

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

EVALUACIÓN DEL SISTEMA ANTIOXIDANTE EN CÁNCER DE
PRÓSTATA

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

FERNÁNDEZ RAMOS ARMANDO

TUTOR:

DR. JAVIER ALEJANDRO BELMONT DÍAZ



LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fisiología prostática

Importancia de las hormonas en el desarrollo de la próstata

1.2. Cáncer de próstata

Estadísticas del cáncer de próstata

Estadios del cáncer de próstata

Tratamientos para el cáncer de próstata

Terapia hormonal en el cáncer de próstata

2. ANTECEDENTES

2.1. Cáncer de próstata y estrés oxidante

Especies reactivas de oxígeno

- Oxígeno singulete
- Radical anión superóxido
- Peróxido de hidrógeno
- Radical hidroxilo

Defensas antioxidantes

- Superóxido dismutasa (SOD)
- Catalasa (CAT)
- Glutación peroxidasa (GPx)
- Glutación reductasa (GRed)
- Glutación transferasa (GTS)

2.2. Estrés oxidante y la etiología del cáncer de próstata

Estrés oxidante en las primeras etapas del cáncer de próstata.

Efecto del estrés oxidante sobre el fenotipo agresivo en cáncer de próstata

Balance prooxidante/antioxidante en cáncer de próstata.

2.3. HIF-1 α como regulador y objetivo terapéutico

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4. HIPÓTESIS

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

5.2. Objetivo Particular

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Líneas celulares.

6.2. Velocidad de crecimiento de las líneas celulares.

6.3. Detección de proteínas por el método de Western Blot.

6.4. Cuantificación de ROS en líneas celulares PC3 y DU145.

6.5. Sistema enzimático antioxidante.

Actividad total de superóxido dismutasa (SOD)

Actividad de catalasa (CAT)

Actividad de glutatión reductasa (GRed)

Actividad de glutatión peroxidasa (GPx)

Actividad de glutatión-s-transferasa (GST)

6.6 Fosforilación oxidativa

6.7 Potencial intermembranal mitocondrial

7. RESULTADOS

7.1. Velocidad de crecimiento

7.2. Flujo de OxPhos y potencial mitocondrial

7.3. Producción de ROS

7.4. Sistema enzimático antioxidante

7.5. Expresión de las proteínas del sistema antioxidante de DU145

7.6. Expresión de la proteína HIF1 α en normoxia e hipoxia en las líneas celulares PC3 y DU145.

8. DISCUSIÓN

Vías de señalización alteradas por el estrés oxidante en CaP
HIF1a y reprogramación metabólica
Vía Nrf2

9. CONCLUSIÓN

10. REFERENCIAS

11. ANEXO 1 GENOTIPIFICACIÓN DE DU145

12. ANEXO 2 GENOTIPIFICACIÓN DE PC3

ABREVIATURAS

AP-1: Activate Protein-1 (Proteína-1 Activadora)
ARE: Antioxidant Response Element (Elemento de Respuesta Antioxidante)
BPH: Bening Prostatic Hyperplasia (Hiperplasia Prostática Benigna)
CaP: Cáncer de Próstata
CAT: Catalasa
DHT: Dihidrotestosterona
DNA: Deoxyribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
FAD: Flavin Adenina Dinucleótido
FGF2: Fibroblast Growth Factor 2 (Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2)
GPx: Glutati3n Peroxidasa
Gred: Glutati3n Reductasa
GSH: Glutati3n
GST: Glutati3n S-Transferasas
HARP: Heparin Affin Regulatory Peptide (Péptido Regulador de la Afinidad de Heparina)
HIF-1 α : Hypoxia-Inducible Factor 1-Alpha (Actor Inducible por Hipoxia 1)
HRE: Elemento de Respuesta a Hipoxia
HSP: Heat Shock Proteins (Proteínas de Choque Térmico)
IMM: Espacio Intermembranal
kDa: Kilodalton
MMPs: Metaloproteinasas De Matriz
NOX: NADPH oxidasa
Nrf2: Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2: (Factor Nuclear Eritroide 2)
PSA: Prostate Specific Antigen (Antígeno Prostático Específico)
pVHL: Proteína von Hippel-Lindau
RA: Androgen Receptor (Receptor de Andr3genos)
ROS: Reactive Oxygen Species (Especies Reactivas de Oxigeno)
SOD: Super3xido Dismutasa
TBARS: Thiobarbituric Acid Reactive Substances (Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico)
Trx: Tiorredoxinas
VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor (Factor De Crecimiento Endotelial Vascular)

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue apoyado por los donativos de SEP-CONACYT No. 283144 Dra. Sara Rodríguez Enríquez y de Ciencia de Frontera-CONACYT No. 6379 Dr. Rafael Moreno Sánchez

A mi madre y hermano por apoyarme en estudiar tan hermosa carrera desde inicio hasta el final, festejar logros y metas cumplidas, muchísimas gracias.

A la Doctora Sara Rodriguez por permitirme estar en su laboratorio y estar en un equipo de investigación de alto nivel y haberme brindado sus conocimientos.

A el Doctor Alejandro Belmont por recibirme como su estudiante de licenciatura un gusto conocer a una persona tan inteligente y también haberme ayudado a crecer como estudiante y persona.

A todos mis amigos de la carrera por todas las experiencias vividas y por vivir por aguantarme tanto en las prácticas como en clases; en especial a los más grandes amigos como Fernando, Genesis, Vanessa y Yulka jamás los olvidare.

A mi familia en especial a mis primos y tías por siempre darme consejos y también orientarme en todo, su apoyo es incondicional les agradezco.

A mis mejores amigos del pueblo en especial a la familia Moncayo por haberme brindado su amistad por muchos años y seguimos avanzando en esta nueva etapa, los quiero mucho.

RESUMEN

La glándula prostática es altamente susceptible a la transformación oncogénica a una frecuencia significativamente mayor a otros tejidos sexuales, debido a esto ocupa la segunda causa de muerte en México en varones por Cáncer, las especies reactivas de oxígeno han demostrado jugar un papel importante al estimular características de un fenotipo agresivo como son incrementar los procesos de proliferación y migración, el estudio que se realizó fue con las líneas celulares PC3 y DU145 lo que los resultados indicaron fue que DU145 tiene una menor actividad de catalasa, la actividad de glutatión reductasa es cinco veces menor en PC3 comparada con DU145, lo que sugiere que esta línea tiene una menor capacidad para reducir GSSG, es importante mantener el estado redox. La elevada tasa de producción de especies reactivas de oxígeno debido en parte por la baja actividad de glutatión reductasa puede ser la responsable de la estabilización de HIF-1 α en condiciones de normoxia en la línea celular PC3, por lo que la administración de antioxidantes y/o la sobreexpresión de GRed en PC3 podría disminuir la estabilización de HIF-1 α y la malignidad de esta línea celular.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Fisiología prostática

La próstata es una glándula exocrina accesoria masculina que rodea la porción inicial de la uretra, con forma de castaña, ubicada enfrente del recto y a la salida de la vejiga urinaria cuya función fisiológica es disolver el semen coagulado que se forma por acción de las proteínas de las vesículas seminales, a los pocos minutos de la eyaculación (Cofey, 1994) (Fig. 1.1.1). La próstata secreta varias proteínas como: fosfatasa ácida, seminina, activador de plasminógeno y antígeno prostático específico (PSA), este último utilizado en el pronóstico de cáncer de próstata (NIH 2019).

La glándula prostática puede dividirse en tres zonas: 1) la zona de transición se encuentra en el interior de la glándula y es la parte más pequeña (cerca del 10%). Rodea a la uretra entre la vejiga y la tercera parte de la uretra; 2) la zona central, la cual rodea a la zona de transición y representa aproximadamente un cuarto del total de la masa prostática. En esta región se encuentra el ducto y las vesículas seminales; 3) La zona periférica representa la parte mayoritaria de la próstata (70% aproximadamente) (IQWiG 2006).

La zona de transición tiende a crecer con la edad, denominándose hiperplasia prostática benigna (BPH). Cuando esta zona presiona contra la vejiga y la uretra, puede provocar problemas al orinar. Por otro lado, los tumores malignos se desarrollan primordialmente en la zona periférica (IQWiG 2006).

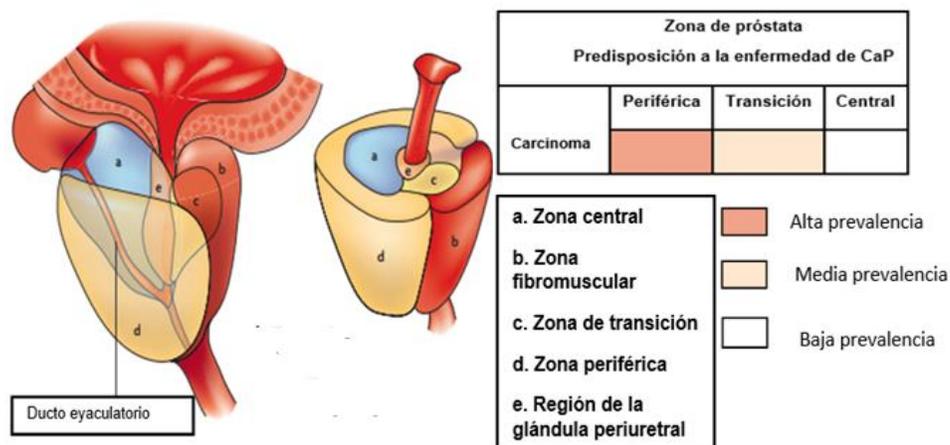


Figura 1.1.1 Fisiología prostática y predisposición al desarrollo de tumores malignos. Imagen tomada y modificada de De Marzo *et al*, 2007.

En el epitelio prostático se puede distinguir tres tipos celulares según sus características morfológicas (Figura 1.1.1), su función y su relevancia en la carcinogénesis. El tipo epitelio luminal es andrógeno dependiente y produce proteínas secretoras como PSA y expresa el receptor de andrógenos (RA), células basales que forman una capa continua y no producen proteínas secretoras prostáticas pero expresan factores que protegen del daño

al DNA, como la proteína glutatión-s-transferasa (GST) y el gen antiapoptótico Bcl-2, el tercer tipo es el neuroendocrino, es independiente de andrógenos y su acumulación en la capa basal es una característica de un cáncer de próstata agresivo (De Marzo *et al.*, 1998).

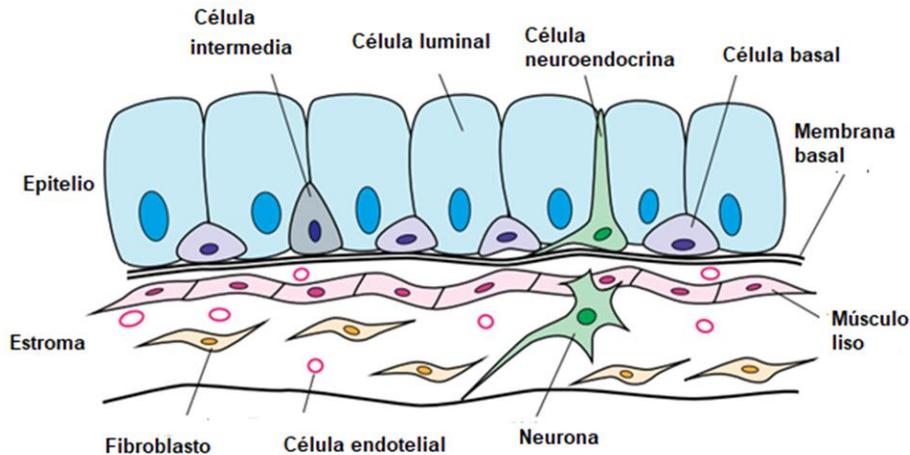


Figura 1.1.2 Tipos celulares en la próstata adulta. El compartimento epitelial de la próstata está compuesto por células basales que delimitan la membrana basal, células luminales secretoras, y células neuroendocrinas. Estos ductos epiteliales son adyacentes a un compartimento estromal que incluye células de músculo liso, fibroblastos y componentes neuronales. Imagen tomada y modificada de Toivanen, 2017.

Importancia de las hormonas en el desarrollo de la próstata

El funcionamiento y desarrollo de la próstata es dependiente de andrógenos como la testosterona y su derivado dihidrotestosterona (DHT) que es el principal andrógeno que media el crecimiento de la próstata (Banerjee, 2018). Cuando la testosterona entra a las células prostáticas, el 90% es convertida en DHT por acción de la enzima 5 α -reductasa (Feldman *et al.* 2001). DHT es más afín por el receptor de andrógenos (RA) que la testosterona (Gao *et al.* 2005).

El RA está compuesto por una región amino terminal (dominio de activación), un carboxilo terminal (dominio de unión al ligando) y un dominio de unión al DNA en la región media que contiene dos dedos de zinc. El RA se encuentra unido a proteínas de choque térmico (HSP) y otras proteínas que previenen su unión al DNA (Konigsberg, 2008).

La unión de andrógenos genera un cambio conformacional en el RA, lo que induce su disociación a las HSP y a la fosforilación del receptor mediada por la proteína cinasa A (Feldman *et al.* 2001). El cambio conformacional inducido por DHT favorece la formación de un homodímero que puede unirse a elementos de respuesta a andrógenos (ARE) en la región promotora de genes blanco que participan en procesos de proliferación, comunicación celular, diferenciación, etc. (Bolton *et al.* 2007) (Fig. 1.1.3).

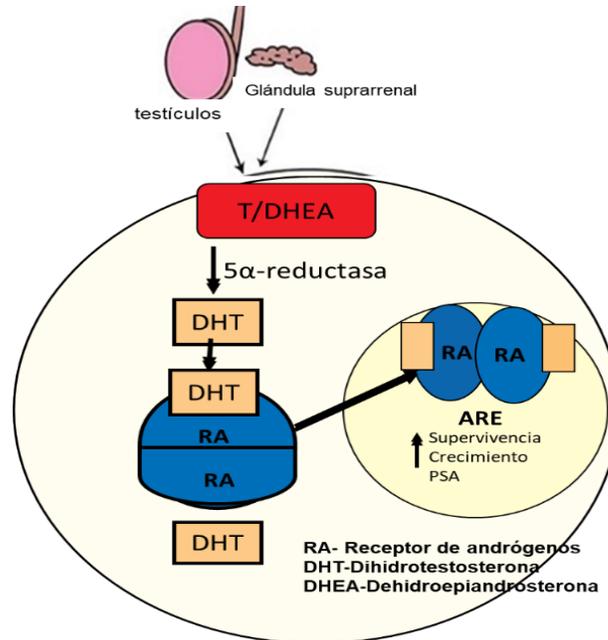


Figura 1.1.3 Papel del receptor de andrógenos en el desarrollo de la próstata y la señalización a través de RA es el principal medio por el cual las células del cáncer de próstata crecen y se propagan. Imagen modificada de <https://www.cancer.gov/news-events/cancer-currents-blog/2016/prostate-ror-gamma-inhibitor>.

