susceptibility and prostate cancer risk. Low penetrance genes in prostate cancer. *Cellular and Molecular Toxicology*. Elsevier, Amsterdam, 2002, pp. 1-534.
- [4] H. Takaku, A. Minagawa, M. Takagi, a. et, A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*. 31 (2003) 2272-2278.
- [5] Y. Chen, E. Giovannucci, P. Kraft, D.J. Hunter, Sequence variants of *elaC* homolog 2 (*Escherichia coli*) (*ELAC2*) gene and susceptibility to prostate cancer in the Health Professionals Follow-Up. *Carcinogenesis*. 29(5) (2008) 999-1004.
- [6] S.V. Tavtigian, J. Simard, D.H.F. Teng, V. Abtin, M. Baumgard, A. Beck, et al., A candidate prostate cancer susceptibility gene at chromosome 17p. *Nature genetics*. 27 (2001) X-X.
- [7] N.J. Camp, S.V. Tavtigian. Meta-analysis of associations of the Ser217Leu and Ala541Thr variants in *ELAC2* (*HPC2*) and prostate cancer. *Am J Hum Genet*. 71 (2002) 1475-1478.
- [8] L. Wang, S.K. McDonnell, D.A. Elkins, S.L. Slager, E. Christensen, A.F. Marks, et al., Role of *HPC2/ELAC2* in Hereditary Prostate Cancer. *Cancer research*. 61 (2001) 6494-6499.
- [9] J. Simard, M. Dumont, P. Soucy, F. Labrie, Perspective: prostate cancer susceptibility genes, *Endocrinology*. 143 (2002) 2029.
- [10] B. Xu, N. Tong, J.M. Li, Z.D. Zhang, H.F. Wu, *ELAC2* polymorphisms and prostate cancer risk: a meta-analysis based on 18 case-control studies. *Prostate cancer and prostatic diseases*. 13 (2010) 270-277.
- [11] Perspective: Prostate Cancer Susceptibility Genes. *Endocrinology*. 143(6) (2002) 2029-2040.



- [12] J. Beuten, J.A.L. Gelfond, J.L. Franke, S. Shook, T.L. Johnson-Pais, I.M. Thompson, et al., Single and multivariate associations of MSR1, ELAC2, and RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*. 19 (2010) 588-599.
- [13] A. Minagawa, H. Takaku, M. Takagi, M. Nashimoto, The missense mutations in the candidate prostate cancer gene ELAC2 do not alter enzymatic properties of its product, *Cancer Lett*. 222 (2005) 211-215.
- [14] J.C. Meitz, S.M. Edwards, D.F. Easton, A. Murkin, A. Ardern-Jones, R.A. Jackson, et al., HPC2/ELAC2 polymorphisms and prostate cancer risk: Analysis by age of onset of disease, *Br.J.Cancer*. 87 (2002) 905-908.
- [15] D. Vesprini, R.K. Nam, J. Trachtenberg, M.A.S. Jewett, S.V. Tavtigian, M. Emami, et al., HPC2 Variants and Screen-Detected Prostate Cancer, *The American Journal of Human Genetics*. 68 (2001) 912-917.
- [16] L. Peiser, S. Gordon, The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes and Infection*. 3 (2) (2001) 149-159.
- [17] Resumen de Inmunología. Receptores Scavenger. 2011 (2011).
- [18] J. Han, A.C. Nicholson, Lipoproteins modulate expression of the macrophage scavenger receptor. , *Am J Pathol*. 152 (1998) 1647-1654.
- [19] Macrófagos receptor scavenger. 2011.
- [20] J.D.P. Han, J. Hajjar, M. Tauras, A.C. Nicholson, Cellular cholesterol regulates expression of the macrophage type B scavenger receptor, CD36., *J.Lipid Res*. 40 (1999) 830-838.
- [21] J. Xu, S.L. Zheng, A. Komiya, J.C. Mychaleckyj, S.D. Isaacs, J.J. Hu, et al., Germline mutations and sequence variants of the macrophage scavenger receptor 1 gene are associated with prostate cancer risk, *Nat.Genet*. 32 (2002) 321-325.
- [22] F. Lindmark, B. Jonsson, A. Bergh, P. Stattin, S.L. Zheng, D.A. Meyers, et al., Analysis of the Macrophage Scavenger Receptor I Gene in Swedish Hereditary and Sporadic Prostate Cancer, *Prostate*. 59 (2004) 132-140.

- [23] D.M. Altshuler, R.A. Gibbs, L. Peltonen, E. Dermitzakis, S.F. Schaffner, F. Yu, et al., Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations, *Nature*. 467 (2010) 52.
- [24] A.W. Hsing, L.C. Sakoda, J. Chen, A.P. Chokkalingam, I. Sesterhenn, Y. Gao, et al., MSR1 variants and the risks of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia: A population-based study in China, *Carcinogenesis*. 28 (2007) 2530-2536.
- [25] L. Wang, S.K. McDonnell, J. Cunningham, M.S. Hebring, S.J. Jacobsen, J.R. Cerhan, et al., No association of germline alteration of MSR1 with prostate cancer risk. *NATURE GENETICS*. 35,2 (2003) 128-129.
- [26] C.M. Robbins, W. Hernandez, C. Ahaghotu, J. Bennett, G. Hoke, T. Mason, et al., Association of HPC2/ELAC2 and RNASEL non-synonymous variants with prostate cancer risk in African American familial and sporadic cases, *Prostate*. 68 (2008) 1790-1797.
- [27] G. Severi, G.G. Giles, M.C. Southey, A. Tesoriero, W. Tilley, H. Neufing, et al., ELAC2/HPC2 polymorphisms, prostate-specific antigen levels, and prostate cancer, *J.Natl.Cancer Inst.* 95 (2003) 818-824.
- [28] N.J. Camp, S.V. Tavtigian, Meta-analysis of associations of the Ser217Leu and Ala541Thr variants in ELAC2 (HPC2) and prostate cancer [1], *Am.J.Hum.Genet.* 71 (2002) 1475-1478.

## ANEXO

### • INFORMACIÓN DE LOS GENES ELAC2 Y MSR1 OBTENIDA DE GENECARDS

#### ELAC2:

- Nomenclaturas y descripción:

A continuación, se van a representar esquemáticamente la información para este gen obtenida de las bases de datos on-line genecards.

Tabla A1: Representación de las siguientes nomenclaturas del gen ELAC2. (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ELAC2>)

Nomenclatura	Descripción
<b>elaC homolog 2 (E. coli)</b>	elaC homolog 2 (E. coli)
<b>HPC2</b>	RNase Z 2
<b>ElaC homolog protein 2</b>	Heredity prostate cáncer protein 2
<b>Ribonuclease Z 2</b>	ELAC2
<b>tRNA 3 endonuclease 2</b>	zinc phosphodiesterase ELAC protein 2

Tabla A2. Información de las distintas bases de datos para el gen ELAC2.

HGNC	Entrez Gene	Ensembl	OMIM	UniProtKB
<b>14198</b>	60528	ENSG00000006744	605367	Q9BQ52

- Información:

La proteína codificada por este gen tiene un dominio C-terminal con el ARNt, con una actividad endorribonucleasa que cataliza la eliminación de la parte 3' terminal del precursor de ARNst. Esta proteína también interacciona con la proteína activada Smad 2 y su homólogo nuclear de dominio H1 (conocido también como FAST-1). Las mutaciones en este gen resultan en un aumento de riesgo del cáncer de próstata. Se han descrito múltiples variantes del transcrito que codifican para las distintas isoformas en este gen.

Según su función se podría definir como una fosfodiesterasa dependiente de Zinc que juega una actividad endonucleasa en el extremo 3' del ARNt, por lo

que probablemente esté implicada en la maduración del ARNt, por la eliminación de este extremo 3' terminal.

- Información citogenética:

Localizado en el cromosoma 17 (17p11.2). Comienza en la 12.894.929 pares de bases (bp) y acaba en la 12.921.381 bp; por lo que cuenta con un total de 26.453 bases.

- Información de la proteína:

La proteína codificada por este gen tiene varias nomenclaturas, RNZ2\_HUMAN, Q9BQ52, pero normalmente se le conoce como proteína ELAC 2 fosfodiesterasa dependiente de Zinc. Posee un tamaño de 826 aminoácidos y 92219 Da. Como cofactor posee al Zinc y la localización subcelular nuclear. Existen tres isoformas denominadas como Q9BQ52-1, Q9BQ52-2 , Q9BQ52-3.

### MSR1:

- Nomenclaturas y descripción:

A continuación, se van a representar esquemáticamente la información para este gen obtenida de las bases de datos on-line genecards.

Tabla A3: Representación de las siguientes nomenclaturas del gen MSR1.

Nomenclatura	Descripción
<b>Macrophage scavenger receptor 1</b>	SR-A
<b>SCARA1</b>	Macrophage acetylated LDL receptor I and II
<b>CD204</b>	scavenger receptor class A, member 1

Tabla A4. Información de las distintas bases de datos para el gen MSR1.

HGNC	Entrez Gene	Ensembl	OMIM	UniProtKB
<b>7376</b>	4481	ENSG00000038945	153622	P21757

Información citogenética:

Localizado en el cromosoma 8p22. Comienza en la base 15.965.387 y acaba en la 16.424.999 por lo que posee un tamaño total de 459.613 bases.

Información de la proteína:

Se le conoce como MSRE\_HUMAN, P21757, pero más comúnmente como receptor *scavenger* de macrófagos tipo 1 y 2. Con un tamaño de 451 aminoácidos y 49762 Da. Se encuentra formando un homotrímero y se localiza en la membrana. Existen tres isoformas P21757-1, P21757-2 y P21757-3.

## **CAPÍTULO 3**

### **Análisis del papel de los haplogrupos y polimorfismos mitocondriales en el cáncer de próstata esporádico**

### **ABSTRACT**

It is known that mitochondrias have an important role in certain diseases, like cancer (prostate, renal, breast or colorectal amongst others); but also they are main organelles to energy metabolism, cell signalling, apoptosis, and cellular homeostasis. These organelles have an important role in apoptosis and production of reactive oxygen species but also, mtDNA reveals history of populations and ancient human migration. Due to their high variability, they have been used not only in anthropology sciences to evidence the migratory movements of populations, but also to identity testing in criminal and missing people cases in forensic field. These events and the variation in mitochondrial genome are thought to be the causes of some cancers like prostate cancer, and also help us to group individuals into common origin groups. The aim of the present study is to analyze the different haplogroups and variations in sequence in the mitochondrial genome of South European Caucasians affected (n=231) and non-affected (n=100) by sporadic prostate cancer. No statistically significant differences in the analysis of mitochondrial DNA were observed, whereas some interesting mutations and differences between patients and controls have been notated.

## 1. INTRODUCCIÓN

Cada célula contiene cientos de mitocondrias, y a su vez, cada una de ellas tiene varias copias del genoma mitocondrial. El ADN mitocondrial (ADNmt) es circular de doble cadena y está compuesto aproximadamente por 1500 genes, entre los que se incluyen ARNr 12S y 16S, ARNt y subunidades esenciales del sistema OXPHOS. Este genoma mitocondrial puede dividirse principalmente en dos regiones; la región control y la codificante. La región codificante está compuesta por 37 genes que actúan en la maquinaria de traducción y como enzimas de la vía de la fosforilación oxidativa [1-3]. La región control, o región no codificante está compuesta por dos zonas hipervariables (HV1 y HV2) y la región D-loop que está implicada en la replicación del ADNmt y en la transcripción [4].

Una mutación en cualquier parte del ADNmt de una célula genera la aparición de una mezcla de genomas mutantes y genomas intactos (o normales), fenómeno que se conoce como heteroplasmia. Tras varios procesos de divisiones celulares, estos genomas pueden segregarse totalmente consiguiéndose células mutantes y células homoplásmicas (o sin mutación). Sin embargo, no siempre las mutaciones van a generar fenómenos patogénicos (mutaciones deletéreas), sino que también pueden ser neutrales, o incluso beneficiosas (produciendo fenómenos adaptativos) [5].

Por tanto, se tienden a realizar principalmente dos clasificaciones de las mutaciones en el ADNmt: las mutaciones tumorigénicas y adaptativas. Mientras que los mutantes tumorigénicos son una mutación más severa del tipo inserciones, deleciones o mutaciones *missense* entre otras y causan principalmente un aumento de ROS (especies reactivas de oxígeno) que finalmente potencia la transformación celular. En cambio, las mutaciones adaptativas no son tan severas lo que permite que se puedan presentar en diferentes poblaciones humanas y a lo largo de los años o en patologías.

Este tipo de mutaciones podrían facilitar la adaptación a diversas condiciones ambientales como pueden ser entre otras la de soportar condiciones de ROS más elevadas [5].



La mayor parte de los cambios mutacionales somáticos en tumores, son *hotspots* asociados a polimorfismos comunes en poblaciones humanas. Estas variantes se suelen considerar como neutras en relación a la función mitocondrial y poseen pocas implicaciones severas en el desarrollo de tumores [6].

Actualmente, se está barajando cada vez con mayor fuerza que las distintas variantes que generan la diversidad haplotípica mitocondrial generen una influencia individual a la predisposición para determinadas patologías.

### **1.1. ADN MITOCONDRIAL**

Es el material genético específico de las mitocondrias, que se encuentra en el interior de las mismas en número variable entre 1000 y 10.000 moléculas de ADNmt por célula [7]. Las mitocondrias son orgánulos ovalados, de doble membrana (externa e interna) que contienen la matriz mitocondrial.

El origen del ADNmt se ha explicado evolutivamente por la teoría endosimbiótica (Lynn Margulis) [8]. Teoría que postula que una célula procariota ancestral pierde inicialmente su pared, permitiéndole introducir por fagocitosis a otras células procariotas más pequeñas especializadas en rutas metabólicas más eficientes. De esta manera, la célula procariota ancestral adquiere determinadas ventajas de supervivencia con respecto a otras. De la asociación de estas células con otras procariotas especializadas en oxidar la materia orgánica a inorgánica con el uso del oxígeno como aceptor de electrones (proceso de respiración celular), surgen las células eucariotas animales. La pérdida de la pared permite que la membrana se invagine al interior y se envuelvan regiones del citoplasma que contienen moléculas especializadas en reacciones químicas (enzimas) o bien que llevan información genética (ADN). Así se generan los orgánulos membranosos de células eucariotas. Una prueba clara de este hecho son las mitocondrias, ya que son orgánulos con doble membrana y con un ADN propio. Su ADN es muy parecido al de las células procariotas, circular y con ribosomas 70S en su interior [9]. Sin embargo, que tenga su material genético propio no significa que sea

genéticamente autosuficiente, sino que gran parte de sus proteínas funcionales y estructurales están codificadas por genes del genoma nuclear.

Las grandes diferencias entre el genoma mitocondrial y el genoma nuclear, les confieren una serie de propiedades muy útiles en el ámbito de la investigación tanto biomédica como en la evolución molecular e identificación de individuos. Como principales características señalaríamos:

- Transmisión uniparental (vía materna), salvo por procesos de mutación todas las personas emparentadas vía materna tienen igual ADNmt [10]. Siendo uno de los rasgos que hace del genoma mitocondrial una herramienta muy útil en casos de identificación humana, como para reconstrucciones de filogenias en poblaciones humanas.
- Presencia en alto número de copias por individuo. Un individuo está formado por alrededor de unos millones de células y cada una de ellas puede contener miles de copias de ADNmt.
- Gran variedad de polimorfismos existentes.
- Elevada tasa de mutación. En concreto de 5-10 veces superior a la del ADN nuclear y su consecuente tasa de fijación (es decir que las mutaciones que se producen, se conservan). Las principales causas de este porcentaje elevado de tasa de mutación, son el hecho de que el ADNmt es muy sensible al daño oxidativo producido por los radicales libres liberados en la zona, además de que carece del efecto protector de las histonas (proteínas que si están presentes en el ADN nuclear) y la baja fidelidad de la polimerasa del ADNmt junto con la aparente carencia de mecanismos de reparación (lo que favorece la tasa de fijación) [11]. Esta alta tasa de mutación genera una alta hipervariabilidad en la población humana.

En determinadas ocasiones, como se dijo anteriormente el efecto de las mutaciones puede traducirse en la presencia de heteroplasmas. Por lo que, coexistirán dos o más poblaciones de ADNmt en una sola mitocondria (intramitocondrial), en una sola célula (intracelular) o en un solo individuo (intercelular) [12]. La heteroplasma se genera por fenómenos de

segregación mitótica (Figura 1), donde se producen las distintas posibilidades de poblaciones mitocondriales (homoplasma normal, homoplasma mutada y heteroplasma).

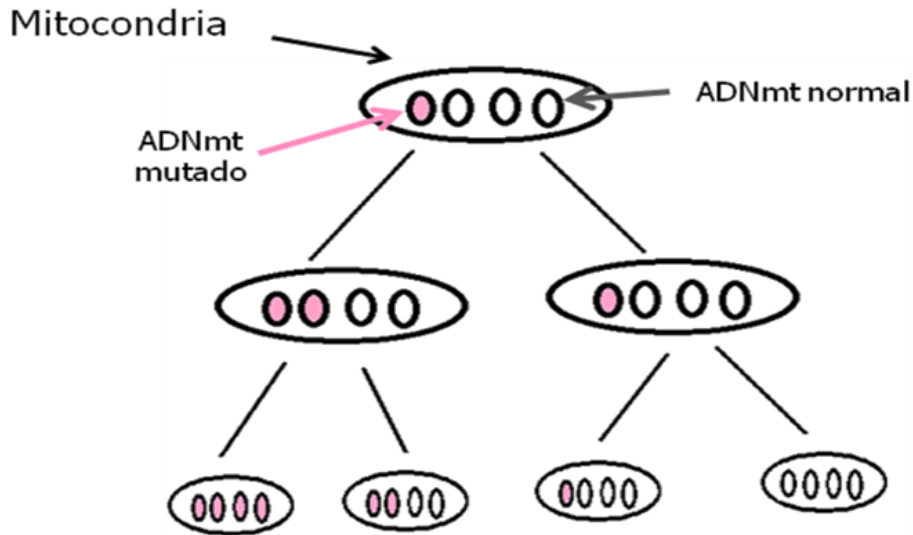


Figura 1: Heteroplasma y segregación mitótica.

Podemos clasificarla en:

- Heteroplasma de secuencia: en una posición determinada de la secuencia del ADNmt hay más de una base, por ejemplo la coexistencia de C/T (Figura 2).

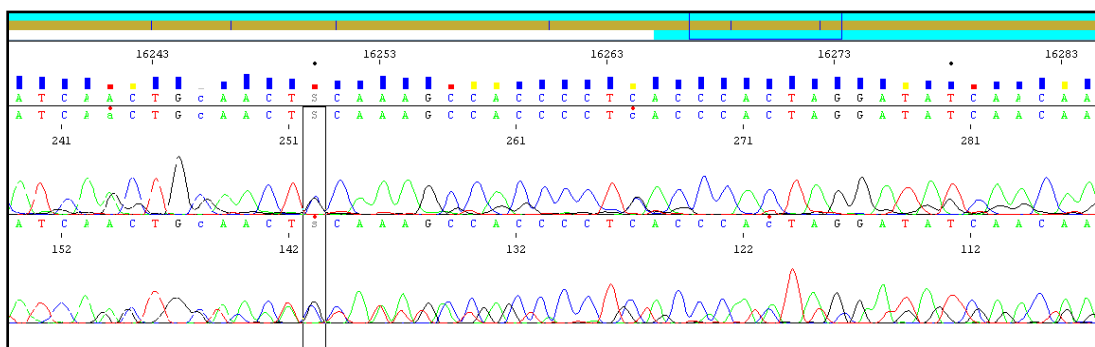


Figura 2: Heteroplasma de secuencia. Dentro de un recuadro, se observa la coexistencia de C/G.

- Heteroplasma de longitud: la variación en el número de bases existentes se da en un fragmento homopolimérico. Un ejemplo típico en la secuencia de

ADNmt humano ocurre en el fragmento de poliC de HV2 donde existe una variación en el número de C (Figura 3).