1.2. Cáncer de próstata

El término “cáncer” hace referencia a un conjunto de enfermedades que tienen en común el crecimiento celular descontrolado. En general, el desarrollo del cáncer puede dividirse en tres etapas, iniciación, promoción y progresión. Durante el progreso en las etapas de desarrollo, el cáncer adquiere características que promueven su malignidad (Hanahan *et al.* 2011). Actualmente se tiene el consenso que el cáncer posee 10 características comunes (Wyant, 2020):

1) señalización sostenida de la proliferación; 2) evasión de supresores de crecimiento; 3) activación de la invasión y metástasis; 4) inmortalidad replicativa; 5) inducción de angiogénesis; 6) resistencia a la muerte celular; 7) desregulación energética celular; 8) evasión del sistema inmune; 9) inflamación promovida por el tumor; 10) inestabilidad genómica y mutaciones.

La próstata es altamente susceptible a la transformación oncogénica, a una frecuencia significativamente mayor a otros tejidos sexuales secundarios como las vesículas seminales. Aproximadamente uno de cada ocho varones será diagnosticado con cáncer de próstata (CaP) durante su vida a nivel mundial (<https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-prostata/acerca/estadisticas-clave.html>). Consecuentemente, esta enfermedad ha sido ampliamente estudiada con la intención de entender su etiología y mejorar su tratamiento.

Estadísticas del CaP

A nivel mundial, el CaP ocupa el segundo lugar en incidencia en hombres (1.2 millones de nuevos casos en 2018) y la quinta posición en mortalidad por cáncer (0.35 millones de fallecimientos en 2018) (Bray *et al.* 2018). En México, el 70% de los casos de CaP se detectan en los estadios avanzados de la enfermedad (Secretaría de Salud 2019), y representa la primera causa de muerte por cáncer en varones (7 mil defunciones anualmente) (CANIFARMA 2018).

Tabla 1.2.1. Incidencia y mortalidad de las principales neoplasias en México y a nivel mundial (GLOBOCAN 2018).

Principales Cánceres en el México Hombres 25> años

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Próstata	25,044	6,914 (27%)
Colon	5,291	2 938 (55%)
Pulmón	4,539	4,061(89%)
Estomago	3,899	3,179(81%)
Hígado	3,362	3,319(98%)
Testis	2,930	409(14%)
Riñón	2,517	1,653(65%)

Principales Cánceres en el Mundo Hombres 25> años

Cáncer	Incidencia	Mortalidad
Pulmón	1,366,815	1,183,655(86%)
Próstata	1,255,859	358,864(26%)
Estómago	682,336	512,671(75%)
Hígado	591,661	545,203(92%)
Colon	573,639	289,721(51%)
Recto	428,908	183,601(43%)
Vejiga	422,995	148,051(35%)
Esófago	399,275	356,989(89%)

Estadios del CaP

La clasificación patológica del CaP es definida por la suma de un puntaje de Gleason, el cual está basado en criterios morfológicos (Gleason,1974). Este método es el más utilizado para la clasificación del tejido en el CaP y el factor de pronóstico más importante. Una puntuación de Gleason alta predice una progresión más rápida y sugiere que se necesitan tratamientos más agresivos (Amin *et al.*, 2005).

Los estadios clínicos del CaP son los siguientes (<https://www.hopkinsmedicine.org/health/conditions-and-diseases/prostate-cancer/prostate-cancer-stages>):

T1: El tumor no puede ser detectado mediante el examen rectal digital o por técnicas de imagen (tomografía computacional o ultrasonido transrectal) (PSA = 9.3 ± 2.1).

- T1a: El tumor se descubre accidentalmente durante un procedimiento quirúrgico usado para tratar la hiperplasia prostática benigna (BPH), la cual es un crecimiento anormal de la próstata. El cáncer se encuentra en el 5% o menos del tejido removido.
- T1b: El tumor se descubre accidentalmente durante un procedimiento quirúrgico usado para tratar BPH, la cual es un crecimiento anormal de la próstata. El cáncer se encuentra en más 5% del tejido removido.
- T1c: El tumor se descubre durante una biopsia que se llevó a cabo por los elevados niveles de PSA.

T2: El tumor aparentemente está confinado en la próstata. Debido al tamaño del tumor, el doctor los puede sentir durante el examen rectal digital o por técnicas de imagen (PSA = 6.1 ± 1.5).

- T2a: El tumor ha invadido la mitad (o menos) de un lado de la próstata.
- T2b: El tumor ha invadido más de la mitad de un lado de la próstata, pero no ambos lados.
- T2c: El cáncer ha invadido los dos lados de la próstata.

T3: El tumor ha crecido fuera de la próstata y puede estar diseminado en las vesículas seminales (PSA = 19.9 ± 4.7).

- T3a: El tumor se está desarrollando fuera de la próstata; sin embargo, no se ha diseminado en las vesículas seminales.
- T3b: El tumor se ha diseminado a las vesículas seminales.

T4: El tumor se ha diseminado a los tejidos adyacentes a la próstata distintos a las vesículas seminales. Por ejemplo, el cáncer ha crecido al recto, la vejiga, el esfínter uretral o a la pared pélvica (PSA = 30.2 ± 5.5).

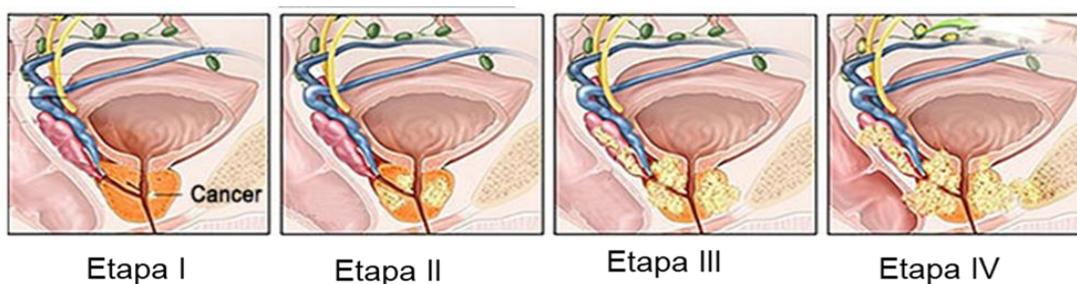


Figura 1.2.1. Estadios clínicos del CaP. La clasificación del CaP está basada en un sistema que valora la arquitectura histopatológica de los tumores prostáticos y se divide en cuatro etapas. Etapa I: tumor indetectable por tacto o imagen; Etapa II: Tumor detectable por tacto o imagen que se encuentra confinado en la próstata; Etapa III: Tumor externo a la próstata y posible invasión a vesículas seminales; Etapa IV: Diseminación del tumor en tejidos adyacentes distintos a las vesículas seminales. Imagen modificada de <https://www.moderncancerhospital.com.cn/cancer-staging/prostate-cancer-staging/>.

Tratamientos para el CaP

Actualmente se utilizan ocho tipos de tratamiento estándar para tratar a los pacientes con CaP dependiendo de su grado de malignidad (NCI 2021):

- **Vigilancia activa.** Consiste en monitorear de cerca la condición de un paciente sin administrar ningún tratamiento hasta que los signos o síntomas aparezcan o cambien. Se utiliza para encontrar los primeros signos de que la afección está empeorando.
- **Cirugía.** Existen diversos procedimientos quirúrgicos dependiendo de las características del tumor: la prostatectomía radical es un procedimiento quirúrgico para extirpar la próstata, el tejido circundante, las vesículas seminales y los ganglios linfáticos cercanos; la linfadenectomía pélvica se utiliza para remover los nódulos linfáticos en la pelvis. El tejido es analizado por un patólogo en el microscopio y si los nódulos contienen células cancerosas, entonces, la próstata no es removida y se recomienda otro tipo de tratamiento; la resección transuretral de la próstata sirve para remover tejido de la próstata utilizando un resectoscopio insertado a través de la uretra. Este procedimiento se utiliza para tratar la hipertrofia prostática benigna y en algunas ocasiones para mejorar los síntomas causados por el tumor antes de aplicar otro tipo de tratamiento.
- **Radioterapia.** Es un tipo de terapia que utiliza rayos X u otro tipo de radiación para matar a las células cancerosas o mantenerlas sin crecimiento. Existen diferentes técnicas para aplicar la radiación, por lo que las radioterapias se dividen en interna y externa. La radioterapia externa utiliza una máquina fuera del cuerpo del paciente que irradia el área del cuerpo con cáncer, por ejemplo, la radioterapia conformada tridimensional permite que la radiación se ajuste a la forma del tumor, lo que favorece una mayor radiación sobre el tumor y un menor daño a tejido sano. La radioterapia interna usa sustancias radioactivas que son colocadas directamente dentro o cerca del cáncer. En estadios tempranos del CaP se pueden colocar “semillas” radioactivas que son colocadas en la próstata utilizando agujas. Cuando el cáncer se encuentra esparcido, se puede utilizar radioterapia farmacéutica, en la que se usan sustancias radioactivas (Ej. radio 223) que son inyectadas en la vena y viajan a través del torrente sanguíneo.
- **Terapia hormonal.** Es un tratamiento que elimina las hormonas o bloquea su acción y detiene el crecimiento de las células cancerosas. En el CaP, las hormonas sexuales masculinas pueden hacer que crezca, por lo que se utilizan medicamentos, cirugía u otras hormonas para reducir la cantidad de hormonas masculinas o impedir que funcionen (Denmeade, 2002) (Fig.1.2.2). Esto se llama terapia de privación de andrógenos (ADT por sus siglas en inglés). La terapia hormonal para el CaP puede incluir lo siguiente: El acetato de abiraterona puede evitar que las células del CaP **produzcan andrógenos**. Se usa en hombres con CaP avanzado que no ha mejorado con otra terapia hormonal. También se usa en hombres con CaP de alto riesgo que ha mejorado con tratamientos que reducen los niveles hormonales. La **orquiectomía** es un procedimiento quirúrgico para extirpar uno o ambos testículos, la principal fuente

de hormonas masculinas, como la testosterona, para disminuir la cantidad de hormona que se produce. Los **estrógenos** (hormonas que promueven las características sexuales femeninas) pueden evitar que los testículos produzcan testosterona. Sin embargo, en la actualidad, los estrógenos rara vez se usan en el tratamiento del CaP debido al riesgo de efectos secundarios graves. Los **agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante** pueden evitar que los testículos produzcan testosterona. Los **antiandrógenos** pueden bloquear la acción de los andrógenos (Ej. Flutamida). En las fases avanzadas de la enfermedad, las células tumorales se hacen insensibles a la ADT, dando lugar a un tumor refractario de hormonas (Abateshen,2000).

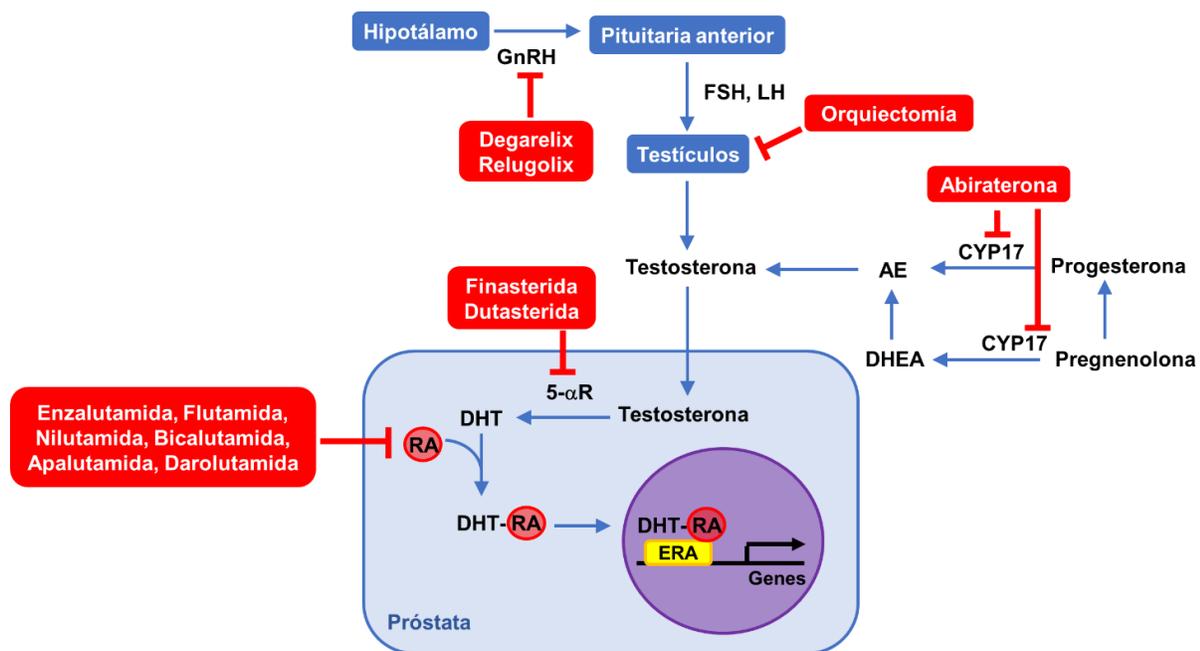


Figura 1.2.2. Terapia hormonal en el tratamiento de CaP. La hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) es secretada por el hipotálamo y estimula la liberación de las hormonas gonadotrópicas como son la hormona luteinizante (HL) y la hormona foliculo estimulante (FSH), las cuales a su vez estimulan la producción de testosterona en los testículos. La testosterona ingresa a la próstata donde es metabolizada por la testosterona 5- α -reductasa (5- α R) y produce dihidrotestosterona (DHT) el cuál se une al receptor de andrógenos (RA) formando un complejo (DHT-RA). El complejo DHT-RA se une a regiones promotoras de genes conocidas como elementos de respuesta a andrógenos (ERA). Los genes estimulados por la DHT son indispensables para el crecimiento tumoral en algunos estadios del CaP. La terapia hormonal en CaP consiste en inhibir alguno de los procesos involucrados en la síntesis de DHT o en su unión con el receptor de andrógenos.

2. ANTECEDENTES

2.1. Estrés oxidante y ROS

El estrés oxidante es un proceso donde la velocidad de producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) es mayor a la velocidad de consumo de dichas especies, dando como resultado un incremento en la concentración de ROS (Fig. 2.1.1). Las principales especies reactivas de oxígeno son: oxígeno singlete ($^1\Delta O_2$), radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y radical hidroxilo (HO^{\bullet}). Estas especies reactivas pueden desencadenar diversos procesos citotóxicos y genotóxicos (Ej. formación de aductos en el DNA, peroxidación lipídica, modificación de proteínas, etc.), los cuales están presentes en diversas etapas de la etiología del CaP (Khandrika *et al.* 2009). A continuación, se presentan algunas propiedades químicas de las principales ROS.

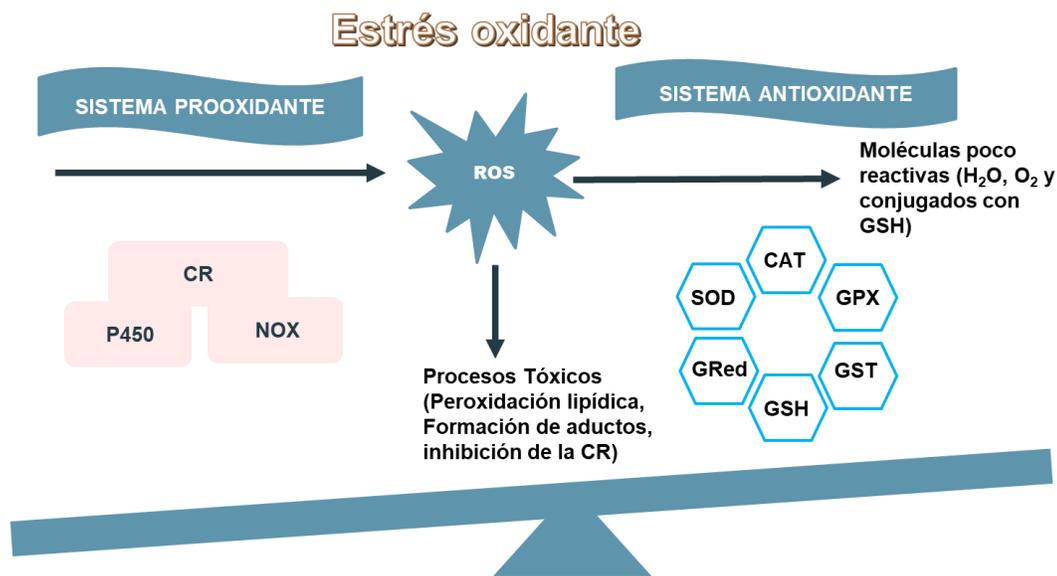


Figura 2.1.1. Estrés oxidante. Representación del balance que existe entre la producción de especies reactivas (ROS) y el sistema antioxidante celular. Si este balance se pierde, aumenta la concentración intracelular de las ROS y se pueden favorecer los procesos tóxicos (CAT: catalasa, GPX: Glutacion peroxidasa, GTS: glutación transferasa, GSH: glutación, GRed: Glutacion reductasa, SOD: superóxido dismutasa).

Especies reactivas de oxígeno

Los ROS son moléculas que contienen oxígeno, las cuáles poseen propiedades químicas diversas, por ejemplo, pueden ser radicales libres, iones, moléculas neutras, con diversos potenciales de oxidación, etc. A continuación, se expondrán algunas características químicas principales (Königsberg, 2008).

- Oxígeno singulete

El análisis de los orbitales moleculares del oxígeno, muestra que esta molécula posee dos electrones desapareados en su último nivel de energía (π^*) (Fig. 2.1.2.), haciendo que el oxígeno sea un biradical libre (molécula con dos electrones desapareados) y que posea un valor de $\text{spin}=1$ (Laing,1989). A este estado del oxígeno se le conoce como oxígeno triplete y se simboliza como $^3\Sigma\text{O}_2$. Para que el $^3\Sigma\text{O}_2$ participe en reacciones redox con otros átomos o moléculas tendría que aceptar de un reductor un par de electrones con el spin paralelo para que ocupen los espacios vacantes en los orbitales π^* del oxígeno. La mayoría de las moléculas orgánicas son diamagnéticas, es decir, poseen pares de electrones de spin opuesto. Por lo tanto, el oxígeno es incapaz de oxidar eficazmente biomoléculas a través de la aceptación de dos electrones (Fig. 2.1.2.) (Krumova *et al.* 2016).

La transferencia de energía al $^3\Sigma\text{O}_2$ puede llevar a la formación de dos estados electrónicos más reactivos denominados como oxígeno singulete ($^1\Delta\text{O}_2$, $^1\Sigma\text{O}_2$) (Fig. 2.1.2). Ambos estados singuletes tienen pares de electrones con spin opuesto, por lo que ya no existe la restricción de spin, incrementando su capacidad de oxidar moléculas orgánicas (Fig. 2.1.2.) (Krumova *et al.* 2016). La diferencia entre los tipos de oxígeno singulete es que en $^1\Sigma\text{O}_2$ los electrones se encuentran en orbitales distintos y en $^1\Delta\text{O}_2$ los electrones se encuentran en el mismo orbital (Kearns 1971) (Fig. 2.1.2). El $^1\Sigma\text{O}_2$ decae rápidamente y se transforma en $^1\Delta\text{O}_2$ siendo esta última forma de oxígeno singulete la de mayor relevancia biológica (Kearns 1971, Halliwell 2015).

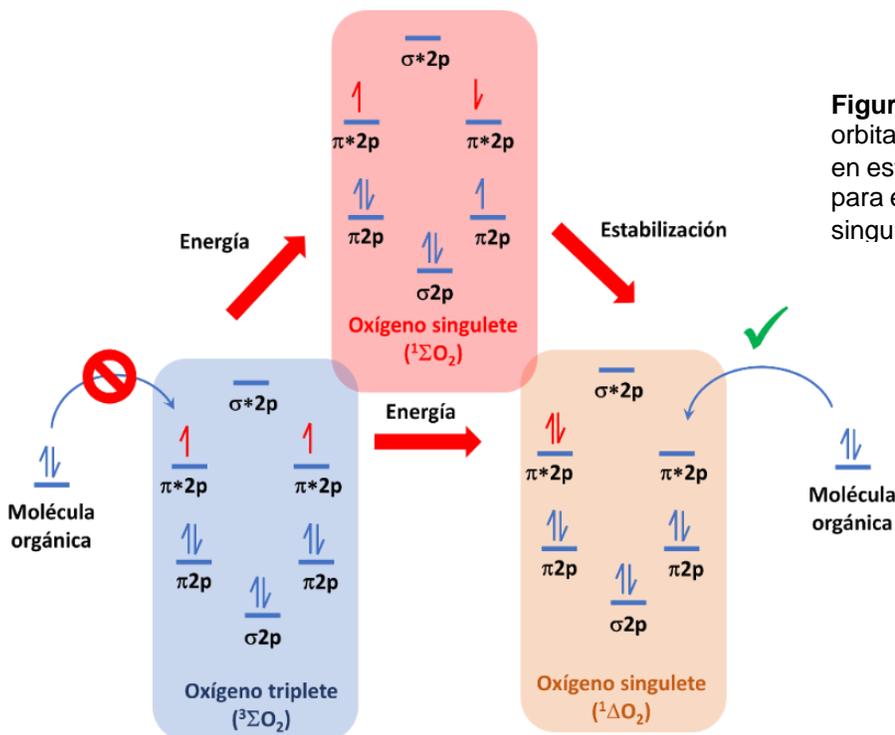


Figura 2.1.2 Diagramas de orbital molecular para el oxígeno en estado basal o triplete ($^3\Sigma\text{O}_2$) y para el estado excitado u oxígeno singulete ($^1\Delta\text{O}_2$).

El $^1\Delta\text{O}_2$ tiene un tiempo de vida media de 10^{-5}s (Sies *et al.* 1993) y es un oxidante muy potente que puede oxidar componentes celulares como lípidos, proteínas, y ácidos nucleicos. El $^1\Delta\text{O}_2$ puede difundir a través de membranas celulares llegando incluso a compartimentos extracelulares (Manda *et al.* 2009). La mayoría del $^1\Delta\text{O}_2$ en los sistemas biológicos es generado en reacciones de fotosensibilización donde un sensibilizador apropiado es excitado electrónicamente y luego transfiere esa energía al oxígeno (Sies, 1986). El oxígeno singlete también puede ser formado en las reacciones llevadas a cabo por el sistema del citocromo p450 (P450) (Hrycay *et al.* 2015).

- Radical anión superóxido

El $^3\Sigma\text{O}_2$ puede reaccionar con especies químicas que tengan electrones desapareados, por ejemplo, radicales libres (ej. semiquinona, flavinas) o los metales de transición como el hierro encontrado en los centros hierro-azufre [Fe-S]. La reducción de un electrón del $^3\Sigma\text{O}_2$ da como resultado la formación del anión radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) (Krumova *et al.* 2016). El $\text{O}_2^{\bullet-}$ es considerado como la ROS primaria y al interactuar con diferentes moléculas o sistemas enzimáticos, puede dar lugar a la formación de otras ROS denominadas secundarias (ej. H_2O_2 y HO^\bullet) (Valko *et al.* 2007).

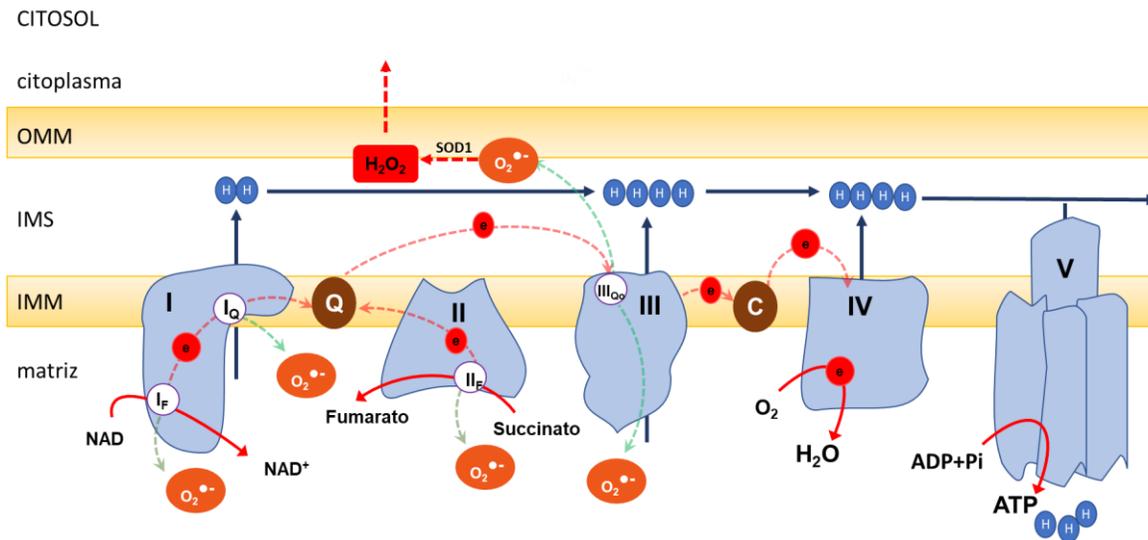


Fig. 2.1.3 Generación de radical super óxido en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Los electrones derivados de sustratos oxidables pasan a través de los complejos CI/III/IV en un proceso exergónico que conduce al bombeo de protones por parte de los complejos CI, CIII y CIV en el IMM. La energía en el gradiente de protones conduce a la síntesis de ATP. Los sitios de producción de superóxido incluyen los sitios I_F y I_Q en CI, el sitio II_F en CII y el sitio III_{Q0} en CIII, por el sitio III_{Q0} puede convertirse en H₂O₂ en una reacción catalizada por SOD1, el O₂ puede difundirse en el citoplasma. Las flechas rojas representan reacciones del sustrato. Las flechas azules muestran el circuito de protones a través del IMM. En azul claro, los complejos como I, II, III, IV, V, respectivamente. Q ubiquinona; C citocromo c; IMM membrana mitocondrial interna; IMS, espacio intermembrana; OMM, membrana mitocondrial externa. Círculos rojos son los electrones. Círculos azules son los protones. Imagen modificada de Zhao *et al.* 2019.

La producción de $O_2^{\bullet-}$ ocurre mayoritariamente en la cadena de transporte de electrones en la mitocondria. Se estima que, en condiciones normales, entre el 0.2 y el 2% de los electrones que son transportados en la cadena mitocondrial no siguen la transferencia normal e interactúan con el oxígeno para producir $O_2^{\bullet-}$. Un total de 7 sitios distribuidos en los complejos mitocondriales han sido identificados como productores de $O_2^{\bullet-}$: los sitios I_F y I_Q en el complejo I; el sitio III_{Q0} en el complejo III; y los sitios II_F , G_Q , E_F y D_Q están ligados a las deshidrogenasas Q-dependientes en la poza de quinona hidroquinona (QH_2/Q) (Zhao *et al.* 2019).

- Peróxido de hidrógeno

El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es una molécula neutra con todos sus electrones apareados, por lo que no es un radical libre. Esta especie reactiva de oxígeno es relativamente estable ($t_{1/2}$ celular ~ 1 ms, concentración intracelular $\sim 10^{-7}M$) y no es un agente oxidante muy potente (D'Autréaux *et al.* 2007). El H_2O_2 puede formarse por la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ ($2 O_2^{\bullet-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2$), esta reacción puede ser catalizada por alguna isoforma de superóxido dismutasa (SOD), las cuales son consideradas enzimas altamente eficientes (Stroppolo *et al.* 2001).

El H_2O_2 posee un momento dipolar permanente (μ) de 2.26×10^{-18} unidades electrostáticas, muy similar al momento dipolar del agua ($\mu = 1.85 \times 10^{-18}$ unidades electrostáticas) (Bienert *et al.* 2007). Por lo tanto, la difusión pasiva del H_2O_2 a través de la membrana lipídica está limitada como lo es para el agua. La evidencia sugiere que es la acuaporina 8 (AQP8) la encargada de facilitar el transporte de H_2O_2 a través de las membranas (Bienert *et al.* 2007).

El H_2O_2 consigue mediar la oxidación de residuos de cisteína (Cys), los cuales alcanzan estar presentes en regiones relevantes para la función de algunas proteínas, por lo que se ha propuesto que el H_2O_2 consigue actuar como segundo mensajero (Lennicke *et al.* 2015). El primer paso de la oxidación de tioles mediada por H_2O_2 es la formación de ácido sulfénico (R-SOH), el cuál consigue reaccionar con tioles para formar enlaces disulfuro inter o intramoleculares. Estas formas oxidadas de los tioles pueden ser reducidas por sistemas antioxidantes basados en glutatión (GSH) y/o tiorredoxinas (Trx). Al aumentar la concentración de H_2O_2 , los ácidos sulfénicos se lograrían oxidar en ácido sulfínico (-SO₂H) y sulfónico (-SO₃H). Por lo general, estos productos de oxidación se consideran irreversibles y algunas de estas especies pueden estar ligadas a la toxicidad mediada por H_2O_2 (Lennicke *et al.* 2015) (Fig. 2.1.4).