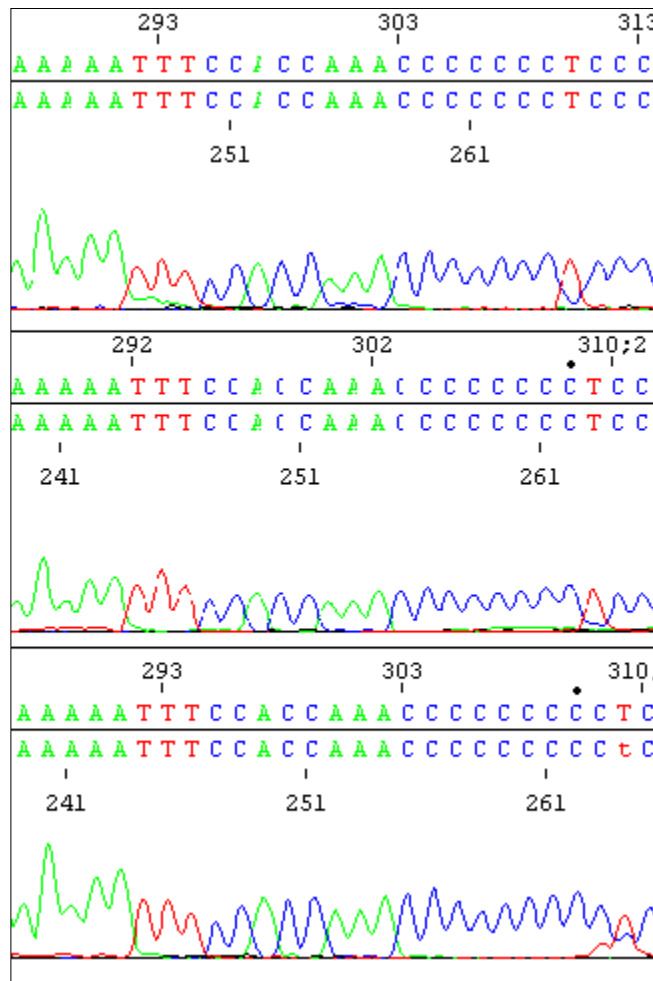


Figura 3: Heteroplasma de longitud en la posición 309C. En la imagen superior se observa la secuencia de referencia, la imagen del medio representa una inserción en la posición 309.1C y la imagen inferior muestra una inserción en la posición 309.2C.

### Morfología

Como hemos mencionado anteriormente, el ADNmt es un ADN doble y circular (Figura 4). Las hebras se denominan hebra pesada o H (*Heavy*) (posee mayor cantidad de adeninas y guaninas o bases púricas) y hebra ligera o L (*Light*) (más rica en citosinas y timinas o bases pirimidínicas). Tiene un total de 16.569 pb y codifica para 13 proteínas que forman parte del Complejo 1, 3 y 4

de la cadena respiratoria, y otras forman parte de las subunidades de la ATPasa [13].

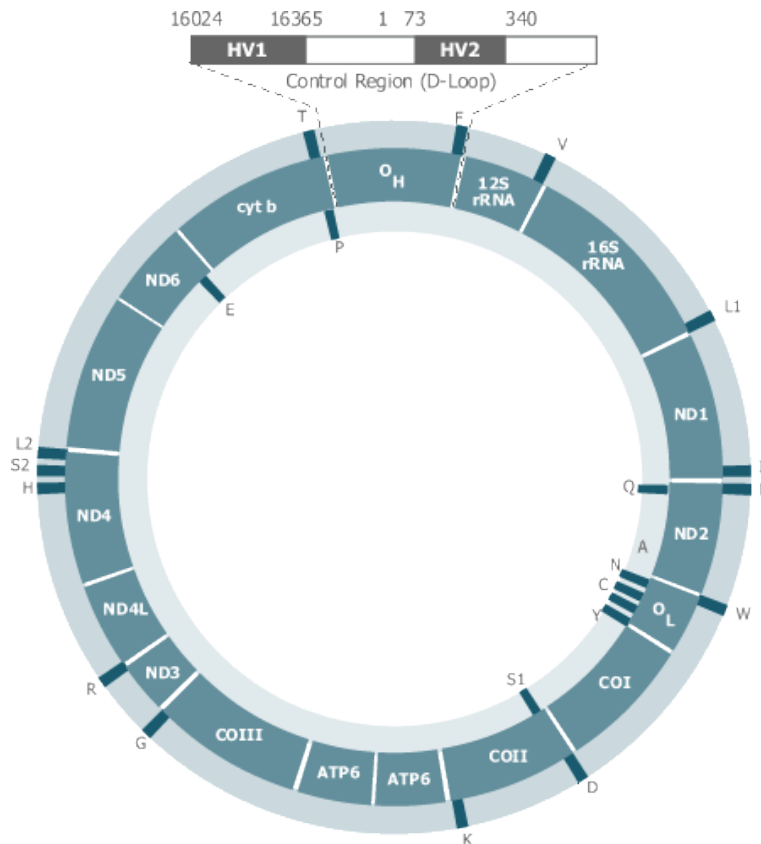
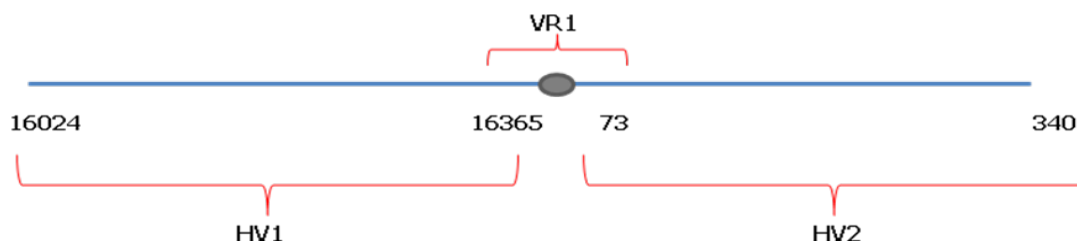


Figura 4: ADNmt. Imagen del ADNmt y representación de sus principales partes.

Se pueden diferenciar dos regiones principales, la región control o *D-loop* y la región codificante. La región control tiene una longitud de alrededor de 1122 pb, contiene los promotores de transcripción de ambas cadenas (H y L) y el origen de replicación de la cadena pesada y sitios de unión para factores de transcripción mitocondrial. Abarca desde la posición 16.024 hasta la 16.569 continuando desde la posición 1 hasta la 576. [13]. Dentro de esta zona control (cuya principal característica es la elevada variabilidad entre individuos), se encuentran dos regiones conocidas como hipervariable 1 (16.024 - 16365) e hipervariable 2 (73 -340) [7]. Hay quien señala una tercera región hipervariable menos conocida HV3 que comprende las regiones de la 440 a la 560 (Figura 5) [14]. Existe mayor variabilidad en HV1 por lo que es la más usada para estudios poblacionales [15].



REGIONES VARIABLES	Número de pares de bases (pb)
Región control (16024-576)	1122pb
HV1 (16024 - 16365)	342 pb
HV2 (73 - 340)	267 pb
HV3 (440 – 560)	121 pb
VR1 (16366 – 72)	267 pb
VR2 (341 – 576)	263 pb

Figura 5. Regiones hipervariables y pares de bases en el genoma mitocondrial.

## 1.2. HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES

Como se ha señalado anteriormente, el ADNmt puede sufrir alteraciones que generan fenómenos adaptativos (mutaciones adaptativas), en los que puede verse afectado por una selección positiva poblacional. El conjunto de variantes relacionadas en una sola molécula de ADNmt se conoce como *haplotipo* de ADNmt. Como haplotipo mitocondrial se define a la secuencia de una determinada molécula de ADNmt. Se le denomina haplotipo por las características específicas del genoma mitocondrial que es haploide, ya que posee una herencia uniparental materna [10,16-18] (Figura 6).

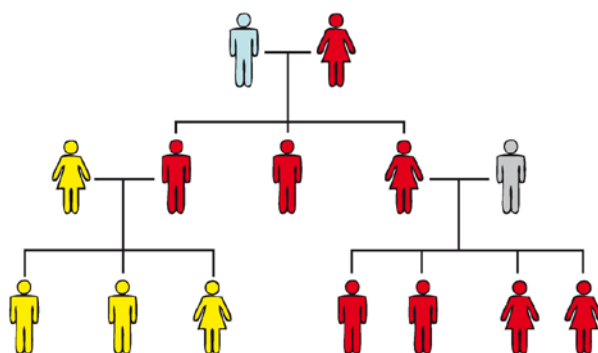


Figura 6. Herencia materna del ADNmt.

En la población humana se han acumulado un gran número de sustituciones de distintas bases en el ADNmt por agentes mutagénicos como radiaciones entre otros, que han supuesto pequeños cambios y combinaciones que constituyen los haplogrupos mitocondriales [3,4,19]. Los haplogrupos suelen ser específicos de cada región geográfica y ayudan a describir parámetros de antropología molecular. Se ha comprobado que el ADN de la mitocondria posee un cierto número de posiciones que definirán el haplogrupo de un individuo. El número de posiciones que se caracterizan van aumentando, lo que hace que a su vez vaya aumentando el número de subdivisiones dentro de los haplogrupos. En genética humana, los haplogrupos mitocondriales nos permiten trazar la herencia matrilineal hasta los orígenes de la especie humana en África y la consiguiente expansión por la superficie del planeta. La mujer africana de la cual provienen estos grupos se considera como el antepasado femenino común a los seres vivos más reciente y se denomina *Eva mitocondrial* [20-22].

La nomenclatura actual fue propuesta por Wallace y Torroni [23] mediante la designación con una letra mayúscula (Ej.: A, B, C, D, H, I, L, U, V). A su vez dentro de éstos grupos (que corresponden con los clusters) existen subgrupos (o subclusters) que se van a designar por la letra correspondiente más un número, por ejemplo H1. Debido a que se ha evolucionado a grandes pasos en este ámbito, se necesitaron de nuevo otras codificaciones para nombrar a nuevas subdivisiones, mediante la combinación de letras (cluster) junto con números y letras minúsculas, un ejemplo sería U5a1b.

De hecho los haplogrupos más antiguos se denominan L0, L1 y L2 y se localizan principalmente en la región africana. De éstos, por diversos cambios posicionales en el ADNmt, surgieron otros haplogrupos que se distribuyeron por todas las regiones geográficas. De este modo, la región europea, se caracteriza por un elevado porcentaje de haplogrupos H, I, J, U, K, T, U, V, W y X [5]. Cada uno de ellos, a su vez es específico de determinadas regiones del continente europeo (Figura 7).



Figura 7. Expansión de las poblaciones humanas siguiendo la distribución de haplogrupos de ADNmt. Imagen tomada de [www.dnaroottester.com](http://www.dnaroottester.com) (2010)

Aunque la mayoría de los polimorfismos mitocondriales se consideran neutrales son específicos de determinadas poblaciones lo que puede ejercer variaciones que influyan en el desarrollo de determinadas patologías [3,24-26]. De hecho, ya existen estudios que demuestran determinadas asociaciones entre algunas enfermedades como el cáncer y los polimorfismos mitocondriales. Tal es el caso del polimorfismo 10398A implicado en el aumento de producción de ROS y que parece ser un factor de riesgo en el cáncer de esófago y de pulmón en pacientes indios y de igual forma para cáncer invasivo de mama en población femenina afroamericana [27,28].

Dentro de los haplogrupos mitocondriales, podemos obtener la siguiente clasificación:



- El **haplogrupo H** se deriva del haplogrupo HV y es uno de los más característicos de toda Europa, ocupando un 40% de su población. En la España, se localiza en Galicia (59,2%); País Vasco (57,8%) y 46,2% en Andalucía, entre otros [29]. El porcentaje de H1 es especialmente alto en Noruega (30%) y España (18-25%). H3 principalmente en Portugal (12%) y regiones del Norte de España como Galicia (10%) y País Vasco (10%). El haplogrupo V, alcanza su máxima frecuencia en norte de países escandinavos (40%) y Norte de España (8%) [30].
- El **haplogrupo U**, destacamos en Europa U3, U4, U5 (más común de Europa Norte y Occidental) y U8/K. El U6 se confina principalmente al Norte de África [30].
- El **haplogrupo K**, la concentración más elevada se encuentra en el Norte-Occidente y Centro-Europa, junto con regiones como Anatolia y Sur de la península arábiga. Es uno de los haplogrupos con mayor número de subclados. La mayoría de los subclados K1a4, K1a10, K1b, K1c y K2 son típicos europeos [30].
- El **haplogrupo J**, es uno de los haplogrupos mitocondriales más antiguos de Europa y el Medio Oriente. J1 se confina principalmente a los países germanos. J2 es menos frecuente que el J1. J2a se encuentra homogéneamente distribuido a través de Europa. J2b es más frecuente en el Sur Este Europeo [30].
- El **haplogrupo T**, se encuentra poro toda Europa, mitad norte de África y Asia Central. El subclado T2 es el mayor de toda Europa, y particularmente común en el Nordeste Europeo [30].
- El **haplogrupo W**, presenta una baja frecuencia en Europa, sus porcentajes más elevados los presenta en Ucrania, Rusia, países Bálticos y Finlandia (con valores entre 3-5%) [30].
- El **haplogrupo I**, tiene una distribución similar al haplogrupo W. Se encuentra prácticamente ausente en determinadas partes de Europa (como España, Francia e Irlanda) [30].
- El **haplogrupo X**, es uno de los haplogrupos más antiguos que se distribuye por Eurasia y Norte África. X1, es casi exclusivo del Norte de

África, mientras que X2b presenta un linaje amerindio. Los X2 (X2a, X2c, X2d y X2e) se encuentran en Europa, Siberia y Centro de Asia [30].

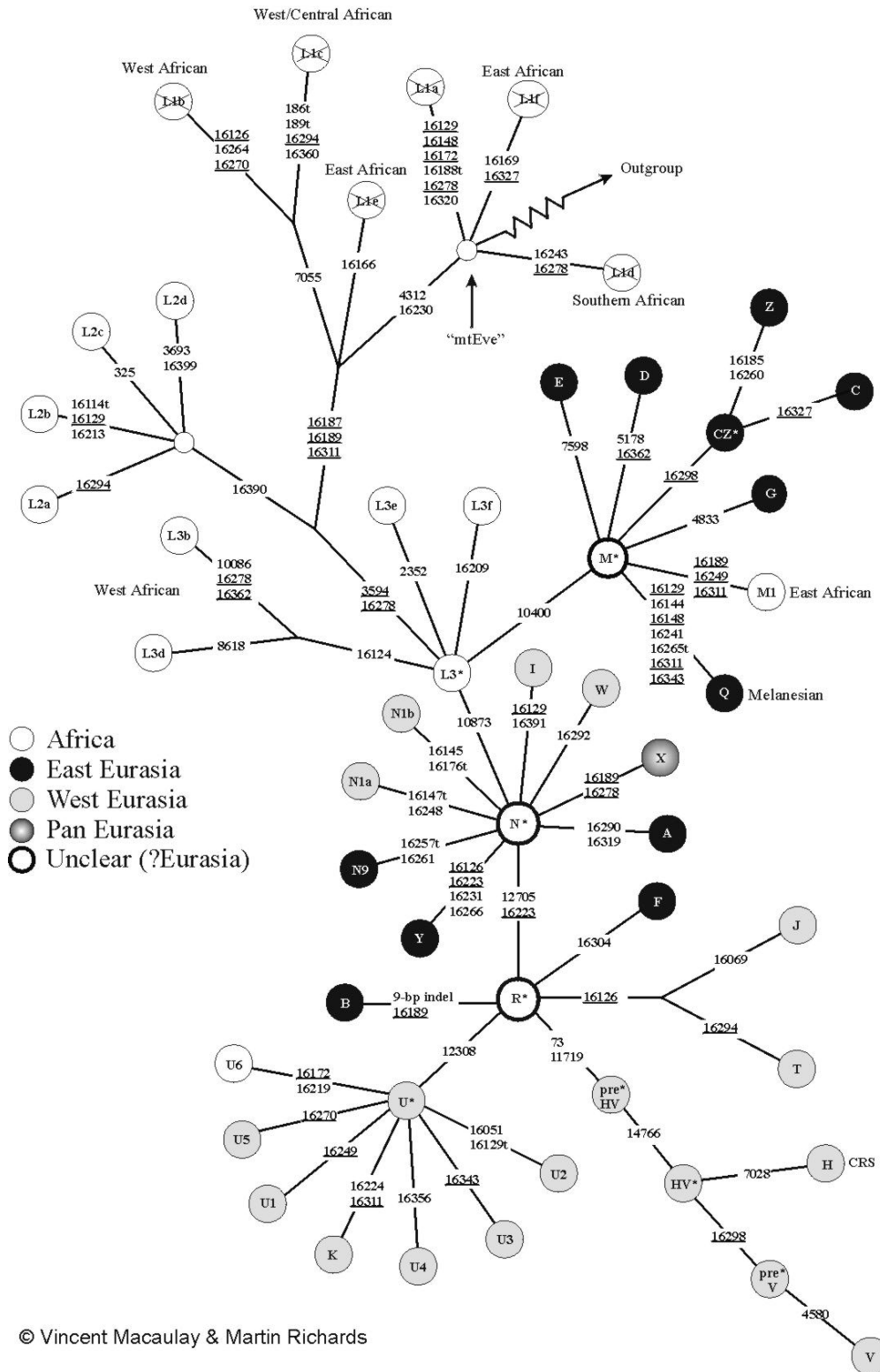


Figura 8: Árbol de haplogrupos mitocondriales.

Imagen que representa los distintos haplogrupos mitocondriales, describiendo las principales mutaciones que subdividen las variantes existentes. Se puede ver marcada la situación de la *Eva mitocondrial* mediante el símbolo "mtEve". Imagen obtenida de:

<http://www.stats.gla.ac.uk/~vincent/images/skeleton07-08-02.jpg>

### 1.3. MITOCONDRIAS Y ENFERMEDAD

Es bien conocida la principal función de las mitocondrias en la producción de ATP mediante el sistema de fosforilación oxidativa (OXPHOS). Mediante éste se usan las grandes cantidades de NADH que se han producido en el ciclo de Krebs y mediante procesos de oxidación del NADH con la fosforilación del ADP y el transporte electrónico se generan las cantidades de ATP necesarias gracias a la acción de la ATP sintasa.

Existen gran cantidad de alteraciones en el metabolismo oxidativo mitocondrial, lo que condiciona un conjunto de enfermedades mitocondriales (Tabla 1). Se denominan citopatías o miopatías mitocondriales aquellas disfunciones de la cadena respiratoria mitocondrial.

Las enfermedades mitocondriales siguen patrones de transmisión particular, bien pueden ser de transmisión autosómica (ya que parte de la función mitocondrial está regulada por ADN nuclear); o bien de transmisión vertical o materna, para aquellas alteraciones de ADNmt (parte de la función mitocondrial está regulada por el ADNmt) [31].

Tabla 1: Tipos de enfermedades mitocondriales[32].

<b>Mutaciones en el ADNmt</b>	<b>Enfermedades por defectos genéticos que alteran la estabilidad del ADNmt</b>	<b>Enfermedades por defectos en genes nucleares que codifican proteínas de los complejos enzimáticos de la CRM</b>	<b>Enfermedades por defectos de genes que codifican proteínas relacionadas indirectamente con la oxidación fosforilativa</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Kearns-Sayre.</li> <li>• Síndrome de Pearson.</li> <li>• Oftalmología progresiva externa.</li> <li>• Encefalopatía mitochondrial.</li> <li>• Epilepsia mioclónica con fibras "ragged red" (MERRF).</li> <li>• Ataxia, sordera, epilepsia.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oftalmoplejía externa progresiva.</li> <li>• Encefalomiopatía neuro-gastrointestinal mitocondrial.</li> <li>• Miopatía congénita fatal infantil.</li> <li>• Hepatopatía fatal infantil.</li> <li>• Microcefalia congénita de Amish.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Síndrome de Leigh.</li> <li>• Paraganglioma hereditario.</li> <li>• Hiperpotasemia y acidosis láctica.</li> <li>• Ataxia, epilepsia, miopatía.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ataxia de Friederich.</li> <li>• Ataxia ligada al cromosoma X y anemia sideroblástica.</li> <li>• Paraparsia espástica hereditaria.</li> <li>• Síndrome de sordera-distonía ligada al cromosoma X.</li> <li>• Atrofia óptica.</li> </ul>

Aunque no son pocos los casos descritos de patologías mitocondriales, no son éstos los únicos procesos en los que se relaciona la mitocondria con la enfermedad. De hecho la relación tan intrínseca que guardan las mitocondrias con los procesos de apoptosis celular hacen que se deriven también patologías como el cáncer, relacionadas con alteraciones en la apoptosis.