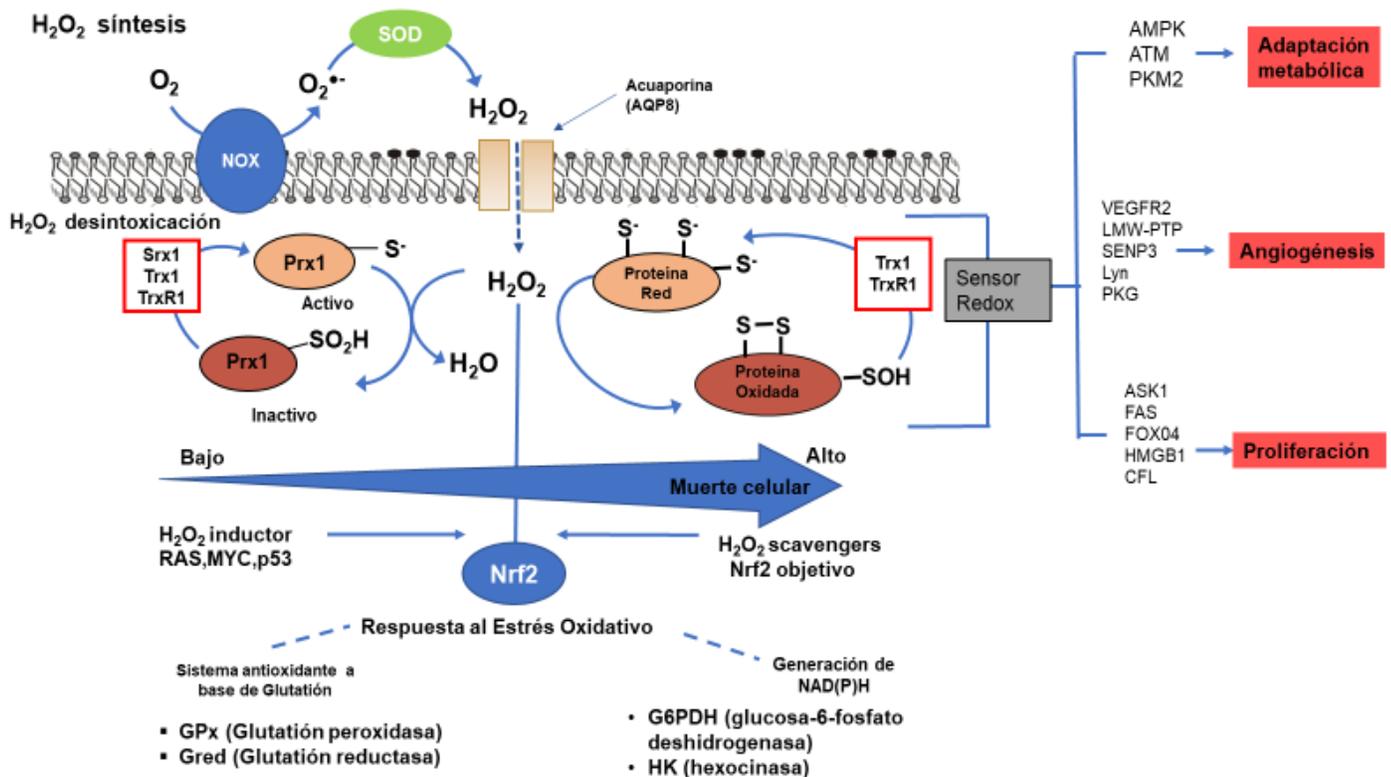


Figura 2.1.4. Interacción entre la generación de H₂O₂ fisiológica/fisiopatológica y el mecanismo de respuesta antioxidante. El H₂O₂ se produce en respuesta a factores de crecimiento por el sistema NOX/SOD y entra en las células a través de difusión simple a través de AQP, respectivamente, lo que lleva a un aumento de niveles intracelulares de H₂O₂. Las peroxiredoxinas (Prx) actúan como sensores redox altamente activos y forman parte de uno de los principales sistemas de desintoxicación de H₂O₂. El sistema Nrf2 se activa en respuesta a un aumento de los niveles de H₂O₂ que conduce a la respuesta antioxidante. Componentes de los sistemas antioxidantes implicados en el desarrollo de tumores. Las células cancerosas se caracterizan por tener altos niveles de ROS (H₂O₂). Este tipo de células inducen la expresión de enzimas antioxidantes mediante la activación del factor de transcripción Nrf2. Mantienen la capacidad de promover la supervivencia, diferenciación y proliferación celular al someterse a procesos de adaptación metabólica, confiando así en la regulación redox de los sensores redox relacionados con el cáncer. Imagen modificada de Lennicke, 2015.

- Radical hidroxilo

El radical hidroxilo (HO•) es el oxidante más potente entre las ROS, con un potencial E°(HO•/H₂O) = 2.34V (D'Autréaux *et al.* 2007), por lo que puede reaccionar con virtualmente todas las biomoléculas. La reacción del HO• con lípidos puede iniciar la peroxidación lipídica (Tejero *et al.* 2007), la reacción con las bases nitrogenadas del DNA puede dar lugar a la formación de aductos y producir mutaciones (Wells *et al.* 2009), también puede oxidar aminoácidos y afectar la función de proteínas (Berlett *et al.* 1997), etc. (Fig. 2.1.5). Las reacciones del HO• con la mayoría de biomoléculas tienen una

energía de activación cercana a cero, por lo que reaccionan rápidamente, haciendo que el tiempo de vida media de estos radicales sea muy corta (10^{-9} s) (Sies 1993). La elevada reactividad de estos radicales libres provoca que reaccionen en sitios cercanos a su lugar de formación (Valko *et al.* 2007) y por lo tanto son incapaces de difundir a través de membranas.

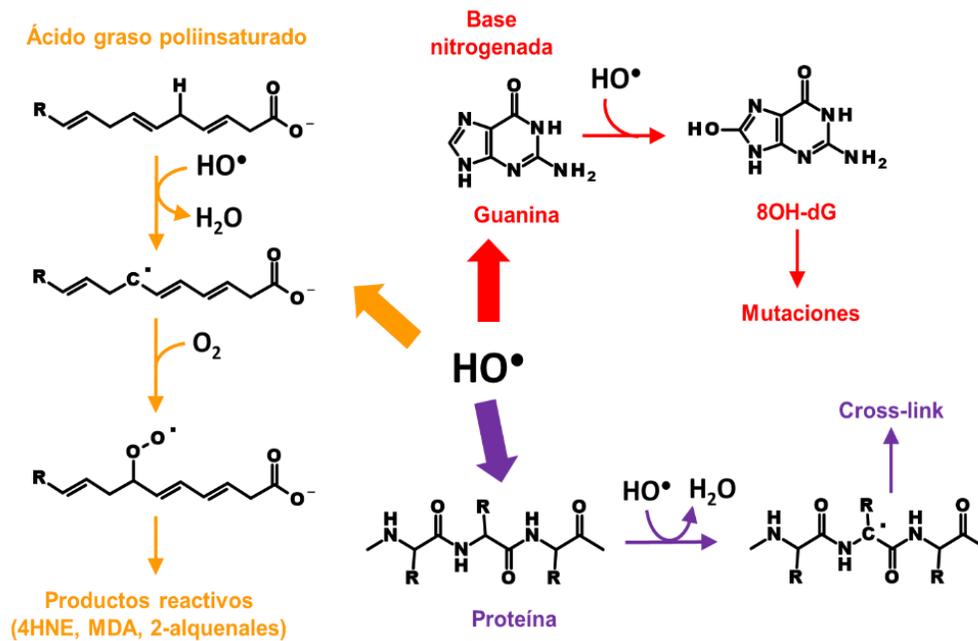


Figura 2.1.5. Reacciones con biomoléculas del radical hidroxilo. El HO^\bullet puede reaccionar con prácticamente todas las biomoléculas, incluyendo ácidos grasos poliinsaturados e iniciar la peroxidación lipídica; bases nitrogenadas e inducir eventos mutagénicos; proteínas y provocar modificaciones estructurales como entrecruzamientos (cross-link).

Existen dos reacciones principales para la producción de HO^\bullet *in vivo*: 1) la reacción de Fenton/Haber-Weiss (Fig. 2.1.6) (Valko *et al.* 2007), la cual es catalizada por metales de transición y produce HO^\bullet a partir de H_2O_2 y $\text{O}_2^{\bullet-}$; 2) la descomposición del ácido peroxinitroso (ONOOH) (Radi, 2018), la cuál es una especie reactiva de nitrógeno y oxígeno que se forma por la reacción entre el radical superóxido y el óxido nítrico (Fig. 2.1.7).

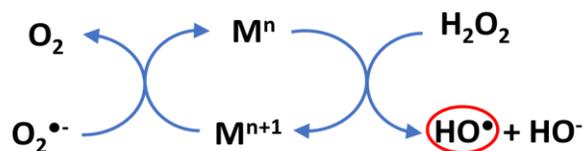


Figura 2.1.6 Reacción de Fenton/Haber-Weiss. El ciclo comienza con la transferencia de un electrón del $\text{O}_2^{\bullet-}$ a un metal de transición (M^{n+1}) (Ej. Fe, Cu^{2+}) lo cual provoca la reducción del metal (M^n). El metal reducido puede transferir un electrón al peróxido de hidrógeno, dando lugar a la formación de radical hidroxilo (HO^\bullet) y anión hidroxilo (HO^-).

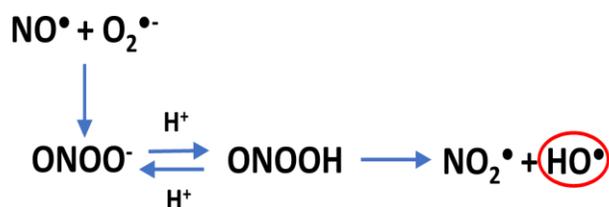


Figura 2.1.7. Producción de HO• a partir de ácido peroxinitroso (ONOOH). El óxido nítrico (NO•) y el radical superóxido (O₂•⁻) pueden reaccionar para dar lugar a la formación de peroxinitrito (ONOO⁻), el cual puede protonarse (pKa = 6.8) y formar ONOOH. Finalmente, el ONOOH puede descomponerse en los radicales hidroxilos (HO•) y dióxido de nitrógeno (NO₂•).

2.2. Defensas antioxidantes

Una vez que se forman las ROS existen mecanismos enzimáticos y no-enzimáticos que le permiten a la célula contender contra el estrés oxidante. A continuación, se exponen los principales mecanismos enzimáticos involucrados en la desintoxicación de las ROS.

- Superóxido dismutasa (SOD)

El superóxido dismutasa (SOD) es la primera línea de defensa contra las ROS, catalizando la dismutación del radical superóxido (O₂•⁻) en peróxido de hidrógeno y oxígeno (Fig. 2.2.1). Estas enzimas son de las más rápidas conocidas ($k = 1.5 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$), por lo que sólo están limitadas por la difusión de su sustrato (Van Holde, 2002).

Hasta el momento se han caracterizado tres distintas isoformas de SOD en mamíferos las cuáles se diferencian entre sí por el tipo de metal que contienen en su sitio activo y por su localización celular (Zelko *et al* 2002). SOD 1 (ZnCu-SOD) es un homodímero que tiene un peso molecular de 32KDa, posee en su sitio catalítico un átomo de Zn²⁺ y uno de Cu²⁺, en mamíferos se encuentra distribuida en el citoplasma, núcleo y lisosomas. SOD 2 (Mn-SOD) es un homotetrámero (P.M. 92KDa) que utiliza al manganeso en su sitio activo y se encuentra localizado en la matriz mitocondrial (Halliwell y Gutteridge, 2015). SOD 3 (EC-SOD) es una enzima tetramérica (135KDa) que contiene cobre y zinc en su sitio catalítico y que es una enzima extracelular que ha sido detectada en plasma, linfa, ascitis y fluido cerebro espinal (Marklund *et al.* 1982) (Fig. 2.2.2).

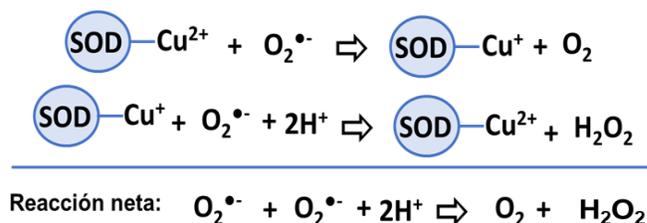


Figura 2.2.1. Dismutación del radical superóxido por acción de la enzima superóxido dismutasa (SOD) su producto es H₂O₂. En la figura se representa a las SOD que contienen al cobre como grupo catalítico, sin embargo, el mecanismo es similar con el manganeso en un estado de oxidación inicial de Mn³⁺ de la SOD2.

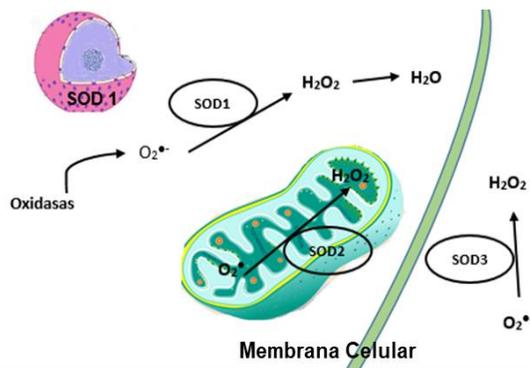


Figura 2.2.2 Distribución celular de las diferentes isoformas de SOD en humanos

- Catalasa

La catalasa es una hemoproteína que cataliza la dismutación del peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en O₂ y agua (Fig. 2.2.3), para ello emplean dos moléculas de H₂O₂ una como agente reductor y otra como oxidante (Halliwell y Gutteridge, 2015).

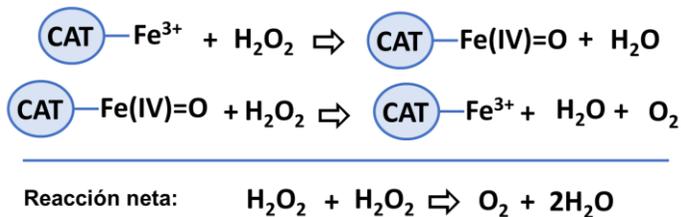


Figura 2.2.3. Dismutación del peróxido de hidrógeno por acción de la catalasa (CAT). El complejo representado por Fe (IV)=O también es conocido como compuesto I.

La catalasa es una de las enzimas más rápidas que existen, una molécula de la enzima es capaz de catalizar la transformación de 1 x 10⁷ moléculas de sustrato por segundo, dada la afinidad por su sustrato se piensa que su función primordial es eliminar las altas concentraciones de H₂O₂; La enzima se presenta en forma de homotetrámero y se localiza en los peroxisomas, casi todas las catalasas tienen una masa de 50 a 65 kDa (Brioukhanov, 2004).

- Glutatión peroxidasa

El glutatión peroxidasa (GPx) son una familia de enzimas (GPx-1 a 8) capaces de reducir peróxidos a expensas de la oxidación de glutatión (GSH) (Fig. 2.2.4). Estas enzimas se encuentran distribuidas en diversos compartimentos celulares, por ejemplo, en citosol, núcleo, peroxisomas (GPx-1, GPx-4), retículo endoplásmico (GPx-7 y 8) y espacios extracelulares (GPx-3). También existe expresión especializada en algunos tejidos, por ejemplo, GPx-2 se encuentra altamente expresada en tracto gastrointestinal, GPx-5 se encuentra expresada en el epidídimo y GPx-6 se expresa en embriones y en el epitelio olfatorio en adultos. El sitio catalítico de las GPx contiene selenocisteína (con excepción de GPx-7 y 8 que contienen cisteína), el cuál es un aminoácido de cisteína que en lugar de azufre contiene selenio (Se).

La presencia de Se provoca una disminución en el pKa del aminoácido (pKa SH =8.3, pKa=5.2 para SeH), por lo que la forma desprotonada (Se⁻) se encuentra favorecida (Halliwell y Gutteridge, 2015).

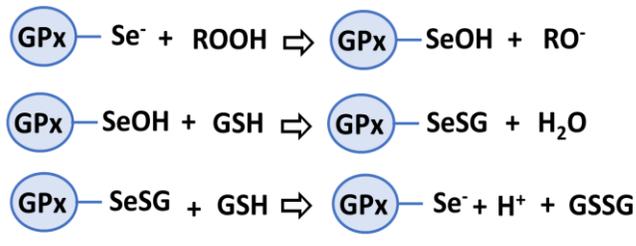


Figura 2.2.4 Reducción de peróxidos por acción del glutatión peroxidasas (GPx). La selenocisteína (representado como Se) es el aminoácido catalítico de las GPx



- Glutatión reductasa

El glutatión reductasa (GRed) es una enzima homodimérica que pesa 51 KDa la cual cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSG) a glutatión reducido (GSH). La actividad de esta enzima mantiene la proporción GSH/GSSG elevada (aprox100:1). Esta enzima posee un grupo flavin adenina dinucleótido (FAD) como grupo prostético, el cuál toma electrones del NADPH y los transfiere a un puente disulfuro interno de la enzima. Los electrones de las cisteínas disociadas son transferidos a GSSG y lo reducen para formar 2GSH (Fig. 2.2.5) (Deponete, 2013)

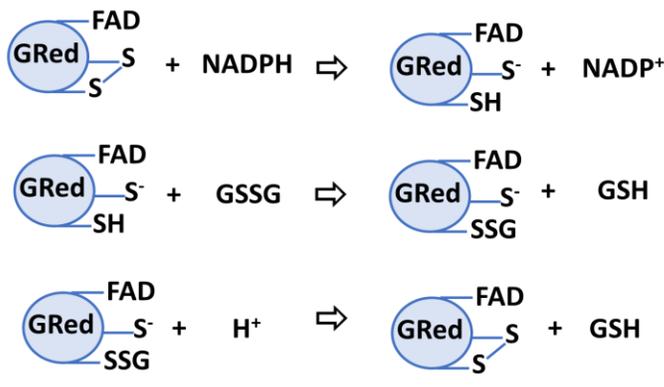
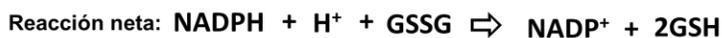


Figura 2.2.5 Reducción de glutatión disulfuro (GSSG) en glutatión (GSH) utilizando NADPH como donador de electrones por acción del glutatión reductasa (GRed)



- Glutatión transferasa

El glutatión se encuentra involucrado en la desintoxicación de compuestos electrofílicos, por ejemplo, xenobióticos o productos de la peroxidación lipídica como el 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE). El glutatión S-transferasas (GST) son una superfamilia de enzimas que catalizan la unión de glutatión con una molécula que posee un centro electrofílico, lo cual

tiene dos efectos, por un lado, se anula la reactividad del centro electrofílico y, por otro lado, lo hace más hidrofóbico con respecto de la molécula original y favorece la secreción de la célula (Fig. 2.2.6).

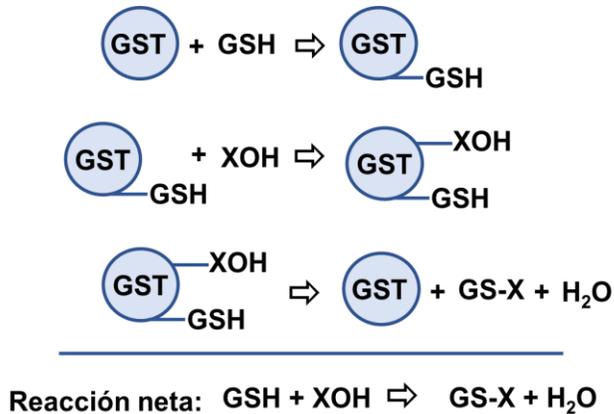


Figura 2.2.6. La transferencia de glutatión (GSH) a una molécula con un centro electrofílico (XOH) catalizada por glutatión S-transferasa (GST) da como resultado la formación del complejo entre glutatión y la molécula (GS-X).

2.3. Estrés oxidante y la etiología del CaP

Diversos estudios (Tabla 2.2.1.) sugieren que el estrés oxidante juega un papel importante en la iniciación y progresión del CaP al regular biomoléculas como DNA, factores de transcripción y reguladores del ciclo celular. Otros estudios han demostrado que algunos antioxidantes pueden jugar un papel en la prevención del CaP. A continuación, se expondrán algunos hallazgos sobre la relación que existe entre las ROS y la etiología del CaP.

- Estrés oxidante en las primeras etapas del CaP

Estudios poblacionales han demostrado un incremento en la oxidación de las bases del DNA (8-OHdG) (ver figura 2.1.5) en pacientes con CaP comparado con personas normales (Miyake *et al.* 2004) o con pacientes con hiperplasia benigna (Kanwal *et al.* 2014). Estos resultados sugieren que el daño al DNA provocado por las ROS podría ser importante en las primeras etapas del desarrollo del CaP.

- Efecto del estrés oxidante sobre el fenotipo agresivo en CaP

Las ROS han demostrado jugar un papel importante al estimular características de un fenotipo agresivo como son incrementar los procesos de proliferación y migración. Estudios llevados a cabo en una línea celular de CaP sensible a hormonas (LNCaP), demostraron que tanto la proliferación como la migración se incrementaron (2 veces) por exposición a concentraciones bajas (1-10 μ M) de H₂O₂. El mecanismo propuesto involucra la inducción de la transcripción del gen del péptido regulatorio afín a la heparina (HARP por sus siglas en inglés), a través de la proteína-1 activadora (AP-1 por sus siglas en inglés) (Polytarchou *et al.* 2005, Hatziapostolou *et al.* 2006) (Fig. 2.3.1).

El fenotipo agresivo en diferentes líneas celulares de CaP es dependiente de la concentración de ROS que cada línea puede alcanzar. En un estudio con líneas celulares de CaP con diferente grado de malignidad (medido como capacidad de migración/invasión) se encontró una correlación entre los niveles de ROS y la malignidad de las líneas celulares (Kumar *et al.* 2008). También se descubrió que al utilizar un inhibidor (difeniliodonio) de las NADPH oxidasas (NOX), disminuían las ROS y los biomarcadores de malignidad, por lo que los autores concluyeron que las NOX son la fuente de ROS en las líneas de CaP y las sugieren como un blanco terapéutico (Fig 2.2.2). La inhibición de las NOX en modelos animales también ha demostrado disminuir el número de lesiones prostáticas, apoyando a la hipótesis de que las ROS juegan un papel primordial en el desarrollo de CaP y de que las NOX son en parte responsables de la producción de ROS (Suzuki *et al.* 2013) (Fig. 2.2.2).

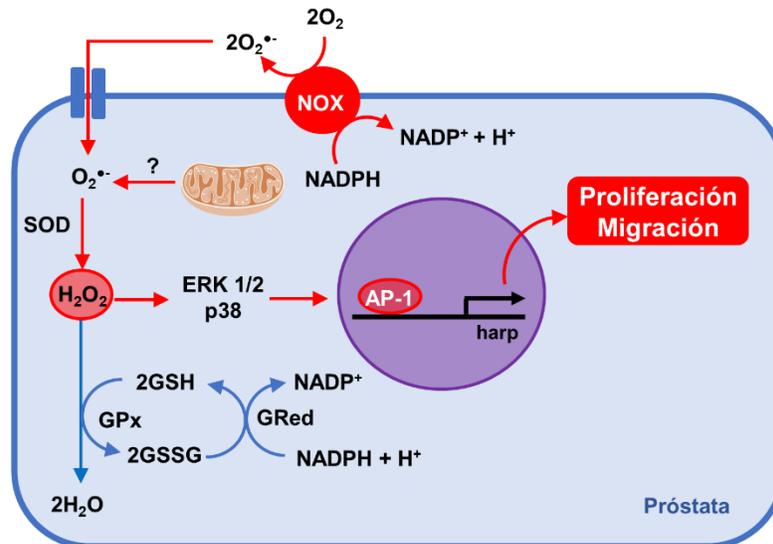


Figura 2.3.1. Papel de las ROS en la proliferación y migración en el CaP. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) juega un papel primordial en la proliferación y migración en CaP a través de la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK por sus siglas en inglés) como ERK 1/2 y p38, las cuales están involucradas en la transcripción del péptido regulador afín a la heparina (HARP) mediada por la proteína activadora-1 (AP-1). La concentración de H_2O_2 dependerá de dos factores: 1) la velocidad del proceso de producción a través de las NADPH oxidasas (NOX) o posiblemente debido a la actividad mitocondrial; 2) la velocidad de consumo de H_2O_2 por el sistema antioxidante.

- Balance prooxidante/antioxidante en CaP

Existen diferentes evidencias que sugieren que la exposición a DHT puede alterar el equilibrio prooxidante/antioxidante de la célula y desempeñar un papel importante en el proceso de carcinogénesis en la próstata (Khandrika *et al.* 2009). La administración crónica de DHT a ratas induce la expresión de citosinas proinflamatorias dentro de la próstata (Harris *et al.* 2000), además, se ha identificado que estos infiltrados inflamatorios son una fuente importante de producción de ROS y se ha sugerido que la lesión oxidante

incidental del epitelio de la próstata es la causa de la formación de atrofia inflamatoria proliferativa y progresivamente cáncer (Ho *et al.* 2004).

Además de la evidencia en líneas celulares, se han realizado diversos estudios poblacionales que predominantemente revelan un incremento en los biomarcadores de daño oxidante y en ocasiones una disminución de las defensas antioxidantes en CaP, lo cual apoya la hipótesis de que el estrés oxidante juega un papel en la etiología del CaP (Oh *et al.* 2016) (Tabla 2.3.1).

Tabla 2.3.1. Biomarcadores de estrés oxidante en estudios poblacionales

Número de pacientes	Grupo control	Biomarcador	Autor
55 varones con CaP	55 varones sanos	TBARS 40% ↑ (su) Carbonilación 10% ↑ (su) CAT 14% ↓ (sa) Vit.C 30% ↓ (sa) Vit. E 25% ↓ (sa)	Battisti <i>et al.</i> 2011
120 varones con CaP	50 varones sanos	LPO 40% ↑ (sa) GSH 60% ↓ (sa) Vit.C 50% ↓ (pl) Vit. E 80% ↓ (pl) SOD 75% ↓ (sa) CAT 60% ↓ (sa)	Akinloye <i>et al.</i> 2009
73 varones con CaP	23 varones sanos	TBARS 27% ↑ (er) GPx 25% ↓ (er) SOD 26% ↓ (er) CAT 0 (er) 8OHdG 0 (pl)	Arsova-Sarainovska <i>et al.</i> 2009
25 varones con CaP	24 varones sanos	TBARS 20% ↑ (er) GPx 20% ↓ (er) SOD 30% ↓ (er) CAT 0 (er)	Aydin <i>et al.</i> 2006
31 biopsias	Correlación con el puntaje de Gleason	Mn-SOD 0 Cu-ZnSOD 0 CAT 0	Baker <i>et al.</i> 1997

suero (su), sangre entera (sa), plasma (pl), lisado de eritrocitos (er)

2.4. HIF-1 α y malignidad

El crecimiento tumoral genera distintos microambientes, esto se debe a que, conforme aumenta el tamaño del tumor, se va alejando del suministro de oxígeno que aportan los vasos sanguíneos, provocando la generación de un microambiente hipóxico en una zona tumoral. Las células tumorales presentan mecanismos de adaptación que le permiten sobrevivir al microambiente hipóxico, siendo el sistema de HIF1 α el mecanismo de supervivencia a hipoxia más estudiado (Roy,2020)

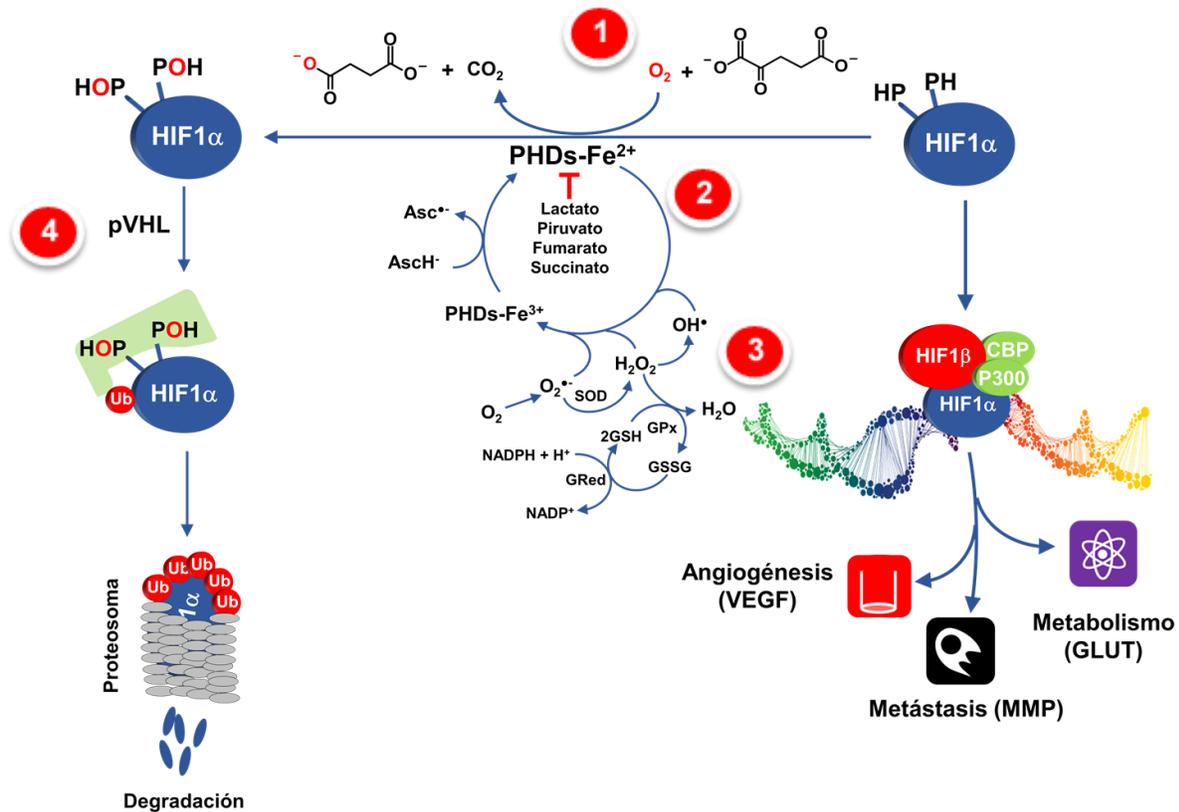


Figura 2.4.1 Mecanismos de estabilización de HIF1 α . 1) La actividad de las prolihidroxilasas es dependiente de la concentración de oxígeno, por lo que una disminución de O₂ puede disminuir la velocidad de hidroxilación de las prolinas 402 y 564 y evitar su degradación. 2) Compuestos monocarboxilados (lactato y piruvato) y dicarboxiados (fumarato y succinato) pueden inhibir reversiblemente la actividad de las PDHs al competir por su sustrato (α -cetoglutarato). 3) Las ROS son capaces de oxidar el átomo de hierro presente en las PDHs, inactivando a la enzima. 4) Las mutaciones en el gen de VHL pueden inducir cambios conformacionales en la enzima, lo que evita la ubiquitinación de HIF-1 α y por lo tanto su degradación.

El factor de HIF1 α es una proteína que consta de dos subunidades, α y β , las cuales se expresan constitutivamente, sin embargo, la velocidad de degradación de la subunidad alfa (HIF1 α) es muy alta, teniendo una vida media (en condiciones de normoxia) en la célula de 5min. El mecanismo de degradación de HIF1 α inicia con la hidroxilación de los residuos de prolina 402 y 564 por acción de las enzimas prolihidroxilasas (PDHs), posteriormente, la proteína von Hippel-Lindau (pVHL) reconoce a HIF1 α con las prolina hidroxiladas e inicia el proceso de ubiquitinación y degradación de la proteína (Salceda, 1997).