Se sabe que en los organismos pluricelulares la homeostasis celular se logra gracias a un balance entre la división y eliminación de celular [33]. Ambos procesos están altamente regulados para poder permitir el funcionamiento correcto de la homeostasis celular.

Uno de los principales mecanismos que regulan la muerte celular es el proceso conocido como apoptosis, fenómeno descrito por Carl Vogt en 1842 [34]. Se define como el mecanismo fisiológico de muerte programada y se encuentra regulado por una serie de genes y mecanismos bioquímicos [35] desencadenados por una variedad de señales, estímulos (tanto fisiológicos, como ambientales o exógenos) [33,36,37] y principalmente relacionada con la acción de las caspasas.

El proceso que más nos interesa es la relación entre apoptosis y cáncer, ya que es una de las causas por las que el genoma mitocondrial está relacionado con el desarrollo de tumores, bien por la exposición a un determinado ambiente, a la dieta o bien a agentes infecciosos, entre otros factores [38] que generan efectos que modifican diversas vías celulares incluyendo la resistencia a la apoptosis [39].

Si bien no es tampoco el único mecanismo que relaciona el genoma mitocondrial con el desarrollo del cáncer ya que se han descrito casos en determinados cánceres y poblaciones en los que hay relaciones entre haplogrupos mitocondriales y el desarrollo de tumores. Casos como este, han sido descritos en poblaciones americanas en pacientes de cáncer de próstata y riñón. En estos individuos los pacientes con el haplogrupo U, poseían un riesgo relativamente mayor a padecer estos tumores al compararse con los individuos controles [40].

#### 1.4. APLICACIONES DEL ADNmt

Se ha comprobado a lo largo de esta introducción la gran importancia del genoma mitocondrial y las características tan específicas y peculiares que posee. Esto le permite una aplicación en gran cantidad de campos científicos y médicos, que se detallan a continuación.

##### *Estudios de enfermedades mitocondriales*

Como se detalló en el apartado "Mitocondrias y enfermedad", aunque existe una gran cantidad de enfermedades mitocondriales o más concretamente, citopatías mitocondriales. Sin embargo, el papel de las mitocondrias en el desarrollo de tumores parece cada vez más importante y relevante [31].

##### *Estudios poblacionales y de diversidad humana*

Apartado descrito con detalle en esta introducción (haplogrupos mitocondriales). La región control del ADNmt se usa para estudios de: evolución humana, origen de poblaciones, estudios filogenéticos y de mestizaje [41-43]. En estudios filogenéticos, las variaciones en el ADNmt se utilizan para la construcción de árboles filogenéticos [44].

##### *Identificación Humana*

En el campo de la identificación humana y la medicina forense, gracias a las herramientas genéticas, se ha derivado una rama denominada genética forense. En el ámbito de la genética forense se estudian tanto ADN nuclear como ADNmt. El ADN nuclear es una herramienta muy útil y de hecho prácticamente rutinaria en la identificación genética humana. Sin embargo, en determinados casos es imposible obtener información suficiente o con una calidad óptima del mismo, como son los casos en los que hay poca cantidad de muestra o bien está excesivamente degradada. En estas y otras situaciones específicas, el ADNmt puede servirnos como alternativa al análisis genético. Como muestras características para el análisis del ADNmt son pelos sin bulbo, restos óseos antiguos, restos de personas desaparecidas [44-46].

### *Estudios de relaciones familiares (hermandad y maternidad), linaje*

Como se ha descrito anteriormente, una de las principales peculiaridades del ADNmt es la herencia materna. Por ello, en determinados casos como estudios de parentesco entre familiares relacionados por vía materna, podemos incluso usar familiares lejanos sin necesidad de ser de primer grado obteniendo gran cantidad de información genética [44,47-49] e incluso estudiar linajes completos como es el caso del Zar Nicolás de Rusia [50].

### *Identificación de especies no humanas*

En especies no humanas, una región del ADNmt situada en el gen del citocromo b, en concreto zonas en el extremo 5', se usan de forma rutinaria para el análisis de identificación de otras especies [44,51].

## **1.5. ADNmt Y CÁNCER DE PRÓSTATA**

Después de esta introducción y tras haber abordado un apartado específico de "Mitocondrias y enfermedad", parece razonable intentar buscar una posible relación entre determinadas mutaciones y/o alteraciones del genoma mitocondrial con el cáncer de próstata. Ya hemos visto que la apoptosis es uno de los principales desencadenantes de los tumores en humanos, pero además, varios estudios han analizado la posible relación entre los haplogrupos mitocondriales y el cáncer de próstata. Algunos de estos estudios en poblaciones norteamericanas han conseguido encontrar una asociación clara entre el haplogrupo U y el riesgo a padecer cáncer renal y prostático [52]; sin embargo, otros realizados en poblaciones coreanas y centro europeas no han conseguido resultados estadísticamente significativos que puedan diferenciar unos haplogrupos entre los pacientes afectados por cáncer de próstata [53,54]. Como se comenta en el capítulo 1, el cáncer de próstata varía enormemente entre las distintas poblaciones, por lo que se quiere realizar un estudio profundo a nivel de mutaciones mitocondriales y haplogrupos mitocondriales que afectan al cáncer de próstata en la población sur europea.

La tasa de mutación en la región control, es diez veces mayor a la existente en la región codificante [55]. Pero las diferencias de tasas de mutación no sólo se restringen a las regiones codificantes y no codificantes, sino que existen diferencias entre las bases [56,57]. De hecho, en la zona control posiciones como las 146, 150, 152, 195, 16.189, 16.311, 16.362, 16.519 son puntos calientes de alta variación, mientras que otras como 477, 493, 16.108, 16.219 parecen bastante estables, así mismo, esta diferencia entre bases se observa también en la zona codificante [55,58-60].

La región no codificante es interesante no sólo por su relativa riqueza en la variación de la secuencia, sino también por la información de haplogrupos que se puede obtener de la misma. Siendo este el punto central de nuestro estudio, basándonos en estudios previos que relacionan los haplogrupos con patologías oncológicas (cáncer de mama, colorectal y tiroides)[61], al igual que con patologías como el SIDA [62].



## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

Se ha detallado el procesamiento de las muestras para secuenciación de ADNmt en el capítulo de “Materiales y Métodos”. En resumen, las principales diferencias entre el procesamiento de las muestras de ADNmt y las muestras de ADNn es la cantidad de ADN usado (1-2ng/μl), la técnica y procedimiento utilizado.

### 2.1. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO

En este caso se han empleado los siguientes softwares estadísticos:

- **SPSS v.15.0:** programa estadístico que nos permite trabajar con bases de datos de gran tamaño. Permite la posibilidad de recodificar las variables y registros según las necesidades del estudio. Consta básicamente de un módulo anexo que se va actualizando constantemente con nuevos procedimientos estadísticos [63,64]. Se han realizado los test de  $\chi^2$ , test exacto de Fisher's, test de Monte Carlo test y tablas de contingencia.
- **Arlequin:** se usa para el análisis de datos genéticos en la población y su principal objetivo es dar al usuario una gran variedad de métodos y tests estadísticos, para obtener información de las características genéticas y demográficas de una colección muestral de una o varias poblaciones [65]. Principalmente se ha realizado el análisis de AMOVA (acrónimo del inglés: Analysis of Molecular Variance). Se trata de un análisis de varianzas de frecuencias genéticas, pero además el software de Arlequin nos permite tener en cuenta el número de mutaciones entre los haplotipos. Así, el AMOVA puede usarse para describir la variabilidad genética entre y dentro de los grupos; además de poder elegir agrupamientos de poblaciones definidas.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de todo este capítulo se ha comprobado la gran utilidad del ADNmt humano ya que se puede usar como una herramienta eficiente en diversos y gran cantidad de campos científicos (antropológicos, médicos y forenses entre otros). Este capítulo se ha centrado en el análisis de la región control del ADNmt, tanto en el estudio de haplogrupos como en la búsqueda de nuevas variantes que puedan desarrollar un papel importante en nuestra población en el cáncer de próstata.

#### 3.1. HAPLOGRUPOS MITOCONDRIALES (CONTROLES Y PACIENTES)

En la cohorte que se ha analizado, se han obtenido principalmente cinco haplogrupos prevalentes, los haplogrupos H, U, K, J y T. Se han testado también la presencia de otros haplogrupos como es el caso del L, R y W. Sin embargo, estos fueron encontrados en un porcentaje mínimo en la población de estudio, lo que guarda coherencia con la población europea.

De este modo, la región europea se caracteriza por un elevado porcentaje de haplogrupos H, I, J, U, K, T, U, V, W y X [5]. Lo que concuerda totalmente con los obtenidos en nuestra cohorte (H, U, K, J, T y un bajo porcentaje de L, R y W). Si se subdivide el estudio en pacientes y controles (Figura 9 y Tabla 2), los haplogrupos H y U poseen los porcentajes más altos en pacientes al compararlos con los controles. Ocurre lo contrario con los haplogrupos J, T y K que son predominantes en controles. Además, hay haplogrupos como L1, L2, L3e2, M1, M5a, C4a1, H11a, H1b, H2, I5a, J2a1a, T2b, U2, U5, U6, W1e y X2d; que no se presentan en controles. De igual forma hemos encontrado haplogrupos que solo se han presentado en controles; L1b1, L1c2a2, L3a, L3h1, M5c2, H1f, H1k, H20, HV6, HV7, T2b3a, U3, U4, U5b3, U6, X2h y P (Figura 10).

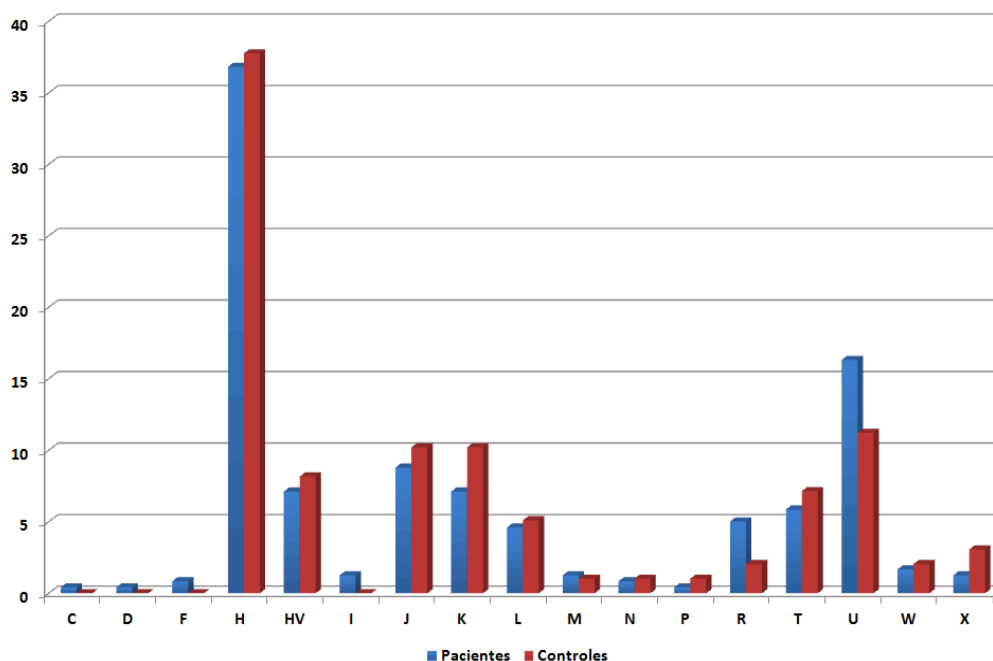


Figura 9: Gráfico de barras de haplogrupos ADNmt pacientes / controles.

Estudios de ADNmt en la población española han generado una caracterización haplotípica de la misma. El haplogrupo H es el más común, seguido de los haplogrupos U, J, T y V con una frecuencia mínima de 6.4% [66].

Tabla 2: Representación de los porcentajes de los haplogrupos mitocondriales en la población española, controles y pacientes de este estudio.

	% Hap. pob.española	% Hap. controles	% Hap. pacientes
<b>Haplogrupo H</b>	42.3%	46.2%	56.3%
<b>Haplogrupo U</b>	16%	8.5%	15%
<b>Haplogrupo T</b>	8.3%	6.6%	4.7%
<b>Haplogrupo J</b>	6.7%	5.7%	4.7%
<b>Haplogrupo K</b>	4.8%	10.6%	6%
<b>Haplogrupo I</b>	1.6%	1.3%	0.8%

(Hap.= haplogrupo); (pob.=población). Los datos obtenidos referentes a la población española han sido tomados del artículo *“Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set. J.C. Alvarez, D.L.E. Johnson, J.A. Lorente, E. Martinez-espin, L.J. Martinez-Gonzalez, M. Allard, et al., Leg.Med. 9 (2007) 293-304 [66].”*

Como se observa, los porcentajes obtenidos en la cohorte analizada son similares a los haplogrupos de ADNmt de la población española. Nuestra cohorte de estudio se confina al sur de España, más concretamente a la región de Andalucía y a la zona de Granada. Las leves diferencias pueden ser debidas a la influencia genotípica del Norte de África que existe en esta región estudiada. Así, en las regiones del Norte de África el haplogrupo H posee también un porcentaje elevado, en concreto; 25.6% en argelinos, 26.5% en tunucios y un 36.8% en bereberes marroquíes. Dentro de la propia península Ibérica también existen una desproporción de los haplogrupos de ADNmt; ya que haplogrupos como el V alcanzan un 10% en vascos, 21.6% en cántabros, y 5.2% en gallegos, pero es muy baja en el centro peninsular y Valencia. Otros haplogrupos como el I, alcanzan en Andalucía, un 1.9%. W presenta una irregular dispersión; alcanza el 5% en Cataluña, está ausente en Valencia y País Vasco y entre 1 y 2% en el resto. Por último X, con bajas frecuencias en todas las poblaciones, tiene un pico en el centro de Portugal del 3.6% [67].

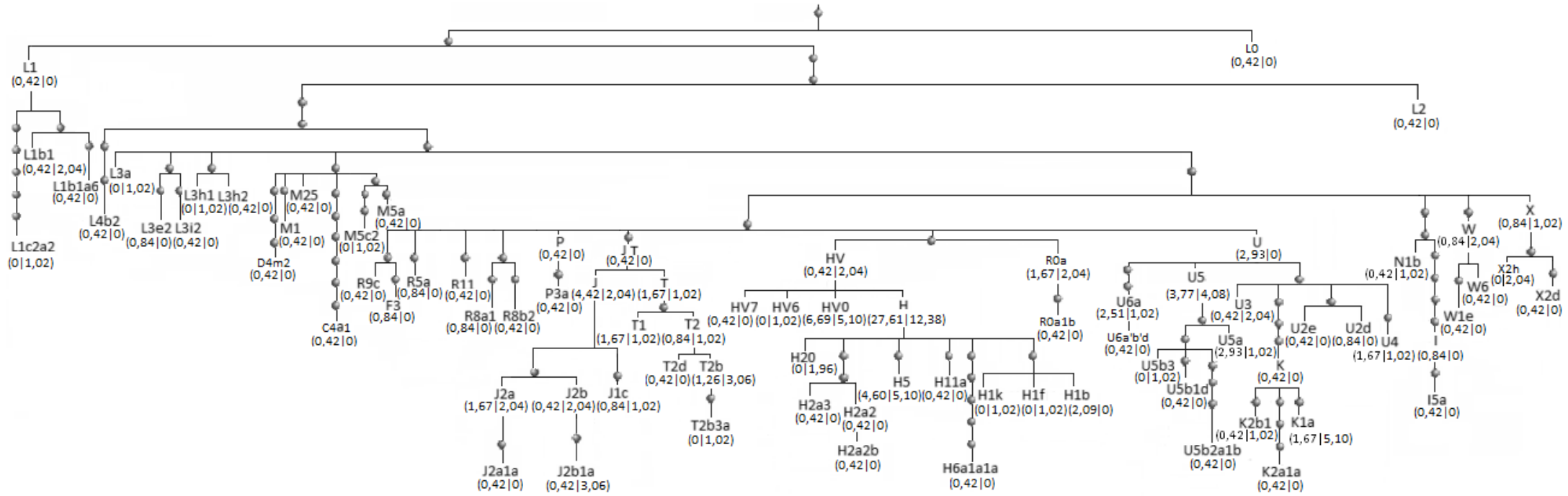


Figura 10: Árbol de distribución de los haplogrupos mitocondriales en pacientes y controles.

Se representan las proporciones de pacientes y controles en cada haplogrupo. Se usa la siguiente notación (pacientes- controles).

### 3.2. ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS CLÍNICOS

Para analizar la posible relación entre los haplogrupos mitocondriales y los datos clínicos de la población de estudio, se han realizado una serie de tests estadísticos mediante el software SPSS v15.0 (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los resultados estadísticos de haplogrupos e información clínica de pacientes.

	Haplogrupo H		Haplogrupo U		Haplogrupo K		Haplogrupo J		Haplogrupo T	
	OF-EF - %	p-valor	OF-EF - %	p-valor	OF-EF - %	p-valor	OF-EF - %	p-valor	OF-EF - %	p-valor
<b>EDAD</b>										
≤ 55	10-10.6-7.1%	0.431 (F)	3-2.6-8.8%	0.431 (F)	1-0.9-8.3%	0.431 (F)	1-0.8-9.1%	0.431 (F)	1-0.8-9.1%	0.431 (F)
56-60	14-15.3-10%	0.371 (MC)	2-3.7-5.9%	0.371 (MC)	1-1.3-8.3%	0.371 (MC)	2-1.2-18.2%	0.371 (MC)	4-1.2-36.4%	0.371 (MC)
61-65	34-27.9-24.3%		4-6.8-11.8%		1-2.4-8.3%		2-2.2-18.2%		1-2.2-9.1%	
> 65	82-86.3-58.6%		25-20.9-73.5%		9-7.4-75%		6-6.8-54.5%		5-6.8-45.5%	
<b>ESTADIO</b>										
A	6-5.3-4.3%	0.851 (F)	1-1.3-2.9%	0.851 (F)	1-0.5-8.3%	0.851 (F)	0-0.4-0%	0.851 (F)	0-0.4-0%	0.851 (F)
B	84-85.8-60.9%	0.837 (MC)	20-21.1-58.8%	0.837 (MC)	9-7.5-75%	0.837 (MC)	9-6.8-81.8%	0.837 (MC)	6-6.8-54.5%	0.837 (MC)
C	34-32.4-24.6%		10-8-29.4%		1-2.8-8.3%		1-2.6-9.1%		2-2.6-18.2%	
D	14-14.5-10.1%		3-3.6-8.8%		1-1.3-8.3%		1-1.2-9.1%		3-1.2-27.3%	
<b>PSA</b>										
≤ 4.0	1-0.6-0.8%	0.723 (F)	0-0.2-0%	0.723 (F)	0-0.1-0%	0.723 (F)	0-0.1-0%	0.723 (F)	0-0.1-0%	0.723 (F)
4.1-10	60-60.4-47.6%	0.679 (MC)	15-14.9-48.4%	0.679 (MC)	4-5.3-36.4%	0.679 (MC)	5-5.3-45.5%	0.679 (MC)	4-5.3-36.4%	0.679 (MC)
10.1-20	34-36.4-27%		9-8.9-29%		3-3.2-27.3%		6-3.2-54.5%		3-3.2-27.3%	
>20	26-23.4-20.6%		6-5.8-19.4%		2-2-18.2%		0-2-0%		2-2-18.2%	
>1000	5-5.2-4%		1-1.3-3.2%		2-0.5-18.2%		0-0.5-0%		2-0.5-18.2%	
<b>ESCALA GLEASON</b>										
2-6	96-91.3-70.1%	0.578 vr	19-22-57.6%	0.578 vr	7-8-58.3%	0.578 vr	9-7.3-81.8%	0.578 vr	5-7.3-45.5%	0.578 vr
7	25-28.5-18.2%	0.592 cv	9-6.9-27.3%	0.592 cv	4-2.5-33.3%	0.592 cv	1-2.3-9.1%	0.592 cv	4-2.3-36.4%	0.592 cv
8-10	16-17.2-11.7%		5-4.1-15.2%		1-1.5-8.3%		1-1.4-9.1%		2-1.4-18.2%	

vr: razón de verosimilitud, cv: valores de contingencia; F: Test de Fisher; MC: Test de Monte Carlo; OF: frecuencia observada; EF: frecuencia esperada; %: porcentaje de los haplogrupos en pacientes.