La actividad de las PDHs es dependiente de la concentración de oxígeno, por lo que, en condiciones hipóxicas, la velocidad de hidroxilación de HIF1 α disminuye y en consecuencia su velocidad de degradación, permitiendo una estabilización de HIF1 α .

La estabilización de HIF1 α permite su unión a la subunidad beta (HIF1 β) y su translocación al núcleo, donde se une a las regiones promotoras de genes blanco (5'-RCGTG-3', R= A o G) denominadas elementos de respuesta a hipoxia (HRE) (Ziello,2007).

La PDHs pueden disminuir su velocidad por otros mecanismos independientes de la concentración de oxígeno y por lo tanto estabilizar a HIF1 α aún en condiciones de normoxia. Algunos compuestos monocarboxilados (lactato y piruvato) y dicarboxilados (fumarato y succinato) pueden inhibir reversiblemente la actividad de las PDHs al competir por su sustrato (α -cetoglutarato) (Marín-Hernández *et al.* 2009). También, las ROS son capaces de oxidar el átomo de hierro presente en las PDHs, inactivando a la enzima, por lo que el estrés oxidante podría estabilizar a HIF1 α (Marín-Hernández *et al.* 2009).

Se han reconocido alrededor de 96 genes blanco del sistema HIF1 (Slemc *et al.* 2016), dentro de los que se encuentran el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y las metaloproteinasas de matriz (MMPs) (Fujiwara S. *et al.* 2009) además de diversas isoformas de enzimas que participan en la glucólisis (Rodríguez-Enríquez *et al.* 2019). Los cambios en la expresión de los genes de HIF-1 α desembocan en la progresión de la malignidad y en una reprogramación metabólica (Marín-Hernández *et al.* 2009).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El presente estudio está enfocado en dilucidar el mecanismo por el cual la línea celular de CaP PC3 (fenotipo maligno) tiene una mayor cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS), comparada con la línea celular de CaP DU145 (fenotipo poco maligno). Para lograr este objetivo, se caracterizará tanto la actividad mitocondrial (por ser un importante sitio de producción de ROS) como el sistema antioxidante en ambas líneas celulares. Los resultados obtenidos en este estudio ayudarán a entender cómo se desencadena el proceso de estrés oxidante en el CaP y su relación con la progresión de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

El sistema antioxidante del carcinoma metastásico de PC3 es menos eficiente que el carcinoma poco metastásico DU145.

5. OBJETIVOS

5.1 Generales

- ❖ Evaluar el sistema de producción de ROS así como el sistema antioxidante en las líneas celulares PC3 y DU145.

5.2 Particulares

- ❖ Caracterizar la velocidad de crecimiento de las líneas celulares PC3 y DU145.
- ❖ Evaluar las enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx, Gred, GST en PC3 y DU145 a nivel de proteína y de actividad enzimática.
- ❖ Determinar la velocidad de producción de ROS
- ❖ Caracterizar los niveles de HIF-1 α como un indicador de los posibles efectos de las ROS en la malignidad del CaP

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Líneas celulares

Líneas celulares de cáncer de próstata DU145 y PC3 fueron cultivadas en medio DMEM con 25 mM de glucosa y 10 % de suero fetal bovino a 37° C con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Se realizó un análisis de genotipificación en las dos líneas y se obtuvo un total de 12/12 alelos en PC3 y 18/19 alelos para DU145.

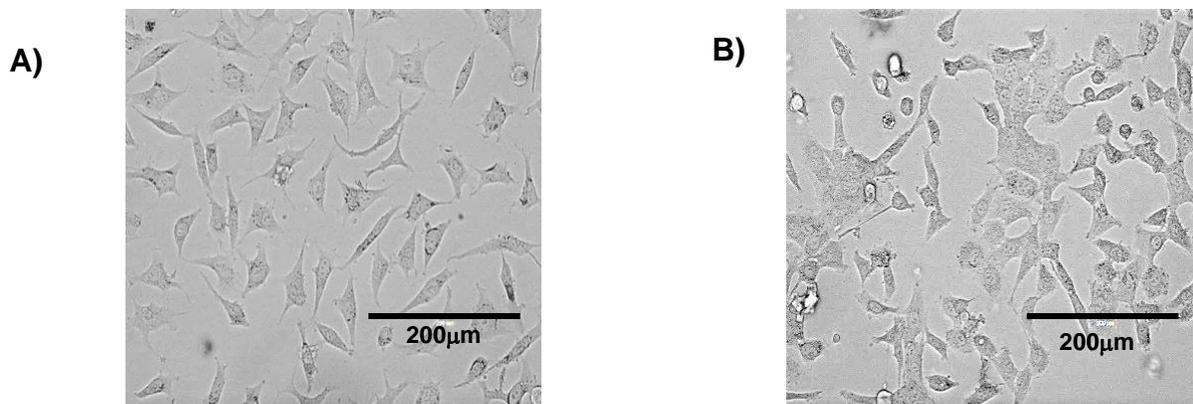


Figura 6.1.1. Líneas celulares PC3 (A) metastásica de hueso y DU145 (B) metastásica de cerebro (400X Microscopía óptica).

6.2. Velocidad de crecimiento de las líneas celulares

La velocidad de crecimiento de las líneas celulares (PC3 y DU145) se lleva a cabo en microplacas de 96 pozos, donde se sembraron 10×10^3 células por pozo en 100 μ L de medio DMEM y se incubaron por 6 a 8 días en 5% de CO₂ a 37° C. El conteo de las células se llevó a cabo cada 24 hrs, para realizar dicho conteo, las células fueron separadas de los pozos lavando con PBS (pH 7.2) y posteriormente incubando con una solución de tripsina/EDTA 0.25% a 37°C durante 3 a 5 min, posteriormente se agregó DMEM para inactivar la tripsina y azul de metileno para teñir las células muertas (Volumen final 100 μ L). Finalmente, las células se contaron en una cámara de Neubauer con microscopio invertido Carl Zeiss (Rodríguez-Enríquez, 2019).

6.3. Detección de proteínas por el método de Western Blot

El extracto celular utilizado para la técnica de Western Blot se obtuvo al homogeneizar (con ayuda de una jeringa de insulina) células de ambas líneas (cosechadas en fase logarítmica) en RIPA (PBS pH7.2, IGEPAL NP40 1%, SDS 0.1%, desoxicolato de sodio 0.05%) más 1mM de PMSF y una tableta de inhibidores de proteasas (Roche, Mannheim, Alemania). El homogenado celular es centrifugado a 10,000rpm durante 30 min a 4°C y se recupera el sobrenadante. Una vez que se determinó la concentración de proteína por el método de Lowry (Lowry, 1951)

Las muestras de proteína (50 μ g) se resuspenden en amortiguador de carga (Tris-HCl 0.5M pH 6.8, glicerol 10%, SDS 2%, azul de bromofenol 0.002%, β -mercaptoetanol 5%), se incuban en agua hirviendo durante 1min y se corren en geles de poliacrilamida (10%) a 150V, 74mA durante 140min. Las muestras en los geles son transferidas a membranas de PVDF utilizando una cámara de transferencia en semiseco (300mA, 15V, 15min). Las membranas se incuban toda la noche a 4°C con los respectivos anticuerpos monoclonales de catalasa y superóxido dismutasa y anticuerpos policlonales de rabbit: GPX-4 (santa Cruz, EUA) usando como control de carga α -Tubulina en dilución de 1:1500 y 1:2000; las membranas se lavaron durante una hora (con cambios dependiendo del anticuerpo de 10 a 15 min) con TBS 1x/Tween -20 y se incubaron con los anticuerpos secundarios correspondientes a temperatura ambiente y en agitación suave. Al termino se adicionó 500 μ L de la solución de quimioluminiscencia (GE Healthcar, EUA) se reveló utilizando papel fotográfico (Carestream, US). Las bandas obtenidas se analizan densitométricamente utilizando el programa Scionimage para Windows (Gallardo-Pérez *et al*, 2017).

6.4. Cuantificación de ROS en líneas celulares PC3 y DU145.

La velocidad de producción de ROS en células intactas se lleva a cabo utilizando al dihidroetidio (DHE) como sonda. El DHE es un compuesto que al reaccionar con ROS (principalmente O₂^{•-}) forma un compuesto que al intercalarse con el ADN emite una fluorescencia muy intensa (Ex 518nm, Em 606nm). El ensayo se lleva a cabo en micro

placas de 96 pozos, donde se siembran 20×10^3 células y se dejan para que se adhieran durante 24hrs, posteriormente se retira el medio y se sustituye por medio nuevo con $25 \mu\text{M}$ de DHE. El desarrollo de la fluorescencia es registrado durante 1hr en un lector de micro placas (Varioskanlux, Thermo Scientific).

6.5. Sistema enzimático antioxidante.

Actividad total de SOD

El ensayo de actividad de SOD requiere del sistema de Xantina-Xantina Oxidasa para producir $\text{O}_2^{\bullet-}$, los cuales son capaces de reducir un compuesto tetrazolio que es muy soluble en agua (WST-1). La mezcla de reacción contiene KME pH 7 (KCl 120 mM; MOPS 20 mM; EGTA 0.5 mM), WST-1 0.1 mM, Xantina 0.2 mM, catalasa (1U/mL), Tritón X-100 al 0.02% y lisado celular (proteína 0.125mg) y se registra la absorbancia a 438nm a 37°C durante 5 minutos para comprobar la reducción espuria del WST-1. La reacción se inicia mediante la adición de Xantina oxidasa (XO, 8 mU/ml). La reducción máxima de WST-1 (100%) se obtiene reemplazando la muestra celular con agua destilada en el tubo de reacción. La cantidad de proteína que inhibe la reducción de WST-1 en un 50% se definió como una unidad de actividad SOD (Rodríguez-Enríquez, 2019).

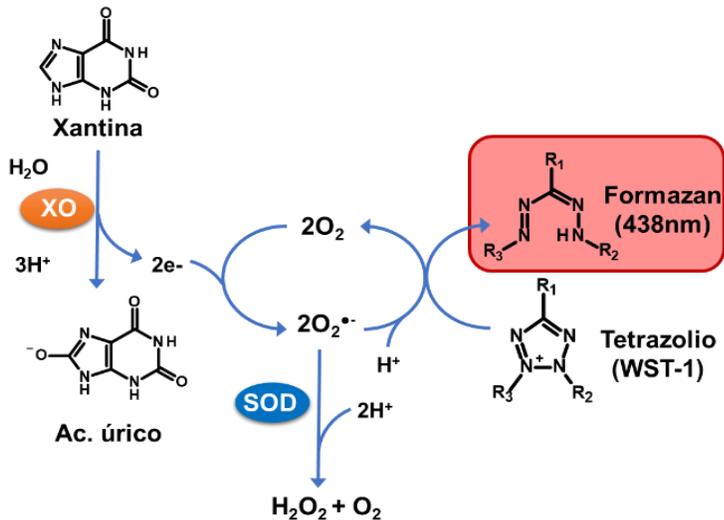


Figura 6.5.1 La enzima SOD se puede determinar mediante un método colorimétrico en el cual se monitorea la formación SOD de forma indirecta mediante la reducción de un grupo tetrazolio por acción de $\text{O}_2^{\bullet-}$ para producir un formazan que absorbe la luz a 438nm . Cuando en la mezcla de reacción hay actividad de SOD, entonces disminuye la tasa de producción del formazan.

Actividad de catalasa

El ensayo de catalasa (CAT), se basa en registrar la descomposición enzimática de H_2O_2 (Rodríguez-Enríquez, 2019). La mezcla de reacción contiene KME pH 7, H_2O_2 10 mM, 0,02% de tritón X-100 y lisado celular (0,125 mg de proteína) y 37°C . La reacción se inicia mediante la adición del homogenado celular y se registra el cambio de absorbancia a 240nm durante al menos 3min (en celdas de cuarzo). En estas condiciones, la

descomposición de H_2O_2 por CAT contenida en las muestras sigue una cinética de primer orden dada por la ecuación $k = 2.3 / \Delta t \log (A_1/A_2)$, donde k es la constante de velocidad de reacción de primer orden (min^{-1}), Δt ($t_2 - t_1$) es el intervalo de tiempo medido, y A_1/A_2 es la absorbancia en t_1 y t_2 , respectivamente. Los resultados se expresaron como ($\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$).



Figura 6.5.2 Actividad de catalasa actúa sobre el peróxido de hidrógeno (agua oxigenada) descomponiéndolo en agua y oxígeno.

Actividad de Glutación reductasa (GRed)

El ensayo de actividad de GRed se basa en el registro de la tasa de oxidación del NADPH dependiente de GSSG. El ensayo se realiza en amortiguador KME pH 7 a 37°C , en presencia de NADPH 0,15 mM, Tritón X-100 al 0,02% y lisado celular (0,06-0,15 mg de proteína/mL). La reacción se inicia agregando 1 mM de GSSG (Rodríguez-Enríquez, 2019).

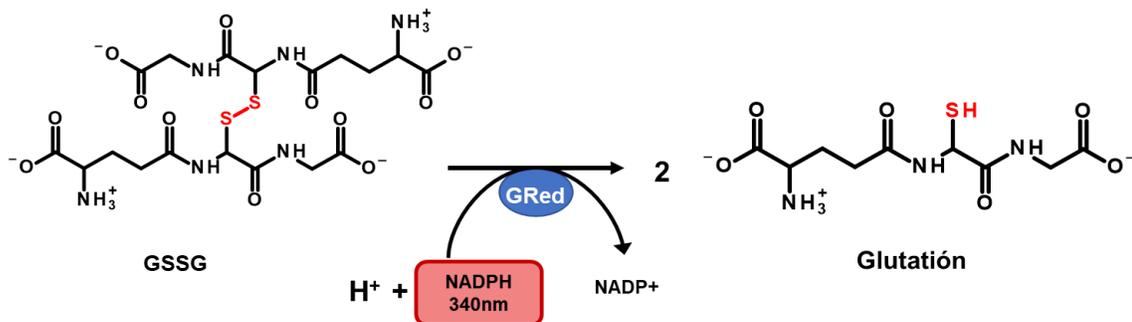


Figura 6.5.3 La actividad de glutación reductasa (GRed) se midió a través de la desaparición del NADPH a 340 nm y se expresó como mU de NADPH oxidado por minuto por mg de proteína.

Actividad de Glutación Peroxidasa (GPx)

La actividad de GPx se determina mediante una reacción acoplada con GRed. La reacción se realiza en amortiguador KME pH 7 a 37°C . en presencia de GRed comercial (0.5-1U/mL), Tritón X-100 al 0,02%, GSH 30 mM y NADPH 0,15 mM Se resta la reacción espuria no enzimática entre el peróxido, GSH y NADH, se añade 1 mM de t-BHP a la mezcla antes de la adición de proteína. Una vez que se registra la velocidad de la reacción espuria (20-30 s), se añade el lisado celular (0,05-0,15 mg de proteína/ml) para comenzar la reacción (Rodríguez-Enríquez, 2019).