Como en todos los análisis estadísticos, un resultado se denomina estadísticamente significativo cuando no es probable que se haya debido al azar. El nivel de significatividad se expresa normalmente por  $\alpha$ , y en este caso se ha tomado el valor 0.05 como nivel de corte para el p-valor. Cuanto menor sea el nivel de significatividad, más fuerte será la evidencia de que un hecho no se debe al azar. Sin embargo, hay casos en los que no se observan valores de  $\alpha$  significativos y, al representar gráficamente los datos estadísticos se pueden observar diferencias entre los controles y pacientes (Tabla 3).

De esta forma, se han analizado las relaciones entre los parámetros clínicos asociados con progresión e invasividad del tumor (PSA, escala de Gleason y Estadio) con las frecuencias de los haplogrupos. No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas entre pacientes y los parámetros clínicos. Tampoco es raro no encontrar ningún tipo de asociación entre las variables haplogrupo y cáncer de próstata, ya que en poblaciones coreanas [53] y en poblaciones de europeos de centro Europa [54] se han desarrollado estudios similares, y sin embargo no se han encontrado diferencias entre pacientes y controles. Se describió la presencia de haplogrupo U al igual que hemos encontrado en nuestra cohorte de estudio, pero no se pudieron describir diferencias entre controles y pacientes.

Sin embargo, si realizamos una representación gráfica de estos datos (Figura 11), podemos observar que en el haplogrupo H hay un destacado predominio del estadio B seguido por el C y una mínima proporción (4.3%) de la población se encuentra en el estadio A. En el haplogrupo U, observamos un patrón de distribución poblacional similar (Tabla 3). En el resto de haplogrupos (J, K y T) hay prevalencia del estadio B (81.8%, 75% y 54.5% respectivamente), con respecto al resto de estadios. En el resto de parámetros clínicos PSA y Gleason, no se encuentra una diferencia tan clara entre los haplogrupos U y H con respecto al resto (Tabla 3). De hecho, Excepto el haplogrupo J que no posee valores de PSA por encima de 20 ng/mL, el resto (H, U, K y T) poseen porcentajes elevados en valores por encima de 10.1

ng/mL. Patrón que se repite para valores de Gleason por encima de 7, que presentan menor porcentaje en el haplogrupo J.

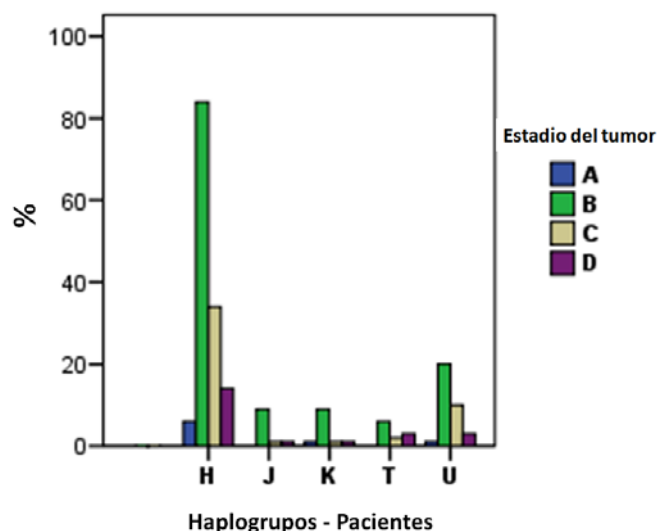


Figura 11: Representación del porcentaje de pacientes en cada haplogrupo mitocondrial versus al estadio del tumor.

### 3.3. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DE LA REGIÓN CONTROL

Al secuenciar la zona comprendida entre las bases 16024-16365 de la región control, se han encontrado 21 polimorfismos homoplásmicos y 1 heteroplásmico (16169Y) al compararse con la secuencia de referencia (Cambridge reference sequence). Dieciocho de ellos, se detectaron con una frecuencia mayor o igual al 4%. Tras realizar un análisis estadístico más detallado los mismos, las mutaciones 16356C ( $p=0.029$ ) y 16278T ( $p=0.051$ ) poseían una frecuencia estadísticamente más significativa en pacientes respecto a controles. De hecho, estas mutaciones, han sido previamente relacionadas con otras patologías como glioblastoma [68] y cáncer de mama [69] (T16365C); y neurofibromatosis tipo 1 [70] y cáncer de mama [69] (C16278T). Al comparar los polimorfismos en esta región con las características clínicas, la variante G16129A se encontró en un 8.79% de los pacientes con una escala de Gleason 2-6, 0.42% en escala de Gleason 7, y un 0.42% en el rango de 8-10 ( $p=0.007$ ). La mutación T16224C se localizaba en un 3.76% de pacientes en



escala de Gleason 2-6, un 2.09% en una escala de Gleason 7, y un 0.41% en una escala de Gleason 8-10 ( $p=0.022$ ). El polimorfismo T16311C alcanza valores estadísticamente significativos en estadio: 1.67% de los pacientes en estadio A, 9.21% en B, 1.67% en C, y 1.67% en D ( $p=0.046$ ). Esta variante, se ha asociado también con cáncer colorectal [71].

Ciertos SNPs de la región control se han asociado previamente con otros tumores como páncreas, mama o melanoma [68,72,73].

## 4. CONCLUSIONES

Con este estudio, se ha puesto de manifiesto que las mitocondrias están implicadas no sólo en procesos biológicos de gran importancia como en la respiración celular, sino que también lo están en procesos patológicos como son desarrollo de cáncer y otras enfermedades exclusivas de las mitocondrias. Principalmente eventos como la generación de ATP y regulación de la apoptosis son los que parecen derivar la acción mitocondrial hacia situaciones patológicas como las descritas anteriormente. El enfoque de este estudio no ha sido analizar las rutas bioquímicas que interactúan entre la apoptosis y los procesos oncológicos, sino en analizar una secuencia determinada del genoma mitocondrial (regiones hipervariables, HV1 y HV2), tratando de encontrar diferencias significativas entre controles y pacientes; incluso dentro de los pacientes pudiendo destacar algunas diferencias que caractericen la agresividad de la patología.

Así, mediante los haplogrupos mitocondriales, obtenemos información geográfica pues, cada haplogrupo es característico de una región lo que representa una información muy valorada ya que este cáncer es altamente variable en función de la región geográfica. En nuestro caso, los haplogrupos prevalentes en pacientes son U y H, lo que es normal tratándose de una población europea.

El otro objetivo para el estudio de los haplogrupos es el poder encontrar un tipo de asociación de riesgo de la enfermedad al igual que se había hecho en otras poblaciones como la norte americana de raza blanca [52], en la que se observó una presencia elevada de haplogrupo U en pacientes de carcinoma prostático. Sin embargo, en nuestro estudio no se confirma una asociación entre ningún haplogrupo mitocondrial y el riesgo a padecer cáncer de próstata esporádico. Aunque no hemos podido describir esta asociación, si hemos obtenido polimorfismos de la región D-loop como T16356C y C16278T con una frecuencia más elevada en pacientes que en controles, y por tanto pueden señalarse como posibles predictores de riesgo para este cáncer. Además, pudimos destacar que algunos haplogrupos como L (1, 2 & 3), M (1&5), C4a1,

H (11a, 1b & 2), I5a, J2a1a, T2b, U (2d, 2e, 5a & 6a), W1e y X2d; sólo los hemos encontrado en pacientes y no en controles.

Por tanto, mediante el análisis de estas muestras en nuestra región andaluza hemos encontrado determinadas mutaciones que parecen exclusivas de pacientes y además conseguimos añadir un componente genético mediante la asignación de haplogrupos mitocondriales que nos aporta una información geográfica que como ya hemos indicado anteriormente nos parece de extremada utilidad en el caso del cáncer de próstata.

## 5. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J.W. Ballard, M.C. Whitlock, The incomplete natural history of mitochondria. *Mol Ecol.* 13 (2004) 729-744.
- [2] J.W. Taanman, The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta.* 1410 (1999) 103-123.
- [3] D.C. Wallace, M.D. Brown, M.T. Lott, Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease, *Gene.* 238 (1999) 211-230.
- [4] J.S. Penta, F.M. Johnson, J.T. Wachsman, W.C. Copeland, Mitochondrial DNA in human malignancy. *Mutat Res.* 488 (2001) 119-133.
- [5] M. Brandon, P. Baldi, D.C. Wallace, Mitochondrial mutations in cancer. , *Oncogene.* 25(34) (2006) 4647-4662.
- [6] A. Carracedo, A. Salas, El genoma mitocondrial en la tumorigénesis de los gliomas. *Gliomas del encéfalo*, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, 2007, pp. 49-68.
- [7] M. Crespillo, M. Paredes, J. Arimany, L. Guerrero, J.L. Valverde. Guerra Civil Española (1936-1939): identificación de restos humanos procedentes de fosas comunes en Cataluña mediante análisis de ADN Mitocondrial. A propósito de un caso. *Spanish Civil War (1936-1939): identification of human remains from mass graves in Catalonia using mitochondrial DNA analysis. A case report.*, Cuadernos de Medicina Forense N° 38, ISSN 1135-7606, Sevilla, 2005, pp. 37-46.
- [8] M. Lynn, Genetic and evolutionary consequences of symbiosis, *Exp.Parasitol.* 39 (1976) 277-349.
- [9] D. Sagan, *Slanted Truths: Essays on Gaia, Symbiosis and Evolution.* Copernicus Books, 1997.
- [10] R.E. Giles, H. Blanc, R.M. Cann, D.C. Wallace, Maternal inheritance of human mitochondrial DNA, *Natl Acad Sci.USA.* 83 (1980) 9611-9615.
- [11] W.M. Brown, M. George Jr., A.C. Wilson, Rapid evolution of animal mitochondrial DNA, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 76 (1979) 1967-1971.

- [12] K.E. Bendall, V.A. Macaulay, J.R. Baker, B.C. Sykes, Heteroplasmic point mutations in the human mtDNA control region, *Am.J.Hum.Genet.* 59 (1996) 1276-1287.
- [13] S. Anderson, A.T. Bankier, B.G. Barrell, Sequence and organization of the human mitochondrial genome, *Nature.* 290 (1981) 457-465.
- [14] S. Lutz, H.-. Weisser, J. Heizmann, S. Pollak, Mitochondrial heteroplasmy among maternally related individuals, *Int.J.Legal Med.* 113 (2000) 155-161.
- [15] O. Handt, S. Meyer, A. Von Haeseler, Compilation of human mtDNA control region sequences, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 126-129.
- [16] T.J. Parsons, D.S. Muniec, K. Sullivan, N. Woodyatt, R. Alliston-Greiner, M.R. Wilson, et al., A high observed substitutional rate in the human mitochondrial DNA control region, *Nat.Genet.* 15 (1997) 362-367.
- [17] D.C. Wallace, A. Torroni, American Indian prehistory as written in the mitochondrial DNA: a review. *Human Biology.* 64 (1992) 403-416.
- [18] D.C. Wallace, Mitochondrial genetics: A paradigm for aging and degenerative diseases? *Science.* 256 (1992) 628-632.
- [19] A. Torroni, D.C. Wallace, Mitochondrial DNA variation in human populations and implications for detection of mitochondrial DNA mutations of pathological significance. *J Bioenerg Biomembr.* 26 (1994) 261-271.
- [20] D.M. Behar, R. Villemis, H. Soodyall, J. Blue-Smith, L. Pereira, E. Metspalu, et al., The Dawn of Human Matrilineal Diversity, *Am.J.Hum.Genet.* 82 (2008) 1130-1140.
- [21] D. Mishmar, E. Ruiz-Pesini, P. Golik, V. Macaulay, A.G. Clark, S. Hosseini, et al., Natural selection shaped regional mtDNA variation in humans, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 100 (2003) 171-176.
- [22] V. Macaulay, C. Hill, A. Achilli, C. Rengo, D. Clarke, W. Meehan, et al., Single, rapid coastal settlement of Asia revealed by analysis of complete mitochondrial genomes, *Science.* 308 (2005) 1034-1036.
- [23] A. Torroni, T.G. Schurr, C.-. Yang, E.J.E. Szathmary, R.C. Williams, M.S. Schanfield, et al., Native American mitochondrial DNA analysis indicates that the Amerind and the Nadene populations were founded by two independent migrations, *Genetics.* 130 (1992) 153-162.

- [24] M.D. Brown, A. Torroni, C.L. Reckord, D.C. Wallace, Phylogenetic analysis of Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA's indicates multiple independent occurrences of the common mutations. *Hum Mutat.* 6 (1995) 311-325.
- [25] M.D. Brown, F. Sun, D.C. Wallace, Clustering of Caucasian Leber hereditary optic neuropathy patients containing the 11778 or 14484 mutations on an mtDNA lineage. *Am J Hum Genet.* 60 (1997) 381-387.
- [26] B. Kofler, E.E. Mueller, W. Eder, O. Stanger, R. Maier, a. et, Mitochondrial DNA haplogroup T is associated with coronary artery disease and diabetic retinopathy: a case control study. *BMC Med Genet.* 10: 35. (2009).
- [27] J.A. Canter, A.R. Kallianpur, F.F. Parl, R.C. Millikan, Mitochondrial DNA G10398A polymorphism and invasive breast cancer in African-American women, *Cancer Res.* 65 (2005) 8028-8033.
- [28] K. Darvishi, S. Sharma, A.K. Bhat, E. Rai, R.N. Bamezai, Mitochondrial DNA G10398A polymorphism imparts maternal Haplogroup N a risk for breast and esophageal cancer. *Cancer Lett.* 249 (2007) 249-255.
- [29] M.L. Sampietro, D. Caramelli, O. Lao, F. Calafell, D. Comas, M. Lari, et al., The genetics of the pre-Roman Iberian Peninsula: A mtDNA study of ancient Iberians, *Ann.Hum.Genet.* 69 (2005) 535-548.
- [30] Web Eupedia, Origins, age, spread and ethnic association of European haplogroups and subclades. 2011 (2010).
- [31] J. Puñal-Eiris, M. Castro-Gago, Tema 15.Enfermedades mitocondriales., *Enfermedades mitocondriales.* pp. 146-153.
- [32] M.T. Muñoz, J.A. Solís-Herruzo, Pseudo-obstrucción intestinal crónica. *Revista Española de Enfermedades Digestivas.* 99(2) (2007).
- [33] A. Renehan, C. Booth, C. Potten, Education and Debate. What is apoptosis and why is it important? , *BMJ.* 322 (2001) 1536-1538.
- [34] J.D. Zamora S., I.C. Otárola A., G.O. Brenes, La apoptosis y su relación con diversos nutrientes. *Rev Chil Nutr.* 32 (3) (2005).
- [35] M. Podhorska-Okolow, M. Sandri, S. Zampieri, B. Brun, K. Rossini, U. Carraro, Apoptosis of myofibres and satellite cells: exercise-induced damage in skeletal muscle of the mouse. *Neuropath Appl Neurobiol.* 24 (1998) 518-531.

- [36] R. Lockshin, Z. Zakeri, Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Natur Rev Mol Cell Biol.* 2 (2001) 545-550.
- [37] Z. Song, H. Steller, Death by design: mechanism and control of apoptosis. *Millenium issue.* 24 (12) (1999) 49-52.
- [38] K. Wagner, I. Elmadfa, Biological relevance of terpenoids. *Ann Nutr Metab.* 47 (2003) 95-106.
- [39] D. Haber, Roads Leading to breast cancer. *New Engl J Med.* 343 (21) (2000) 1566-1568.
- [40] L.M. Booker, G.M. Habermacher, B.C. Jessie, Q.C. Sun, A.K. Baumann, M. Amin, et al., North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer, *J.Urol.* 175 (2006) 468-472.
- [41] A. Di Rienzo, A.C. Wilson, Branching pattern in the evolutionary tree for human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 88(5) (1991) 1597-1601.
- [42] M. Stoneking, D. Hedgecock, R.G. Higuchi, L. Vigilant, H.A. Erlich, Population variation of human mtDNA control region sequences detected by enzymatic amplification and sequence-specific oligonucleotide probes. *American Journal of Human Genetics.* 48(2) (1991) 370-382.
- [43] L.J. Martinez-Gonzalez, *Estructura Genética de la población de Guatemala. Aplicaciones en el campo antropológico y forense,* (2011) 1-280.
- [44] *Identificación genética de los restos de Cristóbal Colón.,.*
- [45] L. Vigilant, R. Pennington, H. Harpending, T.D. Kocher, A.C. Wilson, Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 86(23) (1989) 9350-9354.
- [46] E. Hagelberg, J.B. Clegg, Isolation and characterization of DNA from archaeological bone. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 244(1309) (1991) 45-50.
- [47] S. Paabo, Ancient DNA: Extraction, characterization, molecular cloning, and enzymatic amplification, *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86 (1989) 1939-1943.

- [48] S. Paabo, D.M. Irwin, A.C. Wilson, DNA damage promotes jumping between templates during enzymatic amplification, *J.Biol.Chem.* 265 (1990) 4718-4721.
- [49] S. Pääbo, Amplifying DNA from archeological remains: A meeting report, *Genome Res.* 1 (1991) 107-110.
- [50] P.L. Ivanov, M.J. Wadhams, R.K. Roby, M.M. Holland, V.W. Weedn, T.J. Parsons, Mitochondrial DNA sequence heteroplasmy in the Grand Duke of Russia Georgij Romanov establishes the authenticity of the remains of Tsar Nicholas II, *Nat.Genet.* 12 (1996) 417-420.
- [51] M. Hoss, S. Paabo, N.K. Vereshchagin, Mammoth DNA sequences. *Nature.* 370(6488) (1994) 333-333.
- [52] L.M. Booker, G.M. Habermacher, B.C. Jessie, Q.C. Sun, A.K. Baumann, M. Amin, et al., North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer, *J.Urol.* 175 (2006) 468-473.
- [53] W. Kim, T.K. Yoo, D.J. Shin, H.W. Rho, H.J. Jin, E.T. Kim, et al., Mitochondrial DNA Haplogroup Analysis Reveals no Association between the Common Genetic Lineages and Prostate Cancer in the Korean Population, *PLoS ONE.* 3(5) (2008) e2211-e2211.
- [54] E.E. Mueller, E. Eder, J.A. Mayr, B. Paulweber, W. Sperl, W. Horninger, et al., Mitochondrial Haplogroups and Control Region Polymorphisms Are Not Associated with Prostate Cancer in Middle European Caucasians, *PLoS ONE.* 4(7) (2009) e6370.-e6370.
- [55] N. Howell, J.L. Elson, C. Howell, D.M. Turnbull, Relative rates of evolution in the coding and control regions of African mtDNAs. *Mol Biol Evol.* 24(10) (2007) 2213-2221.
- [56] M. Hasegawa, A. Di Rienzo, T.D. Kocher, A.C. Wilson, Toward a more accurate time scale for the human mitochondrial DNA tree, *J.Mol.Evol.* 37 (1993) 347-354.
- [57] S. Meyer, G. Weiss, A. Von Haeseler, Pattern of nucleotide substitution and rate heterogeneity in the hypervariable regions I and II of human mtDNA, *Genetics.* 152 (1999) 1103-1110.



- [58] N. Galtier, D. Enard, Y. Radondy, E. Bazin, K. Belkhir, Mutation hot spots in mammalian mitochondrial DNA, *Genome Res.* 16 (2006) 215-222.
- [59] M. Ingman, U. Gyllensten, Rate variation between mitochondrial domains and adaptive evolution in humans, *Hum.Mol.Genet.* 16 (2007) 2281-2287.
- [60] T. Kivisild, M. Metspalu, H.J. Bandelt, M. Richards, R. Villems, The world mtDNA phylogeny, in: Bandelt H.J., Macaulay V., Richards M. (Eds.), *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*, Springer, 2006, pp. 149-179.
- [61] H. Fang, L. Shen, T. Chen, J. He, Z. Ding, J. Qu, et al., Cancer type-specific modulation of mitochondrial haplogroups in breast,colorectal and thyroid cancer. *BMC Cancer.* 10 (2010) 421-431.
- [62] T. Hulgan, R. Haubrich, S.A. Riddler, P. Tebas, M.D. Ritchie, G.A. McComsey, et al., European mitochondrial DNA haplogroups and metabolic changes during antiretroviral therapy in AIDS Clinical Trials Group Study A5142. *AIDS.* 25 (2011) 37-47.
- [63] Harvard-MIT Data Center, Tutorial de SPSS, 2011.
- [64] IBM SPSS Statistics., SPSS predictive analytics software and solutions., 2011.
- [65] L. Excoffier, H.E.L. Lischer, Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources.* Arlequin suite ver 3.5. 10 (2010) 564-567.
- [66] J.C. Alvarez, D.L.E. Johnson, J.A. Lorente, E. Martinez-espin, L.J. Martinez-Gonzalez, M. Allard, et al., Characterization of human control region sequences for Spanish individuals in a forensic mtDNA data set, *Leg.Med.* 9 (2007) 293-304.
- [67] *La genética y su aplicación en el estudio de las poblaciones humanas.*, 2011 (2011).
- [68] E. Kirches, G. Krause, M. Warich-Kirches, S. Weis, T. Schneider, B. Meyer-Puttlitz, et al., High frequency of mitochondrial DNA mutations in glioblastoma multiforme identified by direct sequence comparison to blood samples, *International Journal of Cancer.* 93 (2001) 534-538.

- [69] D. Tan, R. Bai, L. C. Wong, Comprehensive scanning of somatic mitochondrial DNA mutations in breast cancer, *Cancer Res.* 62 (2002) 972-976.
- [70] A. Kurtz, M. Lueth, L. Kluwe, T. Zhang, R. Foster, V.-. Mautner, et al., Somatic mitochondrial DNA mutations in neurofibromatosis type 1-associated tumors, *Molecular Cancer Research.* 2 (2004) 433-441.
- [71] M. Akouchekian, M. Houshmand, S. Hemati, M. Ansaripour, M. Shafa, High rate of mutation in mitochondrial DNA displacement loop region in human colorectal cancer, *Diseases of the Colon & Rectum.* 52 (2009) 526.
- [72] R. Bai, S.M. Leal, D. Covarrubias, A. Liu, L. C. Wong, Mitochondrial genetic background modifies breast cancer risk, *Cancer Res.* 67 (2007) 4687-4694.
- [73] L. Wang, W.R. Bamlet, M. De Andrade, L.A. Boardman, J.M. Cunningham, S.N. Thibodeau, et al., Mitochondrial genetic polymorphisms and pancreatic cancer risk, *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention.* 16 (2007) 1455-1459.
- [74] <http://www.fao.org/docrep/004/y2775s/y2775s0a.htm>, 2011.
- [75] R.L. Nussbaum, R. R. McInnes, H. F. Wilard., *Genetics in medicine.* 7th.Saunders ed., Thompson & Thompson.
- [76] M.D. Kumar, V. FRCPATH, A.K. Abbas, N. Fausto, J. Aster, «Cancer». *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* 8th ed., Saunders (Elsevier).
- [77] Hospital materno infantil.Universidad de Barcelona., *Guía metabólica. Enfermedades mitocondriales.* 2011.

## ANEXO

- **TERMINOLOGÍA ESPECÍFICA DE ESTE CAPÍTULO**

*Heteroplasmia.* Término que indica la presencia de más de un tipo de ADNmt en un mismo individuo. Podemos diferenciar, la *heteroplasmia de longitud*, en la que las moléculas de ADNmt difieren en longitud de la secuencia unas respecto a otras. *Heteroplasmia de secuencia (o sitio)*; aparecen moléculas de ADNmt con distintos nucleótidos en la misma dirección.

*Homoplasmia.* Término opuesto a heteroplasmia. Nos indica la condición en la que todas las copias de un orgánulo de una célula son genéticamente idénticas [74].

*Penetrancia.* Mediante el término penetrancia genética, se indica en una población, la proporción de individuos que expresan el fenotipo patológico, entre todos los que presentan un genotipo portador del alelo mutado. Para un individuo, la penetrancia es la frecuencia con la que se expresa la enfermedad. Puede ser reducida o incompleta si la proporción de fenotipos patológicos es inferior al 100% [75,76].

*Regiones hipervariables (HV1, HV2).* La región del ADN caracterizada por una alta variabilidad entre individuos se denomina región control o D-loop; gracias a esta característica se usa con fines de identificación genética muy útil en las ciencias forenses. Dentro de la región control, se encuentran las regiones HV1 (hipervariable 1) que comprende desde las bases 16024 a 16365, y la región HV2 (hipervariable 2) que comprende entre las bases 73 y 340. La región control, no codifica para proteínas, ni ARNt, ni ARNr, pero es importante por la gran variedad entre individuos y por poseer los promotores de las hebras pesada y ligera, sitios de unión para factores de transcripción mitocondrial y el origen de replicación de la hebra pesada (H).

*Segregación mitótica.* Se le conoce al proceso producido en cada división celular (mitosis), donde las moléculas de ADNmt se reparten (*segregan*) al azar entre las células hijas, pudiendo dar lugar a tres situaciones posibles: *homoplasmia normal*, *homoplasmia mutada* y *heteroplasmia* [77].

## **CAPÍTULO 4**

### **Resumen Global**

Aunque el componente hereditario en el riesgo de desarrollar el cáncer de próstata parece obvio; la dificultad para identificar genes que generen una predisposición sigue siendo el principal hándicap por las características específicas de este cáncer. Además, al ser diagnosticado en edades avanzadas dificulta la obtención de muestras de ADN de varios familiares afectados vivos (de distintas generaciones). La presencia de fenocopias de alto riesgo hace muy complejo el diferenciar entre cáncer hereditario y esporádico y establecer una relación causal clara, además de una alta complejidad y heterogeneidad genética [1].

A lo largo de este estudio, se ha comprobado que las variantes del gen RNASEL (D541E, R462Q y I97L) parecen ser relevantes en la cohorte de estudio. Sin embargo, no parecen serlo en otros estudios realizados con individuos de otras poblaciones europeas, americanas y asiáticas, entre otras [2]. En cambio, mediante este estudio preliminar de factores clínicos y genéticos, se ha podido observar que ambos factores pueden servir como información relevante sobre el control de este cáncer, así como determinar grupos poblacionales de mayor o menor riesgo. Por otro lado, se ha demostrado que en cada población, los datos genéticos tienen un valor pronóstico diferente.

El efecto de la diferencia genética poblacional se ha comprobado tanto en el gen RNASEL, como en los genes MSR1 y ELAC2. Las distintas variantes descritas no aparecen de la misma forma en pacientes de distintas regiones geográficas. A su vez, se ha comprobado que mismos genotipos para el gen RNASEL no dirigen a una misma evolución del cáncer en las diferentes poblaciones analizadas. Así, la información genética puede usarse como una herramienta importante para mejorar la evolución clínica de pacientes afectados por este cáncer. Sin embargo, debido a que hay muchas diferencias genéticas

dependiendo de la población de estudio, no se puede olvidar nunca el componente poblacional al realizar el análisis genético.

Además, el saber que pacientes con un genotipo específico desarrollarán peores características de este cáncer puede ayudar a enfocar un tratamiento clínico diferente con el que se evite una progresión rápida del cáncer y mejorar la calidad de vida del paciente. De esta forma, si se conoce que individuos con genotipos A/G, A/A y G/G en las variantes I97L, R462Q y D541E (gen RNASEL); G/A, T/T, G/G y G/G en los SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 y rs4792311 (gen ELAC2); y los genotipos C/C, G/G, A/A, G/G y G/G en los SNPs rs12718376, rs918, rs1904577, rs2127565 y rs3747531 (gen MSR1), respectivamente presentan peores características clínicas y una evolución del tumor más rápida. Se puede realizar un seguimiento más controlado y menos espaciado en el tiempo que a los individuos cuyos genotipos les confieren unas mejores características y una evolución del tumor menos agresiva. De igual manera, por similitudes entre el cáncer de próstata esporádico y familiar podríamos extrapolar todos los resultados obtenidos en cáncer de próstata esporádico al cáncer prostático familiar. Tal vez, como medida preventiva en el cáncer de próstata familiar, se podría ofertar a los individuos con los genotipos que se esbozan como más agresivos la posibilidad de realizar un seguimiento más exhaustivo a sus familiares ya que muchos de ellos se presentan en una edad algo más precoz que lo estipulado como lo normal para esta patología.

Diversos estudios han demostrado que las mitocondrias están implicadas no sólo en procesos biológicos de gran importancia como en la respiración celular, sino también en procesos patológicos como son desarrollo de cánceres y otras enfermedades exclusivas de las mitocondrias. Eventos como la generación de ATP y regulación de la apoptosis son los que parecen derivar la acción mitocondrial hacia situaciones patológicas. El presente estudio no pretende analizar las rutas bioquímicas que interactúan entre la apoptosis y los procesos oncológicos sino que analiza una secuencia determinada del genoma mitocondrial (regiones hipervariables, HV1 y HV2). A través del estudio de la secuencia se han querido encontrar diferencias significativas entre controles y

pacientes, e incluso entre pacientes y determinar polimorfismos que caractericen la agresividad de la patología.

Tras el análisis de las regiones hipervariables, se han determinado los haplogrupos mitocondriales para obtener *información geográfica*. Cada haplogrupo es característico de una región geográfica; información muy importante ya que este cáncer es altamente variable en función de cada región. Los haplogrupos prevalentes en pacientes son U y H, haplogrupos predominantes en la población europea.

Además, con el estudio de haplogrupos se ha querido establecer una *asociación de riesgo de la enfermedad* como se ha hecho en otras poblaciones. Estudios en la población de Norte Americana de raza blanca [3] observan una presencia elevada de haplogrupo U en pacientes de carcinoma prostático. En cambio, en este análisis no se ha podido establecer asociación entre ningún haplogrupo mitocondrial y el riesgo a padecer cáncer de próstata esporádico. El tamaño de los grupos poblacionales controles y pacientes puede haber afectado a los resultados obtenidos, quizás un aumento en el número de individuos mostraría diferencias estadísticas significativas. Por otro lado, estudios similares en poblaciones coreanas [4] y en poblaciones de europeos de centro Europa [5] no han encontrado diferencias entre pacientes y controles. Se describió la presencia de haplogrupo U al igual que se ha encontrado en la cohorte de estudio, pero no se pudieron describir diferencias significativas entre controles y pacientes.

Aunque no hemos podido describir esta asociación, si hemos encontrado que dieciocho de los 125 polimorfismos de la región control, en los individuos portadores del cáncer se presentan con un porcentaje (frecuencia  $\geq 4\%$ ) más elevado al compararse con los controles, de ellos sólo T16356C y C16278T poseen diferencias estadísticamente significativas ( $p$ -valor  $< 0.05$ ). Además, pudimos destacar que algunos haplogrupos como L (1, 2 & 3), M (1&5), C4a1, H (11a, 1b & 2), I5a, J2a1a, T2b, U (2d, 2e, 5a & 6a), W1e y X2d; sólo los hemos encontrado en pacientes y no en controles.

Por tanto, mediante el análisis de estas muestras en nuestra región andaluza hemos encontrado determinadas mutaciones tanto en el ADNmt como

en las regiones génicas RNASEL, ELAC2 y MSR1, que parecen exclusivas de pacientes pero además mediante la asignación de haplogrupos mitocondriales, conseguimos añadir un componente genético que nos aporta una información geográfica lo que nos parece de extremada utilidad en el caso del cáncer de próstata.

En general, con este estudio se ha comprobado no sólo lo complicado de este cáncer concreto por el desconocimiento de su etiología, sino también por los numerosos factores que parecen intervenir en el mismo. Así, destacamos como principales factores de riesgo, la existencia de familiares y el número de familiares afectados por cáncer, pero también es importante el papel del componente genético. Si a todo ello, sumamos variantes ambientales y raciales hace necesario un estudio detallado de esta patología en cada sociedad.



## BIBLIOGRAFÍA

- [1] E.A. Ostrander, J.L. Stanford, Genetic of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet.* 67 (2000) 1367-1375.
- [2] F. Wiklund, B.-. Jonsson, A.J. Brookes, L. Strömqvist, J. Adolfsson, M. Emanuelsson, et al., Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer, *Clinical Cancer Research.* 10 (2004) 7150-7156.
- [3] L.M. Booker, G.M. Habermacher, B.C. Jessie, Q.C. Sun, A.K. Baumann, M. Amin, et al., North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer, *J.Urol.* 175 (2006) 468-473.
- [4] W. Kim, T.K. Yoo, D.J. Shin, H.W. Rho, H.J. Jin, E.T. Kim, et al., Mitochondrial DNA Haplogroup Analysis Reveals no Association between the Common Genetic Lineages and Prostate Cancer in the Korean Population, *PLoS ONE.* 3(5) (2008) e2211-e2211.
- [5] E.E. Mueller, E. Eder, J.A. Mayr, B. Paulweber, W. Sperl, W. Horninger, et al., Mitochondrial Haplogroups and Control Region Polymorphisms Are Not Associated with Prostate Cancer in Middle European Caucasians, *PLoS ONE.* 4(7) (2009) e6370.-e6370.

Although the genetic influence in the risk of developing of prostate cancer seems to be obvious, nowadays it is still patent the difficulty to identify those genes with a clear predisposition to prostate cancer. In addition, diagnosis in advanced ages, make it difficult to obtain DNA of living family members affected by this cancer (and more difficult if we want samples from different generations) [1].

Throughout this research, we have demonstrated that some of the variants in RNASEL gene (D541E, R462Q and I97L) seem to be relevant in the group analyzed. However, this does not appear to be the case in other studies carried out on different populations such as Europeans, Americans and Asians, among others [2]. However, thanks to this preliminary study of clinical and genetic factors we observed that both factors could be used as relevant information for monitoring this cancer and allowing us to establish those population groups with a higher or lower risk. Moreover, in each population, genetic data has a different prognosis value.

The population difference is demonstrated in RNASEL, MSR1 and ELAC 2 genes, because the variants are not equally distributed among patients in different geographical areas. So genetic data could be used as an important tool for improving the clinical evolution in prostate cancer patients, but due to the differences among populations, we still must not forget the geographical component when carrying out genetic analysis.

Furthermore, knowing that patients with a specific genotype will develop worse characteristics of this cancer, this information could be used for giving different clinical treatments which will try to avoid the quick progression of the cancer. With all this information, people with genotypes A/G, A/A and G/G in variants I97L, R462Q and D541E of RNASEL gene; G/A, T/T, G/G and G/G in SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 y rs4792311 (ELAC2 gene); and

genotypes C/C, G/G, A/A, G/G and G/G in SNPs rs12718376, rs918, rs1904577, rs2127565 and rs3747531 (gene MSR1), respectively have worse clinical characteristics and this could guide the doctor in doing a more controlled follow up of the patients.

There are similarities between sporadic and hereditary prostate cancer so genetic data in sporadic cancer can also be applied to hereditary prostate cancer. Genetic analysis could be used as a preventive measure in hereditary prostate cancer, by offering the opportunity those individuals with more aggressive genotypes the opportunity of a screening along with their family members.

Mitochondrial DNA has been always an important factor in the oncology process, being part of biological processes such as the production of ROS, but it also plays an important role in other mitochondrial diseases. The generation of ATP and the regulation of apoptosis, seem to be related to pathological processes in cancer and other diseases. However, in this study, the main focus has been to analyze the sequence of mitochondrial DNA in hypervariable regions 1 and 2 (HV1 and HV2). We tried to find significant differences between patients and controls and even find differences among patients to sketch a pathological score of aggressiveness.

After analyzing hypervariable regions, we have obtained information about haplogroups providing *geographical information* about each sample (each mitochondrial haplogroup is specific of a geographical area). The samples of this study are all clustered in Europe and for that reason, the prevalent haplogroups are U and H, the most common among Europeans. Another objective was trying to obtain any kind of *relation between the risk* in prostate cancer and having a specific haplogroup, similar to other analysis performed in populations of North America [3], where high levels of haplogroups U among patients with prostate cancer are described. However, in our analysis we could not establish a relation between haplogroups and the risk of prostate cancer, and similar results have been described in Koreans populations [4] and in central European populations [5].

Although there is no a clear association between haplogroups and the risk of prostate cancer, eighteen of the 125 CR polymorphisms were detected at a frequency  $\geq 4\%$  in either the sporadic prostate cancer or the control group. However, only two of them, 16356C and 16278T were found to have a significantly higher frequency in patients with sporadic prostate cancer compared to controls ( $p$ -value  $< 0.05$ ). Also some haplogroups have been found only in patients such as L (1, 2 & 3), M (1&5), C4a1, H (11a, 1b & 2), I5a, J2a1a, T2b, U (2d, 2e, 5a & 6a), W1e y X2d.

As a result, with the analysis of these samples in the region of Granada, Andalusia, we have found some mutations in DNAMt and in genetic regions of RNASEL, ELAC2 and MSR1, which seem to be exclusive to patients. In addition, with the genetic information of the mitochondrial haplogroups we could add that geographical information seems to play a very important role in prostate cancer.

## REFERENCES

- [1] E.A. Ostrander, J.L. Stanford, Genetic of prostate cancer: too many loci, too few genes. *Am J Hum Genet.* 67 (2000) 1367-1375.
- [2] F. Wiklund, B.-. Jonsson, A.J. Brookes, L. Strömqvist, J. Adolfsson, M. Emanuelsson, et al., Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer, *Clinical Cancer Research.* 10 (2004) 7150-7156.
- [3] L.M. Booker, G.M. Habermacher, B.C. Jessie, Q.C. Sun, A.K. Baumann, M. Amin, et al., North American white mitochondrial haplogroups in prostate and renal cancer, *J.Urol.* 175 (2006) 468-473.
- [4] W. Kim, T.K. Yoo, D.J. Shin, H.W. Rho, H.J. Jin, E.T. Kim, et al., Mitochondrial DNA Haplogroup Analysis Reveals no Association between the Common Genetic Lineages and Prostate Cancer in the Korean Population, *PLoS ONE.* 3(5) (2008) e2211-e2211.
- [5] E.E. Mueller, E. Eder, J.A. Mayr, B. Paulweber, W. Sperl, W. Horninger, et al., Mitochondrial Haplogroups and Control Region Polymorphisms Are Not Associated with Prostate Cancer in Middle European Caucasians, *PLoS ONE.* 4(7) (2009) e6370.-e6370.