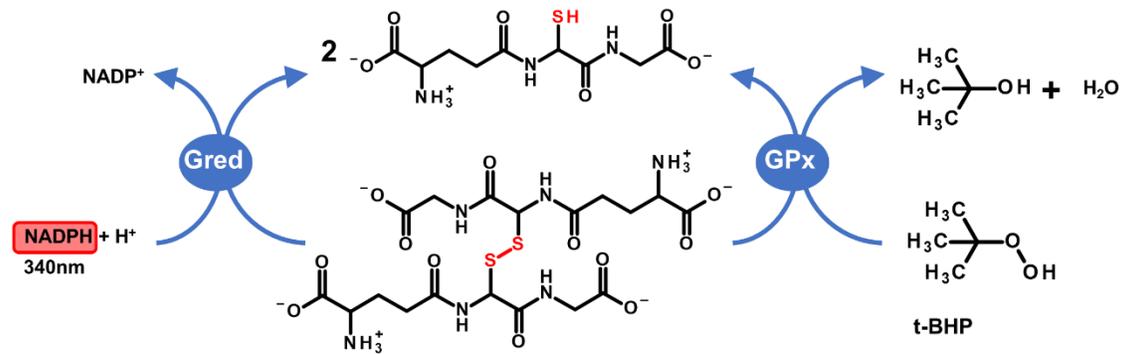


Figura 6.5.4. La actividad del glutatión peroxidasa (GPx) se midió indirectamente monitoreando el decremento continuo de NADPH, el cual se utiliza para la reducción de GSSG (reacción catalizada por Gred), que es un producto de la reacción de reducción de peróxidos catalizada por GPx.

Actividad de Glutatión-S-Transferasa (GST)

La actividad de glutatión-S- transferasa (GST) se determina mediante el registro de la tasa de producción de un conjugado de glutatión (GS-DNCB $\epsilon^{340} = 9.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) con 2,4-dinitroclorobenceno (DNCB). La reacción se lleva a cabo en un amortiguador de Imidazol 50mM a pH 6.5, 1 mM DNCB (2,4-dinitrocloro benceno), 1 mM GSH y 0.02% Tritón X-100 a 37 ° C. La reacción se inicia mediante la adición de lisado celular (0.06–0.15 mg proteína). La reacción no enzimática se resta de la reacción dependiente de la presencia de GST (Rodríguez-Enríquez, 2019).

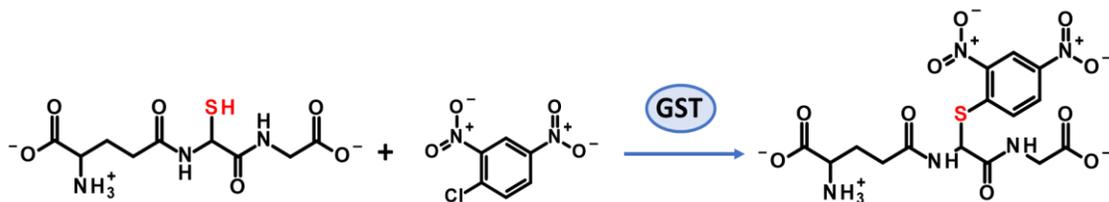
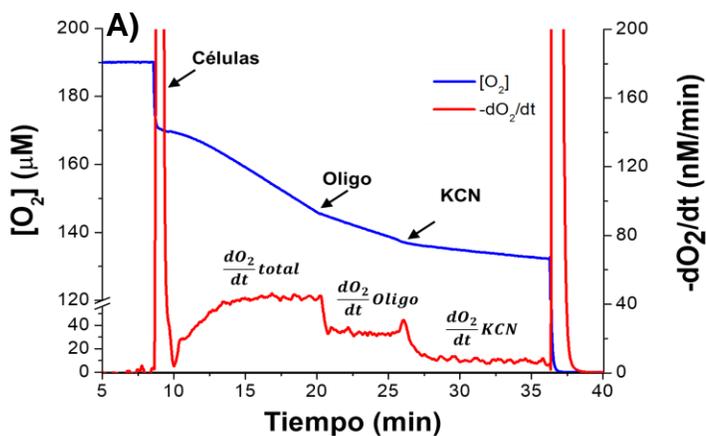


Figura 6.5.5. Para medir la actividad de la GST se utilizó un complejo tioéter glutatión (GSH) y dinitrobenzeno (DNCB) y cuando reacciona forma un compuesto arilado el cual se puede leer a 340 nm.

6.6 Fosforilación oxidativa

La Fosforilación oxidativa (OxPhos) fue medida utilizando un equipo de respirometría de alta resolución (Oxygraph-2k, Oroboros), este equipo posee un electrodo tipo Clark que permite determinar la concentración de oxígeno presente en la cámara de medición. La muestra de células intactas de PC3 o DU145 (1mg/mL de proteína total) se coloca en la cámara del Oroboros en 2mL de amortiguador Ringer-Krebs saturado en oxígeno. La velocidad de consumo de oxígeno es registrada cada segundo y cuando se alcanza el estado estacionario se agrega oligomicina (Oligo, 2.5 μM), que es un inhibidor de la ATPasa y permite revelar al consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP.

Finalmente, se agrega cianuro de potasio (KCN, 10mM) que es un inhibidor del citocromo oxidasa (COXIV) y permite revelar el consumo de oxígeno no mitocondrial (Fig. 6.6.1).



$$\begin{aligned} \frac{dO_2}{dt} total &= OxPhos + Fuga + No\ mitocondrial \\ \frac{dO_2}{dt} Oligo &= Fuga + No\ mitocondrial \\ \frac{dO_2}{dt} KCN &= No\ mitocondrial \\ OxPhos &= \frac{dO_2}{dt} total - \frac{dO_2}{dt} Oligo \end{aligned}$$

Figura 6.6.1. Determinación del flujo de fosforilación oxidativa (OxPhos) por respirometría de alta resolución. A) Trazo en tiempo real del consumo de oxígeno en células intactas de PC3. En azul se muestra un trazo con la concentración de oxígeno (μM) presente en la cámara del Oroboros, con flechas se indica el momento de la adición de las células (1mg/mL), oligomicina ($2.5\mu\text{M}$) y cianuro de potasio (10mM). En rojo se muestra la pendiente resultante de la adición de los diferentes compuestos durante el experimento. B) Ecuaciones utilizadas para interpretar los trazos de la respirometría y calcular el flujo de OxPhos.

6.7 Potencial intermembranal mitocondrial

El potencial intermembranal mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$) fue estimado utilizando a la rodamina 6G (R6G), el cuál es un catión lipofílico capaz de acumularse en la matriz mitocondrial. La acumulación de R6G en la matriz mitocondrial provoca una disminución en la fluorescencia de R6G y la adición de un desacoplante mitocondrial (Ej. CCCP) induce la salida de R6G y un incremento súbito de la fluorescencia. La diferencia de la fluorescencia (ΔF) antes y después de la adición del desacoplante mitocondrial, se utiliza como un parámetro que refleja $\Delta\Psi\text{m}$ (Fig. 6.7.1) (Rodríguez, 2010).

El protocolo seguido para la estimación de $\Delta\Psi\text{m}$ comprende la adición de R6G ($0.25\mu\text{M}$) a la cámara del Oroboros (acoplando el módulo O2K-fluorescence LED2) y se esperan unos minutos a que se establezca la señal, posteriormente, se adicionan células intactas de PC3 (0.5mg/mL de proteína total) y se deja estabilizar la señal. Finalmente, se adiciona CCCP ($2.5\mu\text{M}$) y se registra la señal de fluorescencia hasta que alcanza el máximo (Fig. 6.7.1).

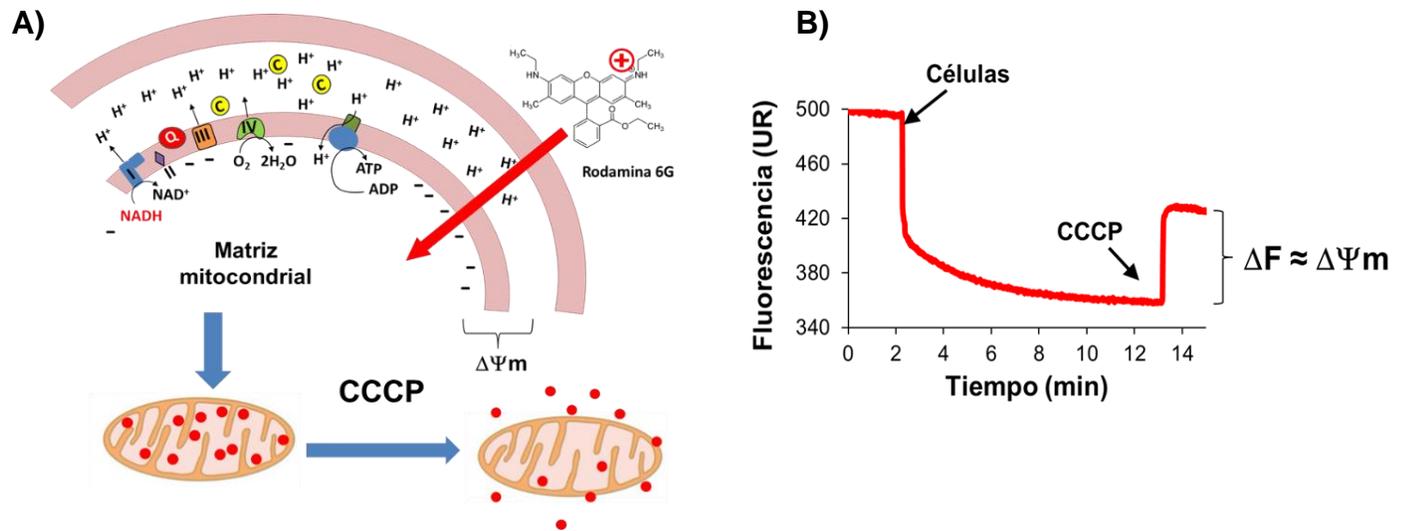


Figura 6.7.1 Estimación del potencial transmembranal mitocondrial. A) La rodamina 6G (R6G) es un catión lipofílico capaz de acumularse en la matriz mitocondrial, la adición de un desacoplante mitocondrial como el CCCP provoca que la R6G difunda libremente. B) Curso temporal de la fluorescencia de R6G en presencia de células intactas de PC3, la fluorescencia disminuye como efecto de la acumulación de R6G en la matriz mitocondrial. La adición de CCCP induce un incremento súbito de la fluorescencia y el ΔF es directamente proporcional a $\Delta\Psi_m$.

7. RESULTADOS

7.1. Velocidad de crecimiento

La constante de velocidad de proliferación (μ) y el tiempo de duplicación (T_d) de las líneas celulares (PC3 y DU145) es similar y no se observan diferencias estadísticamente significativas (Tabla 7.1) (Fig. 7.1.1)

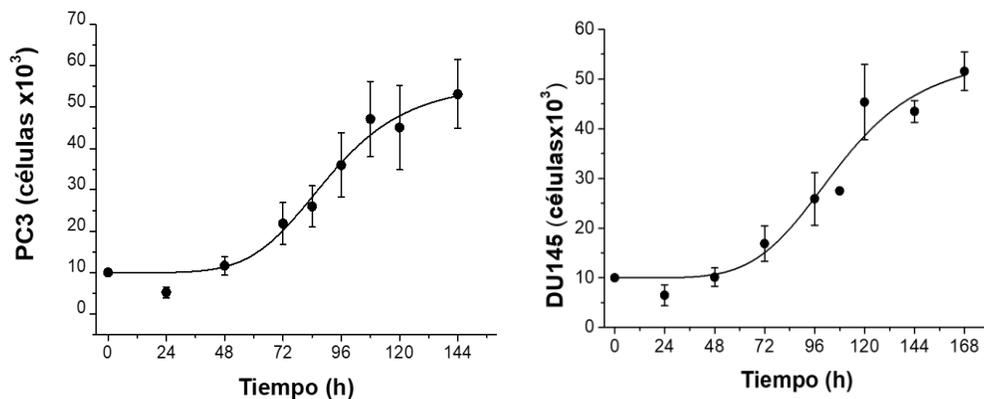


Figura 7.1.1. Velocidad de crecimiento de las líneas celulares PC3 y DU145, se incubaron 10,000 células en una placa de 96 pozos por 6 y 7 días respectivamente. $P < 0.05$, t-Student $N = 8$

Tabla 7.1. Tiempo de duplicación en días de las líneas celulares PC3 y DU145.

Línea celular	μ (d^{-1})	Td (d)	Max. Densidad ($Cel \times 10^3/cm^2$)
PC3	0.6 ± 0.15	1.3 ± 0.1	138 ± 24
DU145	0.4 ± 0.1	1.6 ± 0.3	162 ± 28

$P < 0.05$, t-Student $N = 8$

7.2 Flujo de OxPhos y potencial mitocondrial

La función mitocondrial fue evaluada por que la cadena de transporte de electrones es una fuente importante de ROS (Moreno-Sánchez *et al.* 2013), por lo que la determinación del flujo de OxPhos y del potencial transmembranal mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) podían darnos una pista de cómo se encontraba el bloque productor de ROS. Los resultados de la función mitocondrial en PC3 y DU145 (Tabla 7.2.1) muestran que los parámetros de ambas líneas son estadísticamente iguales, por lo que no hay evidencia de que cambios en la función mitocondrial expliquen la diferencia en la concentración de ROS que tienen ambas líneas.

Tabla 7.2.1 Parámetros de función mitocondrial

Parámetro	PC3	DU145
Consumo Tot O ₂ (ngAtO/min/mg)	17 ± 6	13 ± 2
OxPhos (ngAtO/min/mg)	7 ± 1	7 ± 2
Fuga (ngAtO/min/mg)	5 ± 2	2 ± 0.5
Consumo No mitocondrial O ₂ (ngAtO/min/mg)	5 ± 3	4 ± 2
$\Delta\Psi_m$ (U.R)	93 ± 46.5	145 ± 69.5

N=3 P<0.05 PC3 vs DU145 (t-Student).

7.3 Producción de ROS

Los experimentos con dihidroetidio (DHE) muestran que la velocidad basal de producción de ROS (dROS/dt/10⁶ células) en la línea celular PC3 es significativamente mayor y se observa que aumenta aproximadamente 3.5 veces (p<0.05, t-Student) comparada con DU145 (Fig. 7.3.1).

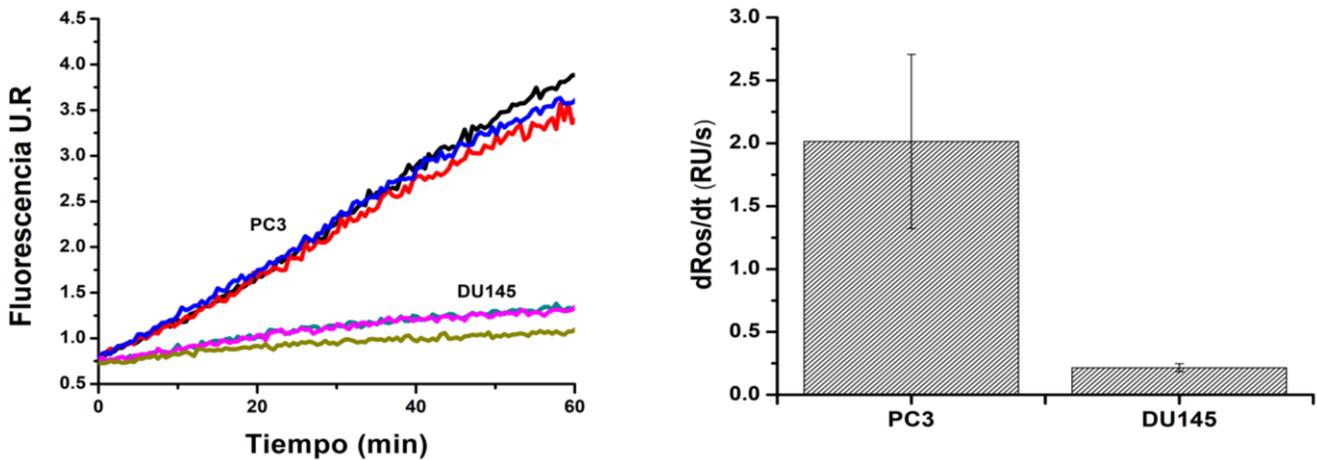


Figura 7.3.1 Caracterización de la producción de ROS en las líneas PC3 y DU145. La velocidad de producción de ROS (d ROS/d t) es 3.5 veces mayor en PC3 que en DU145. N=3, p<0.05, t-Student.