**CONCLUSIONES / CONCLUSIONS**

## CONCLUSIONES

1. Las variantes del gen RNASEL I97L, R462Q y D541E, asociadas a los genotipos A/G, A/A y G/G respectivamente presentan peores características clínicas y una evolución del tumor más rápida.
2. En el gen MSR1 se observa asociación entre controles y pacientes para los SNPs rs1904577 y rs3747531. Los genotipos CC, GG, AA, GG y GG se asocian con características clínicas más agresivas (estadios C y D; Gleason mayores de 7 y valores de PSA por encima de 4.1 ng/mL) en los SNPs rs12718376, rs918, rs1904577, rs2127565 y rs3747531, respectivamente.
3. En el gen ELAC2 se han esbozado diferencias significativas claras entre controles y pacientes para los SNPs analizados (rs11545302, rs17552022, rs4792311 y rs5030739). Los genotipos GA, TT, GG y GG en los SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 y rs4792311 respectivamente, se asocian con los parámetros clínicos más agresivos.
4. En el genoma mitocondrial aunque se han descrito 125 polimorfismos. De todos los polimorfismos encontrados, sólo T16356C y C16278T poseen diferencias estadísticamente significativas. Además, algunos haplogrupos como L (1, 2 & 3), M (1&5), C4a1, H (11a, 1b & 2), I5a, J2a1a, T2b, U (2d, 2e, 5a & 6a), W1e y X2d; sólo se han encontrado en pacientes y no en controles.
5. Con la asignación de los haplogrupos mitocondriales se puede aportar siempre una información geográfica a las muestras analizadas, ya que los haplogrupos mitocondriales son exclusivos de regiones geográficas concretas.
6. El perfil genético de cada individuo en el cáncer de próstata puede usarse como un *factor pronóstico* para tomar una decisión en relación a dar unos tratamientos menos espaciados en el tiempo y más efectivos dependiendo del genotipo del paciente. Aplicando tratamientos más personalizados según cada población y a cada genotipo.

*“Se ha comprobado no sólo lo complicado de este cáncer por el desconocimiento de su etiología, sino también por los numerosos factores que parecen intervenir en el desarrollo del mismo. Así, se han destacado siempre como principales factores de riesgo, la existencia de familiares y el número de familiares afectados por cáncer, pero también es importante el papel del componente genético. Si a todo ello, sumamos variantes ambientales y raciales hace necesario un estudio detallado de esta patología en cada sociedad.”*



## CONCLUSIONS

1. RNASEL variants I97L, R462Q and D541E, with A/G, A/A and G/G genotypes respectively are related to worst clinical characteristics and a faster evolution of the tumour.
2. In MSR1 gene there are significant differences between patients and controls in the SNPs rs1904577 and rs3747531. Genotypes CC, GG, AA, GG and GG, are related to more aggressiveness of the cancer measured by the presence of worst characteristics in clinical parameters such as (C and D stages, Gleason score above 7 and PSA values higher than 4.1 ng/mL) in SNPs rs12718376, rs918, rs1904577, rs2127565 and rs3747531 respectively.
3. ELAC2 gene there is significant differences between patients and controls in all of the SNPs (rs11545302, rs17552022, rs4792311 and rs5030739). GA, TT, GG and GG genotypes in SNPs rs11545302, rs17552022, rs5030739 and rs4792311 are linked to more aggressive clinical features respectively.
4. In Mitochondrial DNA we have described 125 polymorphisms. Among all of this polymorphisms only T16356C and C16278T presented statistical significant differences .And haplogroups like L (1, 2 & 3), M (1&5), C4a1, H (11a, 1b & 2), I5a, J2a1a, T2b, U (2d, 2e, 5a & 6a), W1e y X2d; have been only found in patients.
5. By the analysis of mitochondrial haplogroups geographical information is also added to these samples, due to the specificity of mitochondrial haplogroups and geographical areas.
6. The genetic profile of each individual in prostate cancer could be used as a prognosis factor in relation to giving some specific treatments to each patient depending on its characteristics and genetic information. So it could be a first

step for a personalized medicine and treatment depending on each population and genotype.

*"To sum up, with this PhD, it is demonstrated that prostate cancer is not only complicated due to the unknown of its aetiology, but also for the high number of factors that can affect the development of the cancer. There are some main described risk factors, such as the presence of familial cases, but the genetic component is also important. However, if we add other variants such as environmental factors, and ethnics it makes patent the need of a deeper analysis of this cancer in each geographical region along the world."*

## **ARTÍCULOS PUBLICADOS**

*PREDICTIVE VALUE IN THE ANALYSIS OF RNASEL GENOTYPES IN RELATION TO PROSTATE CANCER.*

Alvarez-Cubero MJ, Entrala C, Fernandez-Rosado F, Martinez-Gonzalez LJ, Alvarez JC, Suarez A, Lorente JA, Cozar JM.

Prostate Cancer Prostatic Dis. 2011 Nov 15. doi: 10.1038/pcan.2011.56

*ESTUDIO GENÉTICO DEL RNASEL EN CÁNCER DE PRÓSTATA Y SU RELACIÓN CON EL ESTADIAJE CLÍNICO*

Alvarez-Cubero MJ, Saiz M, Martinez-Gonzalez LJ, Alvarez JC, Lorente JA, Cozar JM.

Actas Urológicas Españolas 2012

En revisión en revista Plos One: Original Article: *MITOCHONDRIAL HAPLOGROUPS AND POLYMORPHISMS REVEAL NO ASSOCIATION WITH SPORADIC PROSTATE CANCER IN A SOUTHERN EUROPEAN POPULATION.*

M.J. Alvarez-Cubero, M. Saiz, L J. Martinez-Gonzalez, J.C. Alvarez, J.M. Cozar, J.A.

Lorente

En revisión en revista The Cancer Journal: Review: *A REVIEW OF THE MAIN GENES IN PROSTATE CANCER.*

M.J. Alvarez-Cubero, L J. Martinez-Gonzalez, M. Saiz, J.C. Alvarez, J.M. Cozar, J.A.

Lorente

## ORIGINAL ARTICLE

# Predictive value in the analysis of RNASEL genotypes in relation to prostate cancer

MJ Alvarez-Cubero<sup>1</sup>, C Entrala<sup>2</sup>, F Fernandez-Rosado<sup>2</sup>, LJ Martinez-Gonzalez<sup>3</sup>, JC Alvarez<sup>1,3</sup>, A Suarez<sup>4</sup>, JA Lorente<sup>1,3</sup> and JM Cozar<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Genetic Identification, Legal Medicine and Toxicology Department, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, Spain; <sup>2</sup>LORGEN GP, R & D Division, PT, Ciencias de la Salud - BIC, Granada, Spain; <sup>3</sup>Pfizer Center, University of Granada, Junta of Andalusia of Genomics and Oncology Research, Biomedical Research Center, Av. del Conocimiento s/n, Granada, Spain and <sup>4</sup>Service of Urology, University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain

**BACKGROUND:** We would like to compare the different RNASEL genotypes with the stage of the cancer using parameters such as PSA levels, Gleason score and T-stage, and to develop a clinical protocol for the monitoring of the disease for trying a better evolution of the patient.

**METHODS:** A total of 231 patients with sporadic prostate cancer and 100 of controls were genotyped in RNASEL gene by sequencing the exons 1 and 3. A survey of clinical information was collected by a specialist following the Helsinki protocol. All patients and controls were interviewed by a researcher and signed their informed consent to participation in the study, which was approved by Ethics Committee of the hospital. The genetic information was processed and collected with an ABI PRISM Genetic Analyser 3130 using SeqScape software v.2.6. All the patients were analysed by comparing the genetic and clinical data.  $\chi^2$ -tests, Monte Carlo, Fisher tests and contingency tables were performed using SPSS v.15.0 and ARLEQUIN v.3.5 software on patient population.

**RESULTS:** Significant differences were found only between patients and controls in D541E, R461Q and I97L genotypes, the remainder of the variants did not seem relevant to our population in contrast to other populations, such as north-Caucasians, Afro Americans and Ashkenazi Jews. The genotypes associated with the worst prognoses are G/G in D541E, A/A in R462Q and A/G in I97L. The controls were included in our study to determine an approximation of the genotype in our population compared with the patients, but they did not account for the statistical process.

**CONCLUSIONS:** The genetic profile of patients with this cancer combined with other parameters could be used as a prognosis factor in deciding to give more radical and frequent treatments, depending on personal genotype.

*Prostate Cancer and Prostatic Diseases* advance online publication, 15 November 2011; doi:10.1038/pcan.2011.56

**Keywords:** genetic profile; RNASEL; South European population

## Introduction

An autosomal dominant cancer syndrome has been discovered that is associated with the development of renal carcinoma in patients with familial von Hippel-Lindau (VHL) disease. VHL has also been shown to be important in sporadic conventional renal cell carcinomas, with a large number of studies reporting potential loss of VHL function as a result of allele loss, mutation, and promoter methylation.<sup>1,2</sup> It has been determined that the presence of VHL gene mutations in tumour tissue

from patients with sporadic renal cell carcinoma, could act as a prognostic factor.<sup>3</sup> Similar to renal carcinoma, genes in prostate cancer that are relevant in familial disease are also important in sporadic disease.<sup>4,5</sup> A study in African Americans and Hispanic Caucasians has concluded that RNASEL genetic variants have a role in prostate cancer risk.<sup>6</sup> The main genetic variants described are missense mutations (R462Q and D541E), the stop mutation (E265X)<sup>7</sup> and other variants such as 471delAAAG,<sup>8</sup> G265X, M11<sup>9</sup> and I97L.<sup>10</sup> These studies describe results in Caucasian (from northern Europe), Jewish, African and American populations. However, information about population of southern Europe is lacking. A difficulty associated with prostate cancer is the existence of different promoting factors, including genetic, epigenetic and environmental influences, which may be responsible for ethnic variations in the post-induction progression of the disease.<sup>11</sup>

Correspondence: MJ Alvarez-Cubero, Laboratory of Genetic Identification, Legal Medicine and Toxicology Department, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, 18071 Spain.  
E-mail: mjesusac@ugr.es  
Received 12 July 2011; revised 27 September 2011; accepted 7 October 2011

2 Some patients with levels of PSA not typically predictive of poor prognosis, after treatment, experience progression of the disease.<sup>12</sup> The main purpose of this article is to provide genetic information to serve as a tool, allowing the urologist to monitor each patient individually, depending on his genetic classification regarding the RNASEL gene, to manage a specific population of southern Europe.

## Materials and methods

### Study population and sample analysis

This study was supported by the Urology Department of the University Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. Men enrolled in this study were analysed by a urologist, who also made notations about important parameters for prostate cancer, such as PSA, T-score, Gleason score, and information such as age and place of birth. This project included unrelated adult Caucasian males with recent diagnoses of prostate cancer, and clinical diagnosis of primary adenocarcinoma of the prostate was histopathologically confirmed after abnormal serum PSA findings and lower urinary tract symptoms ( $n = 231$ ). Healthy, unrelated Caucasian men ( $n = 100$ ) from the same geographic area with no history of prostate cancer were enrolled as controls (no PSA levels were detected and clinical evolution over some years was followed to avoid including affected men with prostate cancer as controls). Controls belonged to the same age group as patients; they all were men with health problems like renal lithiasis or andrological problems, so PSA analysis was performed to dismiss a possible prostate cancer. They all have normal PSA values with blood levels below  $4 \text{ mg ml}^{-1}$ , as well as a normal rectal touch. All these analysis confirmed that selected controls had no prostate cancer. Furthermore, men with family history of prostate cancer were dismissed.

In this study, controls were used in the first stage of a two-phase design (case-control study) to determine which of the seven variants in RNASEL gene (M1I, G59F, I97L, S113S, 471delAAAG, I220V, E262X, E265X, S406F, R462Q, Y530C and D541E) were associated with prostate cancer risk, and having genotype differences between patients and controls. (Further details are included in Table 2.) We have only selected the three variants (D541E, R462Q and I97L), where genetic differences between controls and patients were found. At this point, we conducted a case-case analysis to determine which of the variants associated with prostate cancer risk are also associated with a specific phenotype. This study was conducted from 2007 till the beginning of 2011, and informed consent was obtained from all the patients and controls. Peripheral blood samples were drawn from all participants into tubes containing K3-EDTA. All, patients and controls, were interviewed by a researcher and signed their informed consent to participation in the study, which was approved by Ethics Committee of the hospital. Patient characteristics are summarised in Table 1.

The analyses were performed by LORGEN.GP and the Laboratory of Genetic Identification of Granada. DNA from the samples was extracted from peripheral

**Table 1** Clinical characteristics of patients ( $n = 231$ )

Variables	Patients ( $n = 231$ )	%
<i>Age at study</i>		
<69	171	74.03
70–79	49	21.21
>80	11	4.76
<i>T stage</i>		
1	25	8.5
2	92	37.8
3	88	37.5
4	26	16.2
<i>N stage</i>		
N0	187	63.2
N1	44	36.8
<i>M stage</i>		
M0	170	76.3
M1	61	23.7
<i>Gleason score</i>		
2–6	107	46.2
7–8	98	45
9–10	26	8.8
<i>PSA levels, <math>\text{ng ml}^{-1}</math></i>		
<10	49	23.3
10–19.99	51	23
>20	110	46.5
>100	21	7

The range of age at study is clustered in three groups whereas later in the statistical analyses it is done in four ranges ( $\leq 55$ , 56–60, 61–65,  $> 65$ ) to have a deeper analyses of the population.

blood using an organic extraction procedure by phenol/chloroform/isoamyl alcohol and proteinase K. It was purified using Microcon100 (Millipore, Billerica, MA, USA). Quantification of extracted DNA was performed by 0.8% agarose gel. To cover all variations in the RNASEL gene (R462Q, D541E, E265X, 471delAAAG, G265X, M1I and I97L), amplification of exons 1 and 3 was carried out with specific primers designed for these regions (Table 1). The amplification was performed using the AmpliTaq GoldPCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), which includes all the chemical components, except the primers and template, necessary for PCR, using a GeneAmp System2400 thermal cycler. Sequencing reactions were made only in the samples in which an amplification band was observed in a 2% agarose gel. Sequencing was generated using ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kits (Foster City, CA, USA). The amplicons were analysed using the ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems) automated DNA sequencer. Each template was sequenced in both directions. The results of the analysis were edited using the ABI PRISM SeqScape v.2.6 software (Applied Biosystems).

### Statistical analysis

For each single nucleotide, R462Q, D541E and I97L, allele frequencies were compared with the  $\chi^2$ -test using the software package SPSS v.15.0 (Chicago, IL, USA). The Hardy-Weinberg equilibrium test and an analysis of the linkage of the loci of the RNASEL gene were performed with ARLEQUIN v.3.5 software<sup>13</sup> (Bern, Switzerland).

**Table 2** Studied mutations in locus HPC1 (1q24-q25) of the RNASEL gene

EXON1-R1 (1-377)	EXON1-R2 (449-848)	EXON1-R3 (1070-1459)	EXON 3 (1567-1772)
F: TGGTAGCAGGTGGCATTTC R: AAGCCATAAAAATCACACTCA	F: AATGTGAATTTGAGGCCGAAAG R: AGTTCAACAGCAAGCAGC	F: ATACCGCCCTATGATTGGCA R: GCAGATCCTGGTGGGTGATC	F: CTTCCCTCCCTAACAGCCT R: GCACCACTTACCCTTCC
M11 (3 G > A) 100% Patients G/G 100% Controls G/G	471 delAAAAG 100% Patients delAAAAG 100% Controls delAAAAG	S406F (1217C > T) 100% Patients C/C 100% Controls C/C	Y530C (A > G) 100% Patients A/A 100% Controls A/A
G59F (175 G > A) 100% Patients G/G 100% Controls G/G	I220V (661 A > G) 100% Patients A/A 100% Controls A/A	R462Q (1384 G > A) 15.62% Patients A/A 50.63% Patients G/A 33.75% Patients G/G 16.67% Controls A/A 56.94% Controls G/A 26.39% Controls G/G	D541E (1623 T > G) 32.91% Patients G/G 52.32% Patients T/G 14.77% Patients T/T 36.11% Controls G/G 47.22% Controls T/G 16.67% Controls T/T
197L (289 A > G) 0.85% Patients A/G 1.27% Patients A/C 96.17% Patients A/A	E262X (784 G > T) 100% Patients G/G 100% Controls G/G		
S113S (339 T > C) 100% Patients T/T 100% Controls T/T	E265X (793 G > T) 100% Patients G/G 100% Controls G/G		

Comparisons between each locus and clinical informations such as PSA, age, stage and Gleason score were obtained with contingency tables using the  $\chi^2$ -test, Monte Carlo and Fisher exact test. In order to gain deeper analyses of the population, age was clustered into four ranges ( $\leq 55$ , 56–60, 61–65,  $> 65$ ) for statistical analysis, however, some tables within this paper have a cluster of age into three groups for easier interpretation.

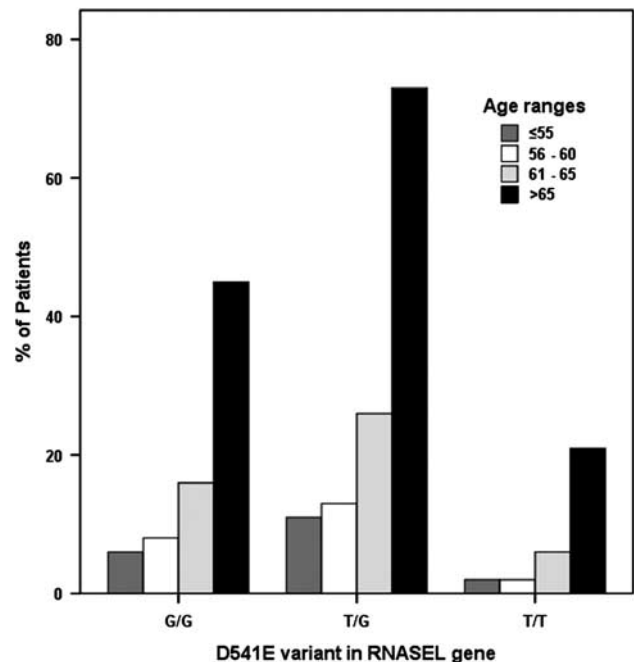
Analysis of variance was also performed with the data. All the data were represented using bar charts and other plots generated by SPSS v.15.0.

## Results

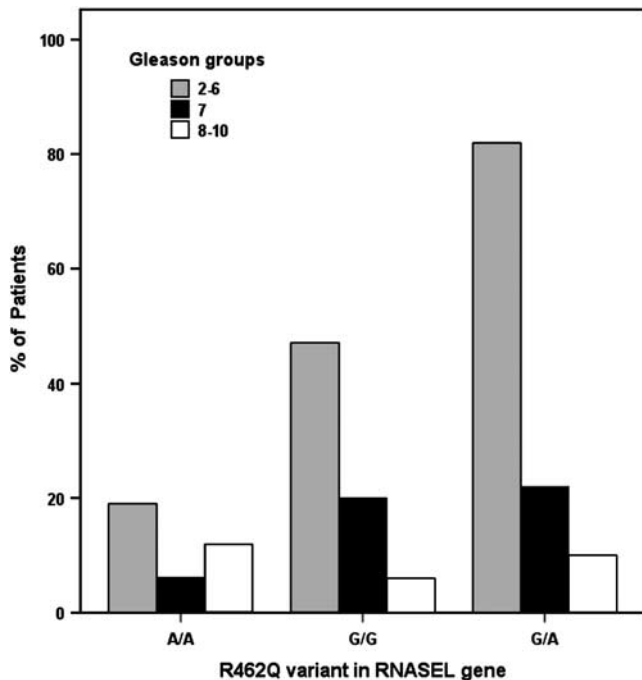
In the genetic analysis of all regions of the RNASEL gene performed in this study, genetic differences were not found between controls and patients in some mutations (100% of patients and controls have the same genotype), such as in variants M11, G59F, S113S, 471delAAAAG, I220V, E262X, S406F and Y530C, whereas significant differences were obtained in I97L, R462Q and D541E. Therefore, statistical analyses were reduced to the above three mutations.

There are some parameters for which *P*-value covers the rate  $\leq 0.05$ , which means the cut-point below where results would be considered statistically significant. These results imply that a significant association exists among variables such as D541E with the stage of the cancer (*P*-value  $< 0.0001$ ), PSA (*P*-value = 0.021) and Gleason score (*P*-value = 0.008); R462Q with age (*P*-value = 0.047), stage (*P*-value  $< 0.0001$ ), Gleason score (*P*-value = 0.001) and PSA (*P*-value = 0.015); and I97L with PSA (*P*-value = 0.002).

Further details for each single mutation and all the parameters analysed are represented in bar charts generated by SPSS v.15.0. (Figures 1 and 2).



**Figure 1** Bar chart representation of D541E variants. Representation of groups according to age generated by SPSS V.15.0.



**Figure 2** Bar chart representation of R462Q variants. Representation of the variants in R462Q according to the Gleason score.

As can be seen in Figure 1, although D541E and age are not statistically significant ( $P$ -value = 0.986), the variant T/G has a higher representation in patients >65 years old (59.3%), whereas T/T has the lowest proportion in this age range. In all, 21% of the patients were in the age range 70–79, in contrast to the control population, which had 12% in this age range. Analysis of the other clinical parameters indicates that T/T has better clinical parameters, such as the absence of individuals in stage 4, statistically significant with a  $P$ -value of <0.0001 and no presence of Gleason score in the range of 8–10, statistically significant with a  $P$ -value of 0.008 as well as no measurements in the highest ranges of PSA (>1000 ng ml<sup>-1</sup>),  $P$ -value = 0.021. In contrast, the variant G/G has the worst clinical prognosis. This variant includes the highest proportions of stages 3 and 4 (35.1% and 20.3%, respectively contrasting with a proportion of 16.4% and 7.4% in T/G; 9.7% and 0% in T/T variant in stages 3 and 4, respectively), as well as the highest prevalence of Gleason scores 7 and 8–10 (23 and 21.6% contrasting with proportions below 20% in the rest of the variants). Similar results are found in PSA levels, which reach the highest values in this variant, that is, >20 and >1000 ng ml<sup>-1</sup> with a proportion of 23.3 and 8.7%, in contrast to proportions below 15 and 3% in the other variants. Figure 1 shows that the lowest values of age occur in the variant G/G; thus, the cancer will have an earlier appearance and a worse prognosis in this case. To confirm the results, an analysis of variance was performed in age  $P$ -value: 0.898, stage of the cancer ( $P$ -value <0.0001), Gleason score ( $P$ -value = 0.012) and PSA ( $P$ -value <0.0001). As can be seen, similar results were obtained.

In R462Q, the means of lowest age as well as the worst values of the clinical data analysed are located in A/A variant. For example, with regard to cancer stage, higher

values for stages 3 and 4 occurred with this variant (around 80% of patients with A/A), and stages 1 and 2 were nearly non-existent (around 20% of patients with A/A). However, stage 2 was highly prevalent with the G/A variant (73%) and this genotype had a higher proportion in patients >65 years old (58%) and in those between 61–65 years-old (25%). Nevertheless, 88% of controls are in the age range of <69 years old and 12% in the range between 70–79 years old.

On analysing the groups of Gleason scores, the A/A variant had the highest proportion of Gleason scores in the range of 8–10 and the lowest proportion of 2–6. However, there were also Gleason scores of 7 and 8–10 with the G/A and G/G variants. According to PSA levels, the A/A variant also had the highest proportion of PSA levels in the range of >20 ng ml<sup>-1</sup> and >1000 ng ml<sup>-1</sup> (32.4% and 14.7% in contrast to 13% and 2.8%; 15.9% and 1.4% in variant G/A and in variant G/G, respectively).

In I97L, most variants were A/A; however, some patients had A/G and A/C variants. The A/G variant was initially related to worse clinical values, such as a Gleason score of 7, although there were no statistically significant differences ( $P$ -value = 0.064), and PSA levels were between 10.1–20 ng ml<sup>-1</sup>.

However, we would like to note that although PSA values >50 ng ml<sup>-1</sup> are predictive of metastatic disease, we have also added values above this range because we have found them in our patient population.

Other statistic analysis such as the Hardy–Weinberg equilibrium test and an analysis of the linkage of the loci in the RNASEL gene were performed using ARLEQUIN v.3.5 software.<sup>13</sup> All of the variants are in Hardy–Weinberg equilibrium, but we would also like to remark that although the genotype distributions are in Hardy–Weinberg equilibrium, they also have slight linkage, which is normal for all the variants located in the same gene. The three variants were evaluated for linkage-disequilibrium (an example,  $r^2$  in the D541E variant is 0.3667). However, every single variant is located in the same gene (RNASEL), so there is linkage heredity.

After analysing all the samples by the  $\chi^2$ -test, and confirming the data by the analysis of variance test, we have performed multiple comparisons with contingency tables and the adjustment was made by Fisher exact test.

## Discussion

Substantial evidence indicates that the aetiology of prostate cancer involves an interaction among genetic, environmental and dietary factors. However, having a positive family history is the strongest epidemiological risk factor for prostate cancer.<sup>5</sup> Among all the genes described as relevant in the developing of prostate cancer, the RNASEL gene has been highlighted as having the greatest effect.<sup>9,14,15</sup> Many variants<sup>15</sup> described in this gene, such as Arg462Gln, have been found to be associated with sporadic prostate cancer risk among Caucasians and African Americans.<sup>16</sup> However, the same variant (R462Q or Arg462Gln) has been found with decreased familial prostate cancer risk in a Japanese population with the Gln/Gln genotype.<sup>17</sup> Similarly,



inconclusive results have been obtained with the other variants, such as a study in a D541E in a northern Indian population that found no association between this variant and the risk of prostate cancer.<sup>18</sup> However, other studies show an association between D541E and prostate cancer risk. A study of a Japanese population<sup>17</sup> and studies of a European-American Caucasian sample<sup>6,19</sup> found a strong positive association with prostate cancer and D541E. The results are diverse and vary among populations and ethnic groups in relation to RNASEL variants and others related to prostate cancer risk as well as in the specific genotypes that confer susceptibility.<sup>20</sup>

In our population of south Spain (European Caucasians), the most relevant variants in the RNASEL gene were D541E, R462Q and I97L. However, other variants, such as E265X, M1I, 471delAAAG, G59F, S113S, I220V, S406F and Y530C have representative roles in the development of prostate cancer in some populations, such as Ashkenazi Jews,<sup>21</sup> Finns<sup>6,22</sup> and African Americans,<sup>10</sup> but there were no differences in our population between patients and controls. For the variants (D541E, R462Q and I97L), which have statistically significant values, the genotypes that had the worst prognoses were G/G in D541E, A/A in R462Q and A/G in I97L, whereas the ones that represented better clinical characteristics were T/T in D541E, G/G in R462Q and A/C in I97L. A similar study in R462Q has been carried out in other populations, such as in Cleveland, Ohio and Detroit, Michigan, where men who are heterozygous with respect to the mutated allele were found to have a 50% greater risk of prostate cancer than non-carriers, and homozygotes had more than double the risk.<sup>16</sup> Our study in R462Q indicated that homozygotes with the A/A genotype had worse clinical characteristics in prostate cancer than individuals with the G/G genotype or with the G/A genotype in the middle. A study of a Finnish population found that variants R462Q and D541E had an important role in prostate cancer.<sup>22</sup> However, concerning in D541E in the Finnish population, the variant that showed a higher correlation with prostate cancer was G/T, whereas in our population it was G/G.

Both genetic and clinical data could confer relevant information about the control of prostate cancer. This work indicates that in each single population genetic data for RNASEL gene have different prognosis values. Meanwhile, different variants of the same region analysed in the RNASEL gene have the same pathological evolution for prostate cancer, depending on the population in which it is analysed. With all this data, we may find genetic differences depending on the population analysed. Moreover, these genetic data could be an important tool in improving the clinical evolution of patients affected by prostate cancer, but knowing that prostate cancer is a polygenic cancer and further studies in other genes will confer accurate information.

Knowing that patients with a specific genotype will develop worse characteristic of this cancer than other patients, will help us to focus on different clinical treatments and attempt to avoid rapid progression of the cancer and a decreased quality of life. As it can be inferred by the clinical data, the genetic profile in patients with this cancer could be used as a prognostic factor for decision making regarding more radical and frequent treatment, depending on personal genotype.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Young AC, Craven RA, Cohen D, Taylor C, Booth C, Harnden P *et al*. Analysis of VHL gene alterations and their relationship to clinical parameters in sporadic conventional renal cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 7582–7592.
- Banks RE, Tirukonda P, Taylor C, Hornigold N, Astuti D, Cohen D *et al*. Genetic and epigenetic analysis of von Hippel-Lindau (VHL) gene alterations and relationship with clinical variables in sporadic renal cancer. *Cancer Res* 2006; **66**: 2000–2011.
- Giménez-Bachs JM, Salinas-Sánchez AS, Sánchez-Sánchez F, Lorenzo-Romero JG, Donate-Moreno MJ, Pastor-Navarro H *et al*. Determination of vhl gene mutations in sporadic renal cell carcinoma. *Eur Urol* 2006; **49**: 1051–1057.
- FitzGerald LM, Patterson B, Thomson R, Polanowski A, Quinn S, Brohede J *et al*. Identification of a prostate cancer susceptibility gene on chromosome 5p13q12 associated with risk of both familial and sporadic disease. *Eur J Hum Genet* 2009; **17**: 368–377.
- Alberti C. Hereditary/familial versus sporadic prostate cancer: few indisputable genetic differences and many similar clinicopathological features. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2010; **14**: 31–41.
- Shook SJ, Beuten J, Torkko KC, Johnson-Pais TL, Troyer DA, Thompson IM *et al*. Association of RNASEL variants with prostate cancer risk in Hispanic Caucasians and African Americans. *Clin Cancer Res* 2007; **13**: 5959–5964.
- Wiklund F, Jonsson B, Brookes AJ, Strömqvist L, Adolfsson J, Emanuelsson M *et al*. Genetic analysis of the RNASEL gene in hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004; **10**: 7150–7156.
- Dagan E, Laitman Y, Levanon N, Feuer A, Sidi AA, Baniel J *et al*. The 471delAAAG mutation and C353T polymorphism in the RNASEL gene in sporadic and inherited cancer in Israel. *Familial Cancer* 2006; **5**: 389–395.
- Beuten J, Gelfond JAL, Franke JL, Shook S, Johnson-Pais TL, Thompson IM *et al*. Single and multivariate associations of MSR1, ELAC2, and RNASEL with prostate cancer in an ethnic diverse cohort of men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010; **19**: 588–599.
- Maier C, Haeusler J, Herkommer K, Vesovic Z, Hoegel J, Vogel W *et al*. Mutation screening and association study of RNASEL as a prostate cancer susceptibility gene. *Br J Cancer* 2005; **92**: 1159–1164.
- Watanabe M, Nakayama T, Shiraishi T, Stemmermann GN, Yatani R. Comparative studies of prostate cancer in Japan versus the United States: A review. *Urol Oncol* 2000; **5**: 274–283.
- Godoy G, Huang GJ, Patel T, Taneja SS. Long-term follow-up of men with isolated high-grade prostatic intra-epithelial neoplasia followed by serial delayed interval biopsy. *Urology* 2011; **77**: 669–674.
- Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resources (Arlequin suite ver 3.5)* 2010; **10**: 564–567.
- Agalliu I, Leanza SM, Smith L, Trent JM, Carpten JD, Bailey-Wilson JE *et al*. Contribution of HPC1 (RNASEL) and HPCX variants to prostate cancer in a founder population. *Prostate* 2010; **70**: 1716–1727.
- Li H, Tai BC. RNASEL gene polymorphisms and the risk of prostate cancer: a meta-analysis. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 5713–5719.
- Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, Xiang Y, Krumroy LM, Klein EA *et al*. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13% of prostate cancer cases. *Nat Genet* 2002; **32**: 581–583.

- 17 Nakazato H, Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Yamanaka H. Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on familial prostate cancer risk in a Japanese population. *Br J Cancer* 2003; **89**: 691–696.
- 18 Rennert H, Zeigler-Johnson C, Devi Mittal R, Tan Y, Sadowl CM, Edwards J *et al*. Analysis of the RNASEL/HPC1, and macrophage scavenger receptor 1 in Asian-Indian advanced prostate cancer. *Urology* 2009; **72**: 456–460.
- 19 Noonan-Wheeler FC, Wu W, Roehl KA, Kim A, Haugen J, Suarez BK *et al*. Association of hereditary prostate cancer gene polymorphic variants with sporadic aggressive prostate carcinoma. *Prostate* 2006; **66**: 49–56.
- 20 Summers K, Crespi B. Molecular evolution of the prostate cancer susceptibility locus RNASEL: evidence for positive selection. *Infect Genet Evol* 2008; **8**: 297–301.
- 21 Rennert H, Bercovich D, Hubert A, Abeliovich D, Rozovsky U, Bar-Shira A *et al*. A novel founder mutation in the RNASEL gene, 471delAAAAG, is associated with prostate cancer in Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet* 2002; **71**: 981–984.
- 22 Rökman A, Ikonen T, Seppälä EH, Nupponen N, Autio V, Mononen N *et al*. Germline alterations of the RNASEL gene, a candidate HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate cancer. *Am J Hum Genet* 2002; **70**: 1299–1304.



# Actas Urológicas Españolas

www.elsevier.es/actasuro



## ARTÍCULO ORIGINAL

### Estudio genético de RNASEL en cáncer de próstata y su relación con el estadiaje clínico

Q1 M.J. Alvarez-Cubero<sup>a,\*</sup>, M. Saiz<sup>a</sup>, L.J. Martinez-Gonzalez<sup>b</sup>, J.C. Alvarez<sup>a,b</sup>,  
J. Lorente<sup>a,b</sup> y J.M. Cozar<sup>c</sup>

<sup>a</sup> Laboratorio de Identificación Genética, Departamento de Medicina Legal y Toxicología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España

<sup>b</sup> Centro Pfizer, Universidad de Granada, Junta de Andalucía de Investigación Genómica y Oncológica, GENYO, Granada, España

<sup>c</sup> Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, España

Recibido el 20 de diciembre de 2011; aceptado el 22 de diciembre de 2011

#### PALABRAS CLAVE

Cáncer de próstata;  
Genética;  
RNASEL

#### KEYWORDS

Prostate cancer;  
Genetic;  
RNASEL

#### Resumen

**Objetivos:** Mediante este estudio se pretende buscar una posible relación genética en el cáncer de próstata esporádico, para intentar establecer subgrupos poblacionales en los pacientes en función del genotipo encontrado y la agresividad del cáncer.

**Material y métodos:** Doscientos treinta y un pacientes con cáncer prostático esporádico y 68 individuos control, todos seleccionados según criterios de parámetros clínicos (grado de PSA, escala de Gleason...) por el urólogo especialista. Ambos grupos (pacientes y controles) han sido genotipados mediante técnicas de secuenciación en los exones 1 y 3 del gen RNASEL.

**Resultados:** Se han encontrado diferencias significativas entre controles y pacientes en algunas de las regiones genotipadas del gen RNASEL (I97L,D541E y R462Q).

**Conclusiones:** Gracias a la caracterización del perfil genético en determinadas regiones del genoma, como el gen RNASEL, junto con la combinación de los parámetros clínicos y ambientales podemos generar una medicina y seguimiento más personalizado de cada individuo.

© 2011 AEU. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

#### RNASEL Study of Genetics of Prostate Cancer and its Relation to Clinical Staging

#### Abstract

**Objectives:** This study has aimed to find a possible genetic relationship between sporadic prostate cancers. An attempt is made to establish population subgroups in patients based on the genotype found and the aggressiveness of the cancer.

**Material and methods:** A total of 231 patients with sporadic prostate cancer and 68 controls were selected. The subjects were selected by an urologist using clinical parameters such as PSA level and Gleason score. Both groups (patients and controls) were genotyped in RNASEL gene by sequencing the exons 1 and 3.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: mjesusac@ugr.es (M.J. Alvarez-Cubero).

**Results:** Statistically significant differences were found between controls and patients in some of the genotyped regions of the RNASEL gene (I97L, D541E and R462Q).

**Conclusions:** Thanks to the genetic profile in some regions of the genome, such as the RNASEL gene, together with the combination of the clinical and environmental parameters, we can suggest a care and more personalized follow-up of each patient.

© 2011 AEU. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

## 1 Introducción

2 Aun siendo el cáncer de próstata la patología oncológica  
3 con una de las mayores tasas de mortalidad entre la pobla-  
4 ción masculina de España<sup>1,2</sup>, posee características como  
5 una etiología desconocida y una elevada variabilidad gené-  
6 tica en función de la localización geográfica<sup>3</sup>. La principal  
7 complejidad de esta etiopatogenia radica en sus caracterís-  
8 ticas multifactoriales, entre las que se destacan una amplia  
9 variedad de factores genéticos y ambientales<sup>4</sup> que parecen  
10 ejercer un papel importante en el desarrollo y evolución de  
11 la misma.

12 Se hace patente la necesidad de un estudio genético en  
13 la población que nos permita crear un factor de diagnóstico  
14 precoz y de predisposición eficiente. Según estas pre-  
15 misas estamos diseñando un primer abordaje genético de este  
16 cáncer analizando mutaciones en genes relevantes como el  
17 HPC1(1q24-q25), que codifica para una Rnasa L, endorribo-  
18 nucleasa que parece desempeñar un papel relevante en la  
19 apoptosis<sup>5-7</sup> y especialmente en el desarrollo del cáncer de  
20 próstata<sup>7</sup>. De hecho, se han descrito determinados *Single*  
21 *Nucleotide Polymorphisms* (SNP) en este gen que se desta-  
22 can como relevantes en el desarrollo de esta patología, así  
23 es el caso de 471delAAAG y Arg462Gln, entre otros, definidos  
24 en poblaciones asiáticas<sup>8</sup>.

25 Mediante este estudio, por tanto, se pretende buscar una  
26 posible relación genética en el cáncer de próstata esporá-  
27 dico que nos permita establecer subgrupos de agresividad  
28 del cáncer en los pacientes en función del genotipo encon-  
29 trado en las variantes del gen RNASEL<sup>9</sup>.

## 30 Materiales y métodos

31 Desde 2007 se han analizado un total de 68 controles y  
32 231 pacientes diagnosticados de cáncer de próstata en este  
33 proyecto. El estudio se ha llevado a cabo entre grupos del  
34 Departamento de Medicina Legal, Toxicología y Antropolo-  
35 gía Física de la Universidad de Granada y el Servicio de  
36 Urología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de  
37 Granada. El grupo de pacientes está compuesto por varo-  
38 nes con cáncer de próstata esporádico, diagnosticados por  
39 el urólogo de forma no consecutiva, sino aleatoria, para  
40 que hubiera una muestra representativa de cada estadio  
41 tumoral, tras la determinación de parámetros como PSA,  
42 escala-T y escala de Gleason; además otros datos como el  
43 lugar de origen del paciente y la edad fueron anotados. El  
44 grupo control también fue seleccionado por el urólogo espe-  
45 cialista, siendo todos ellos individuos con niveles de PSA y  
46 tacto rectal normales. Todos los sujetos fueron entrevistados

por un investigador y firmaron un consentimiento informado  
según la Declaración de Helsinki para su participación en  
el estudio, previamente aprobado por el Comité Ético del  
hospital. Para mayor información sobre los sujetos de este  
estudio remitimos al lector a la **tabla 1**, en la que se presenta  
la caracterización de los sujetos participantes en el estudio  
según parámetros de edad, estadios (T, N y M), escala de  
Gleason y niveles de PSA.

Las muestras se tomaron en 2 formatos: muestras de  
hisopado bucal y muestras de sangre periférica en EDTA  
(200 µl). Ambas fueron procesadas mediante una extracción  
orgánica con fenol/cloroformo/alcohol-isoamílico y protei-  
nasa K. Posteriormente se cuantificaron por RT-PCR (Applied  
Biosystems 7500).

El procedimiento analítico ha sido la amplificación y suce-  
siva secuenciación de 3 regiones dentro del exón 1 (1-377,  
449-848, 1070-1459) y exón 3 (1567-1772) en el gen HPC1.  
La información de los *primers* se expone en la **tabla 2**.

Mediante la secuenciación del gen RNASEL (exón 1 y 3)  
se intentaron cubrir todas las variantes del mismo descritas  
hasta la fecha (R462Q, D541E, E265X, 471delAAAG, G265X,  
M1I e I97L)<sup>3,8</sup>. Para este proceso se usaron los reactivos  
de amplificación AmpliTaq Gold®PCR Master Mix (Applied  
Biosystems), en un termociclador GeneAmp System2400.  
Posteriormente, en las regiones en las que se obtuvo una  
amplificación eficiente, se procedió al proceso de secuenciación.  
El proceso de secuenciación se realizó usando el  
kit ABI PRISM® BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing  
Ready Reaction kit. Posteriormente se visualizaron los resul-  
tados en un analizador genético ABI PRISM 3130 (Applied  
Biosystems®). Los resultados del análisis fueron editados  
mediante el uso del software ABI PRISM® SeqScape® v.2.6.

La base de datos se manejó con el paquete estadístico  
SPSS v15.0.

## Resultados

Del *screening* realizado al gen RNASEL se han analizado  
las siguientes mutaciones: (M1I, G59F, I97L, S113S, Del 471  
AAAG, I220V, E262X, E265X, S406F, R462Q, Y530C, D541E).  
No se han encontrado diferencias significativas entre indivi-  
duos controles y pacientes en las variantes M1I, G59F, I97L,  
S113S, Del 471 AAAG, I220V, E262X, S406F, Y530C y E265X  
en nuestra cohorte de estudio. Sin embargo, sí hemos obser-  
vado diferencias en las regiones I97L, donde un 97,14% de  
los pacientes presenta genotipo A/A igual que los controles,  
mientras que un 2,07% presenta variantes diferentes (A/G y  
A/C); en la región R462Q un 43,81% presenta G/G frente a  
un 26,3% de los controles, 50,4% G/A frente a un 56,9% en

**Tabla 1** Información clínica de pacientes y controles de este estudio

VARIABLES	Pacientes n = 231	(%)	Controles n = 68	(%)
<b>Edad</b>				
< 60	41	17,7	28	41,2
60-69	130	56,3	32	47,1
70-79	49	21,2	8	1,2
> 80	11	4,8	0	0
<b>Estadio T</b>				
T1	25	8,5	ND	ND
T2	92	37,8	ND	ND
T3	88	37,5	ND	ND
T4	26	16,2	ND	ND
<b>Estadio N</b>				
N0	187	63,2	ND	ND
N1	44	36,8	ND	ND
<b>Estadio M</b>				
M0	170	76,3	ND	ND
M1	61	23,7	ND	ND
<b>Escala Gleason</b>				
< 4	15	5	ND	ND
4-6	92	41,2	ND	ND
7-8	98	45	ND	ND
9-10	26	8,8	ND	ND
<b>Niveles PSA (ng/ml)</b>				
< 20	100	46,3	ND	ND
20-40	50	19,9	ND	ND
> 40	81	33,6	ND	ND

n: número total de individuos; ND: no determinado; ng/ml: nanogramos/mililitro.

los controles y variante A/A 15,3% en los pacientes frente a un 16,6% en los controles; en la región D541E encontramos un genotipo predominante en los pacientes de T/G del 52,5% frente al 47,2% en los controles, un genotipo T/T en el 14,9% de los pacientes frente al 16,6% en los controles y un genotipo G/G del 32,4% en los pacientes frente a un 36,1% en los controles.

Al relacionar nuestros hallazgos de genotipado con las características clínicas de los pacientes encontramos que:

1. la mutación AA por GG en R462Q (que cambia la síntesis aminoacídica: arginina por glicina) se asoció con enfermedad avanzada, esto es T3-4, N1, M1 ( $p < 0,02$ ).
2. la mutación GG por TT en D541E (que provoca el cambio aminoacídico: aspartato por glutamato) se asoció significativamente con enfermedad metastásica (M1) ( $p < 0,01$ ).

Para mayor detalle véase la tabla 3.

Como podemos ver en la figura 1 la aparición de un cambio de una base A o G en la secuencia del gen HPC1 conlleva la aparición de una mutación (R).

## Discusión

Según los datos obtenidos hemos descartado determinadas mutaciones como M1I, G59F, I97L, S113S, Del 471 AAAG, I220V, E262X, E265X, S406F, R462Q, Y530C, D541E, que sin embargo son predominantes en otras poblaciones como Israel, Finlandia y Alemania<sup>10-12</sup>, y en nuestra población presentan igual perfil genético tanto en controles como en pacientes, por lo que no nos sirve como herramienta para poder diferenciar estos grupos poblacionales. Por tanto, estos SNP del gen RNASEL se descartan por sí solos en la población sureuropea como factor de riesgo, pues

**Tabla 2** Secuencia de primers gen HPC1 (RNASEL)

Primers HPC1	Secuencias del primer (5' → 3')
Exón 1-1 (F)	TGGTAGCAGGTGGCATTTC
Exón 1-1 (R)	AAGCCATAAAAATCACACTCA
Exón 1-2 (F)	AATGTGAATTTGAGGCGAAAG
Exón 1-2 (R)	AGTTCAACAGCAAGCAGC
Exón 1-3 (F)	ATACCGCCCTATGATTGGCA
Exón 1-3 (R)	GCAGATCCTGGTGGGTGTATC
Exón 3 (F)	CTTCCCTCCCTAACAAAGCCT
Exón 3 (R)	GCACCACCTTACCCTTCC

F: forward); R: reverse.

**Tabla 3** Resultados de los genotipos estudiados y estadio del cáncer

Exón	Posición nucleotídica	Cambio	Cambio aminoácido	Genotipo (variantes)	Pacientes %	Controles %	EstadioTNM Loc / Av
1	3	G > A	Met > Ile	M1I (GG,GA,AA)	100% GG	100% GG	
1	175	G > A	Gly > Phe	G59F (GG,GA,AA)	100% GG	100% GG	
1	289	A > G	Ile > Leu	I97L (AA,AG,GG, AC)	97,93%AA 1,030%AG 0% GG 1,030%AC	100% AA	
1	339	T > C	Ser > Ser	S113S (TT,TC,CC)	100% TT	100% TT	
1	471	Del AAAG	Frame shift	Del471AAAG (AAAG/AAAG, AAAG/DelAAAG, DelAAAG/DelAAAG)	100% AAAG/AAAG	100% AAAG/AAAG	
1	661	A > G	Ile > Val	I220V (AA,AG,GG)	100% AA	100% AA	
1	784	G > T	Glu > Stop	E262X (GG,GT,TT)	100% GG	100% GG	
1	793	G > T	Glu > Stop	E265X (GG,GT,TT)	100% GG	100% GG	
1	1217	C > T	Ser > Phe	S406F (CC,CT,TT)	100% CC	100% CC	
1	1384	G > A	Arg > Gln	R462Q (GG,GA,AA)	GG 34,18% GA 50,42% AA 15,38%	GG 26,39% GA 56,94% AA 16,67%	GG (NS) 54 vs 46% GA (p < 0,01) 41% vs 59% AA (p < 0,01) 37 vs 63%
3	1589	A > G	Tyr > Cys	Y530 C (AA,AG,GG)	100% AA	100% AA	
3	1623	T > G	Asp > Glu	D541E (TT,TG,GG)	TT 14,95% TG 52,56% GG 32,47%	TT 16,67% TG 47,22% GG 36,11%	TT (NS) 52 vs 48% TG (p < 0,02) 44 vs 56% GG (p < 0,02) 43 vs 57%

A: adenina; Arg: arginina; Asp: ácido aspártico; C: citosina; Cys: cisteína; Del: delección; Estadio TNM loc/Av: estadio TNM localizado versus avanzado; G: guanina; Gln: glutamina; Glu: ácido glutámico; Gly: glicina; Ile: isoleucina; Leu: leucina; Met: metionina; NS: no significativo (indica valor no significativo entre las variables comparadas); Phe: fenilalanina; Ser: serina; Stop: codón de parada; Tyr: tirosina; Val: valina.

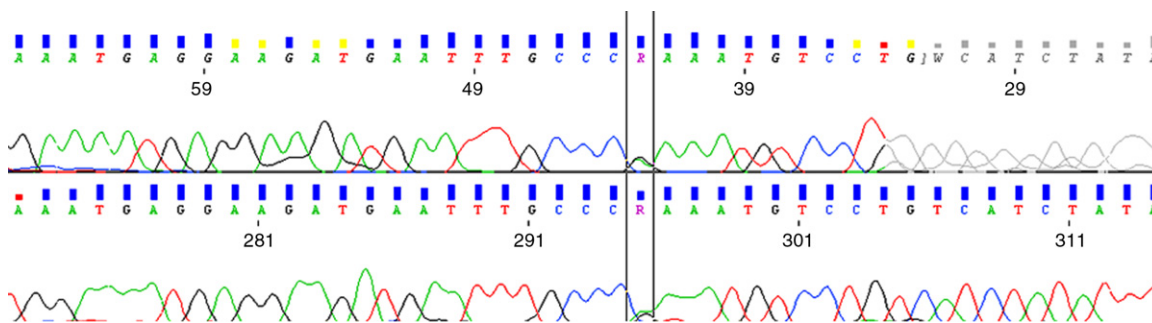


Figura 1 Enmarcado en el cuadro SNP que difiere de la secuencia normal del gen HPC1.

son idénticos en individuos afectados y no afectados. De las mutaciones en las que hemos obtenido diferencias entre controles y pacientes (I97L, R462Q y D541E), los genotipos predominantes son diferentes a los preexistentes en otras poblaciones europeas<sup>13-16</sup>. Gracias a los resultados de estos SNP se podría caracterizar genotípicamente a los individuos del Sur de Europa y diferenciarlos genéticamente de otras poblaciones. Con respecto a las diferencias encontradas en las variantes I97L, D541E y R462Q entre pacientes y controles se puede encontrar, tras un análisis de la literatura, otros estudios que comunican resultados en nuestra misma línea de trabajo. Madsen en 2008 describió que la mutación I97L es de tipo *missense* y se localiza en el sitio de repetición 3 y 7 del dominio anquirina del gen RNASEL<sup>17</sup>. Al igual que el grupo de mutaciones descritas con anterioridad (M1I, G59F, S113S, Del 471 AAAG, I220V, E262X, E265X, S406F, Y530C) se señalaba como una mutación con un efecto importante en el cáncer de próstata, sin embargo pocos estudios han conseguido resultados positivos que lo avalen<sup>18</sup> y la mayoría no encuentran diferencias en la actividad de la enzima Rnasa L. Muchos de los estudios se han realizado también en cánceres de cérvix, cabeza, cuello y mama, encontrando resultados similares a los del cáncer de próstata<sup>17</sup>. Nuestros resultados apoyan los encontrados por Xiang en 2003<sup>18</sup> en el cáncer de próstata.

La mutación *missense* R462Q: (rs486907) es de tipo germinal, también denominada Arg462Gln, lo que significa una sustitución de una glutamina por una arginina en el codón 462 (una guanina pasa a adenina, fenómeno conocido como transición nucleotídica en la base 1385). Según algunos estudios<sup>14</sup> parece que esta variante provoca una disminución de la actividad enzimática en el gen RNASEL con respecto a la variante *wildtype*, lo que puede estar implicado en la carcinogénesis prostática.

En el mismo estudio de Casey en 2002<sup>14</sup> se señalan a los varones heterocigotos con un 50% más de riesgo de padecer este cáncer al compararse con los individuos que no portan ninguna alteración, y este riesgo aumenta hasta el doble en individuos homocigotos. Sin embargo, la dificultad y variedad de este cáncer se hace patente al consultar otros estudios. Resultados derivados de los trabajos de Xiang et al.<sup>18</sup> indican que la variante R462Q reduce la habilidad de la enzima RNASEL para generar la respuesta apoptótica como respuesta a la activación de la enzima 2-5 A. Otros estudios en poblaciones suecas, sin embargo, no encuentran diferencias significativas entre controles y pacientes en esta variante<sup>12</sup>. Nuestros resultados refuerzan las hipótesis de

los trabajos de Xiang y Casey, ya que también encontramos mutaciones en esta región que pueden afectar la eficiencia de la enzima RNASEL, y además relacionándose con estadios de la enfermedad avanzados<sup>19</sup>.

Por último, la mutación *missense* D541E (rs627928): al igual que hemos visto en los ejemplos anteriores, según la población en la que enfoquemos el estudio, podemos obtener unos resultados diferentes. En este caso, en poblaciones japonesas se ha encontrado un aumento de riesgo para el cáncer de próstata en individuos que poseen esta variante<sup>20</sup>, mientras que otros estudios no encontraron este tipo de asociación, como es el caso de estudios en poblaciones europeas<sup>11,14,21</sup>, en los que se han descrito casos de mayor riesgo de cáncer de próstata en individuos con al menos una componente del alelo G y una disminución de un 36% de riesgo en varones homocigóticos para el alelo T<sup>19</sup>. Nuestro estudio confirma estos hallazgos en pacientes del Sur de Europa, en donde no se había abordado el estudio de este gen RNASEL. Al igual que en la variante R462Q, la variante d541E se asoció a pacientes con enfermedad avanzada, concretamente aquellos con metástasis (M1).

En definitiva, y en función de los datos preliminares de este estudio, podemos inferir que: las mutaciones del gen RNASEL (en R462Q y D541E) producen cambios en la síntesis de los aminoácidos proteicos o naturales codificados por el genoma, que pueden inducir cambios en la biología intracelular del cáncer de próstata; los pacientes que presentaron estas mutaciones tuvieron un estadio de la enfermedad significativamente más avanzado; las mutaciones descritas pueden estar relacionadas con la agresividad tumoral y podrían ser propuestas, de confirmarse estos datos, en series más amplias como factores pronósticos de progresión; se han descrito situaciones similares recientemente en el supresor de tumores ARLTS1 (localizado en el gen 13q14.3), cuya variante Cys148Arg (T442C) parece aumentar la susceptibilidad a padecer cáncer de próstata esporádico y/o hereditario<sup>22</sup>.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## Agradecimientos

Los autores quieren agradecer a todos los donantes y al Servicio de Urología del Hospital Universitario Virgen de las

214 Nieves (Granada, España) por hacer posible este estudio.  
215 También se agradece a la Universidad de Granada por faci-  
216 litarnos el uso del paquete software usado en el análisis de  
217 los datos. De igual modo se agradece al Ministerio de Educa-  
218 ción (España) por la beca FPU concedida a uno de los autores  
219 (María Jesús Álvarez Cubero).

## 220 Bibliografía

- 221 Q7 1. Grönberg H. Prostate cancer epidemiology. *Lancet*.  
222 2003;361:859-64.
- 223 2. Granado de la Orden S, Saá Requejo C, Quintás Viqueira A. Situa-  
224 ción epidemiológica del cáncer de próstata en España. *Actas*  
225 *Urol Esp*. 2006;30:574-82.
- 226 3. Rennert H, Zeigler-Johnson C, Mittal RD, Tan YC, Sadowl CM,  
227 Edwards J, et al. Analysis of the RNASEL/HPC1, and Macrophage  
228 Scavenger Receptor 1 in Asian-Indian Advanced Prostate Cancer.  
229 *Urology*. 2008;72:456-60.
- 230 4. Nwosu V, Carpten J, Trent JM, Sheridan R. Heterogeneity  
231 of genetic alterations in prostate cancer: Evidence of the  
232 complex nature of the disease. *Hum Mol Genet*. 2001;10:  
233 2313-8.
- 234 5. Hassel BA, Zhou A, Sotomayor C, Maran A, Silverman RH. A  
235 dominant negative mutant of 2-5A-dependent RNase suppres-  
236 ses antiproliferative and antiviral effects of interferon. *EMBO*  
237 *J*. 1993;12:3297-304.
- 238 6. Zhou A, Hassel BA, Silverman RH. Expression cloning of 2-5A-  
239 dependent RNAase: A uniquely regulated mediator of interferon  
240 action. *Cell*. 1993;72:753-65.
- 241 7. Silverman RH. Implications for RNase L in prostate cancer bio-  
242 logy. *Biochemistry*. 2003;42:1805-12.
- 243 8. Rennert H, Bercovich D, Hubert A, Abeliovich D, Rozovsky U,  
244 Bar-Shira A, et al. A Novel Founder Mutation in the RNASEL  
245 Gene, 471delAAAG, Is Associated with Prostate Cancer in Ash-  
246 kenazi Jews. *Am J Hum Genet*. 2002;71:981-4.
- 247 9. Vázquez F, et al. Estudio de la relación entre el cáncer de pró-  
248 tata esporádico en nuestro medio y el marcador genético HPC1  
249 (RNASEL). *Ser. Actas de la Asociación Andaluza de Urología*.  
250 2009;3.
- 251 Q8 10. Dagan E, Laitman Y, Levanon N, Feuer A, Sidi AA, Baniel J, et al.  
252 The 471delAAAG mutation and C353T polymorphism in the RNA-  
253 SEL gene in sporadic and inherited cancer in Israel. *Familial*  
*Cancer*. 2006;5:389-95.
- 254 11. Rökman A, Ikonen T, Seppälä EH, Nupponen N, Autio V, Mononen  
255 N, et al. Germline alterations of the RNASEL gene, a candi-  
256 date HPC1 gene at 1q25, in patients and families with prostate  
257 cancer. *Am J Hum Genet*. 2002;70:1299-304.
- 258 12. Wiklund F, Jonsson BA, Brookes AJ, Strömqvist L, Adolfsson J,  
259 Emanuelsson M, et al. Genetic analysis of the RNASEL gene in  
260 hereditary, familial, and sporadic prostate cancer. *Clin Cancer*  
261 *Res*. 2004;10:7150-6.
- 262 13. Krüger S, Silber AS, Engel C, Görgens H, Mangold E,  
263 Pagenstecher C, et al. Arg462Gln sequence variation in the  
264 prostate-cancer-susceptibility gene RNASEL and age of onset  
265 of hereditary non-polyposis colorectal cancer: a case-control  
266 study. *Lancet Oncol*. 2005;6:566-72.
- 267 14. Casey G, Neville PJ, Plummer SJ, Xiang Y, Krumroy LM, Klein  
268 EA, et al. RNASEL Arg462Gln variant is implicated in up to 13%  
269 of prostate cancer cases. *Nature Genetics*. 2002;32:581-3.
- 270 15. Camp NJ, Tavtigian SV. Meta-analysis of associations of the  
271 Ser217Leu and Ala541Thr variants in ELAC2 (HPC2) and prostate  
272 cancer. *Am J Hum Genet*. 2002;147:715-1478.
- 273 16. Maier C, Haeusler J, Herkommer K, Vesovic Z, Hoegel J, Vogel  
274 W, et al. Mutation screening and association study of RNA-  
275 SEL as a prostate cancer susceptibility gene. *Br J Cancer*.  
276 2005;92:1159-64.
- 277 17. Madsen BE, et al. Germline Mutation in RNASEL Predicts Increa-  
278 sed Risk of Head and Neck, Uterine Cervix and Breast Cancer. Q9  
279 *PLoS ONE*. 2008;3:e2492.
- 280 18. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, Plummer S, Klein EA, Carpten JD,  
281 et al. Effects of RNase L mutations associated with prostate  
282 cancer on apoptosis induced by 2,5 -oligoadenylates. *Cancer*  
283 *Res*. 2003;63:6795-801.
- 284 19. Meyer MS, Penney KL, Stark JR, Schumacher FR, Sesso HD, Loda  
285 M, et al. Genetic variation in RNASEL associated with prostate  
286 cancer risk and progression. *Carcinogenesis*. 2010;31:1597-603.
- 287 20. Nakazato H, Suzuki K, Matsui H, Ohtake N, Nakata S, Yamanaka  
288 H. Role of genetic polymorphisms of the RNASEL gene on fami-  
289 lial prostate cancer risk in a Japanese population. *Br J Cancer*.  
290 2003;89:691-6.
- 291 21. Wang L, McDonnell SK, Elkins DA, Slager SL, Christensen E, Marks  
292 AF, et al. Analysis of the RNASEL gene in familial and sporadic  
293 prostate cancer. *Am J Hum Genet*. 2002;71:116-23.
- 294 22. Siltanen S, Wahlfors T, Schindler M, Saramäki OR, Mpindi JP,  
295 Latonen L, et al. Contribution of ARLTS1 Cys148Arg (T442C)  
296 variant with prostate cancer risk and ARLTS1 function in pros-  
297 tate cancer cells. *PLoS ONE*. 2011;6:e26595.