Una vez realizados los experimentos de la cinética de producción de ROS, se obtuvieron imágenes con un microscopio de epifluorescencia (Invitrogen™ EVOS™) donde claramente se puede observar el aducto de DHE en el núcleo de las células PC3 pero no en los núcleos de DU145 (Fig.7.3.2).

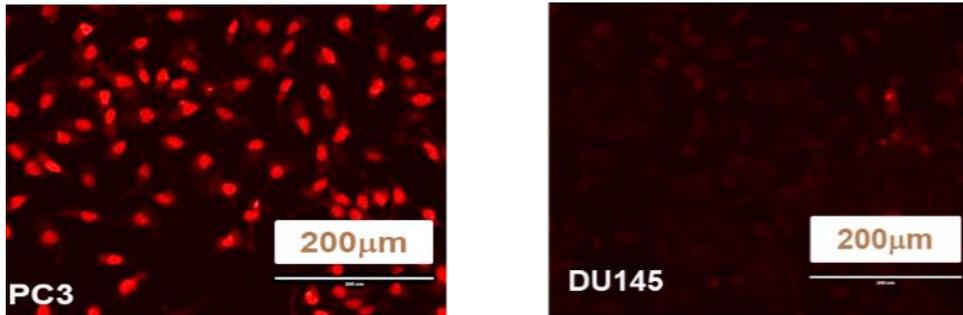


Figura 7.3.2. Imágenes obtenidas con un microscopio de epifluorescencia x40 (Invitrogen™ EVOS™) donde se observa la fluorescencia del aducto de DHE en células PC3 y DU145.

7.4 Sistema enzimático antioxidante

En la tabla 7.4.1 se muestra la actividad de 5 enzimas que conforman el sistema antioxidante. En general PC3 muestra una menor actividad de las enzimas que están involucradas en el uso del glutatión (GSH), sin embargo, con una actividad 5 veces menor en comparación con DU145. Otra diferencia significativa se encontró en la actividad de la catalasa, donde su actividad es dos veces menor en DU145 comparada con PC3.

Tabla 7.4.1 Enzimas antioxidantes de PC3 y DU145

	SOD (mU/mg)	CAT (k/mg)	GPx (mU/mg)	GRed (mU/mg)	GST (mU/mg)
PC3	12.5 ± 0.5	0.7 ± 0.05	8 ± 5	67 ± 5	27 ± 5
DU145	10 ± 1.5	0.3 ± 0.1*	13 ± 3	300 ± 21*	44.5 ± 9

N=3 *P<0.05 PC3 vs DU145 (t-Student)

7.5 Expresión de las proteínas del sistema antioxidante de DU145 y PC3

Las enzimas antioxidantes a nivel de proteína se estimaron a través de la técnica de Western Blot (Fig. 7.5.1). En general se puede observar una buena correlación entre el nivel de proteína y la actividad de las enzimas, por ejemplo, el nivel de proteína de la catalasa (CAT) es menor en DU145 comparado con PC3 al igual que la actividad enzimática. Por otro lado, el nivel de proteína del glutatión peroxidasa (GPX-1) y de

superóxido dismutasa (SOD-1) es muy parecido en ambas líneas celulares al igual que la actividad enzimática.

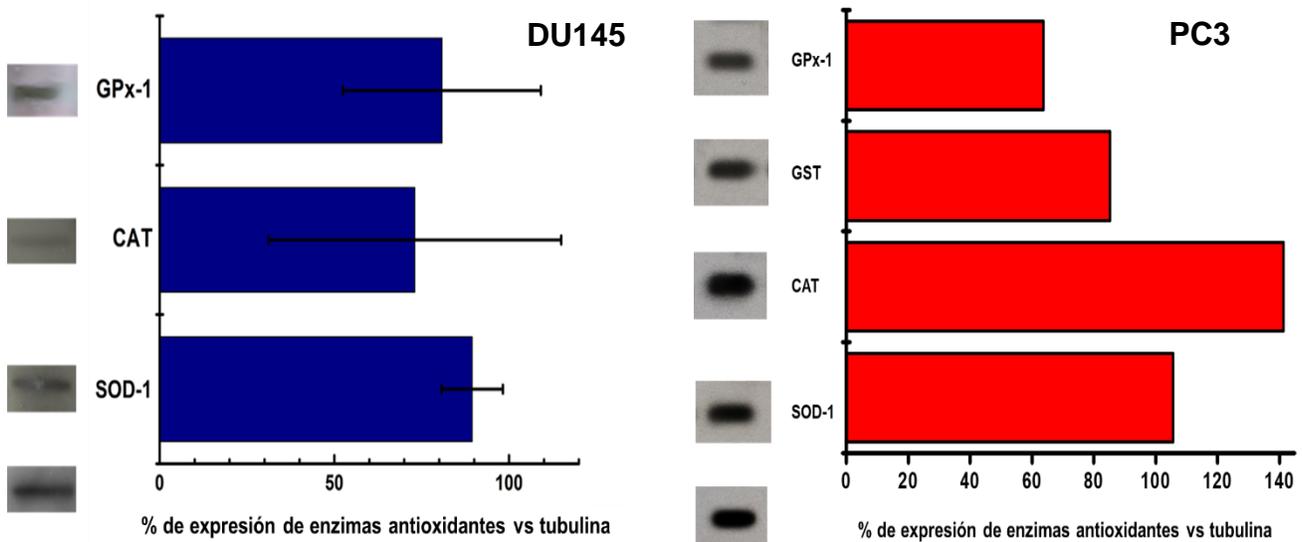


Figura 7.5.1 Expresión de las proteínas del sistema antioxidante en DU145 (n=3) y PC3 (n=1).

7.6 Estabilización de HIF1 α en normoxia e hipoxia en las líneas celulares PC3 y DU145.

Dado que la tasa neta de producción de ROS en PC3 es 3.5 veces mayor a la producción en DU145, existe la posibilidad de que los niveles de HIF-1 α sean mayores en PC3 comparados con los presentes en DU145, lo que podría explicar en parte el mayor grado de malignidad de esta línea celular. En la figura 7.6.1 se muestra la expresión de HIF1- α en ambas líneas celulares en condiciones de normoxia y en condiciones de hipoxia (0.1% de O₂) como control positivo de estabilización de HIF1- α .

Lo que se puede observar en los resultados es que en condiciones de normoxia existe una estabilización de HIF-1 α para la línea celular PC3, pero no así para DU145, lo que es congruente con los niveles en la concentración de ROS que cada línea celular posee.

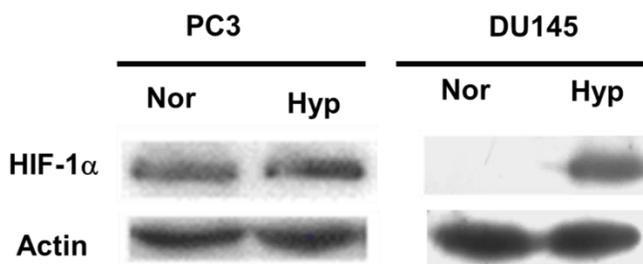


Figura 7.6.1 Expresión de la proteína HIF-1 α en normoxia e hipoxia en células PC3 y DU145 (N=3 *P<0.05 PC3 vs DU145 t-Student)

8. DISCUSIÓN

En lo que respecta a la caracterización del sistema antioxidante, los resultados indican que DU145 tienen una menor actividad de catalasa, lo cual es consistente con los niveles de proteína reportados previamente (Chowdhury *et al.* 2007). La actividad de GRed es cinco veces menor en PC3 comparada con DU145, lo que sugiere que esta línea celular tiene una menor capacidad para reducir a GSSG, lo cual es muy importante para mantener el estado redox celular. La determinación de GSH y GSSG es necesario para sustentar la idea de que el estado redox en PC3 se encuentra desbalanceado hacia un estado más oxidante.

Velocidad de producción de ROS

El análisis de la velocidad de producción de las ROS demuestra que la línea celular PC3 tiene una mayor producción basal de ROS (~3 veces Fig. 7.3.1), lo cual concuerda con lo reportado previamente en la literatura (Kumar *et al.* 2008). Este resultado nos llevó a hipotetizar que la elevada concentración de ROS se podía deber a dos factores, una mayor producción y/o una menor tasa de desintoxicación (defensa antioxidante).

En este trabajo se llevó a cabo la determinación de la función mitocondrial (bloque productor de ROS), así como de la defensa antioxidante (bloque consumidor de ROS). Los parámetros de flujo de OxPhos, así como de la fuga de protones y el potencial transmembranal no mostraron diferencias significativas en las dos líneas celulares, lo cual sugiere que la velocidad de producción de ROS mitocondrial es igual en las dos líneas celulares. Es importante notar que la cadena de transporte de electrones no es la única fuente de ROS (Valko *et al.* 2007) y hay algunos datos que sugieren que las NADPH oxidasas (Nox) son una fuente importante de ROS en PC3 (Kumar *et al.* 2008), sin embargo, estas evidencias han sido obtenidas utilizando inhibidores químicos y no se sabe la especificidad de los mismos, por lo que estas evidencias no son concluyentes.

Estabilización de HIF1 α

La estabilización de HIF-1 α en PC3 bajo condiciones de normoxia ha sido descrita por otros grupos de trabajo (Ranasinghe *et al.* 2013), sin embargo, el mecanismo de estabilización no ha sido descrito por completo (Ranasinghe *et al.* 2015). Existen tres modelos para explicar la estabilización en normoxia de HIF1 α (Marín-Hernández *et al.* 2009) (Fig. 2.4.1): 1) inhibición de las PDHs por compuestos monocarboxílicos (lactato y piruvato) y dicarboxílicos (fumarato y succinato); 2) inactivación de las PDHs por especies reactivas de oxígeno (ROS). Las PDHs poseen un átomo de hierro en estado ferroso (Fe²⁺) en su sitio catalítico y las ROS pueden oxidar al hierro a su estado férrico (Fe³⁺) y producir la inactivación de la enzima; 3) mutaciones en el gen de VHL que evitan la ubiquitinación de HIF1 α y por lo tanto su degradación.

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la elevada tasa de producción de ROS (debido en parte por la baja actividad de GRed) puede ser responsable de la

estabilización de HIF-1 α en condiciones de normoxia en la línea celular PC3, por lo que la administración de antioxidantes y/o la sobre expresión de GRed en PC3 podría disminuir la estabilización de HIF-1 α y la malignidad de esta línea celular.

9. CONCLUSIONES

- La actividad de las enzimas antioxidantes es muy parecida en PC3 y DU145 con excepción de la actividad de GRed. La actividad de GRed es aproximadamente 5 veces mayor en la línea celular DU145 en comparación con la actividad en PC3, por lo que la baja actividad de esta enzima en PC3 podría ser en parte responsable de los elevados niveles de ROS en esta línea celular.
- La velocidad basal de producción de ROS en PC3 (línea celular metastásica) es 3 veces mayor en comparación con DU145 (línea celular poco metastásica), lo cual podría explicar la diferencia en malignidad de ambas líneas celulares.
- Los biomarcadores de función mitocondrial (OxPhos, fuga de protones y potencial mitocondrial) fueron iguales en ambas líneas celulares, lo que sugiere que el bloque productor no es el que provoca la elevada tasa de producción de ROS en PC3.
- Los elevados niveles de ROS presentes en PC3 podrían explicar la estabilización de HIF-1 α en esta línea celular, lo que podría sentar las bases bioquímicas que expliquen el grado de malignidad en PC3.
- Los indicadores del estrés oxidante podrían ser una herramienta para establecer una estrategia terapéutica basada en el bloque consumidor ROS es sumamente importante evaluar el nivel de proteínas tanto como su actividad, así como también poder aumentar el desarrollo de biomarcadores que podrían resultar en mejorar estrategias para la quimio-prevención del CaP.

10. REFERENCIAS

- Abate-Shen, C., & Shen, M. M. (2000). Molecular Genetics of Prostate Cancer. *Genes & Development*, 14(19), 2410–2434.
- Akinloye, O., Adaramoye, O., & Kareem, O. (2009). Changes in Antioxidant Status and Lipid Peroxidation in Nigerian Patients with Prostate Carcinoma. *Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej*, 119(9), 526–532.
- Amin, M., Boccon-Gibod, L., Egevad, L., Epstein, J. I., Humphrey, P. A., Mikuz, G., Newling, D., Nilsson, S., Sakr, W., Srigley, J. R., Wheeler, T. M., & Montironi, R. (2005). Prognostic and Predictive Factors and Reporting of Prostate Carcinoma in Prostate Needle Biopsy Specimens. *Scandinavian Journal of Urology and Nephrology. Supplementum*, (216), 20–33.
- Arsova-Sarafinovska, Z., Eken, A., Matevska, N., Erdem, O., Sayal, A., Savaser, A., Banev, S., Petrovski, D., Dzikova, S., Georgiev, V., Sikole, A., Ozgök, Y., Suturkova, L., Dimovski, A. J., & Aydin, A. (2009). Increased Oxidative/Nitrosative Stress and Decreased Antioxidant Enzyme Activities in Prostate Cancer. *Clinical Biochemistry*, 42(12), 1228–1235.
- Aydin, A., Arsova-Sarafinovska, Z., Sayal, A., Eken, A., Erdem, O., Erten, K., Ozgök, Y., & Dimovski, A. (2006). Oxidative Stress and Antioxidant Status in Non-Metastatic Prostate Cancer and Benign Prostatic Hyperplasia. *Clinical Biochemistry*, 39(2), 176–179.
- Baker, A. M., Oberley, L. W., & Cohen, M. B. (1997). Expression of Antioxidant Enzymes in Human Prostatic Adenocarcinoma. *The Prostate*, 32(4), 229–233.
- Banerjee, P. P., Banerjee, S., Brown, T. R., & Zirkin, B. R. (2018). Androgen Action in Prostate Function and Disease. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 6(2), 62–77.
- Battisti, V., Maders, L. D., Bagatini, M. D., Reetz, L. G., Chiesa, J., Battisti, I. E., Gonçalves, J. F., Duarte, M. M., Schetinger, M. R., & Morsch, V. M. (2011). Oxidative Stress and Antioxidant Status in Prostate Cancer Patients: Relation to Gleason Score, Treatment and Bone Metastasis. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*, 65(7), 516–524.
- Berlett, B. S., & Stadtman, E. R. (1997). Protein Oxidation in Aging, Disease, and Oxidative Stress. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(33), 20313–20316.
- Bienert, G. P., Møller, A. L., Kristiansen, K. A., Schulz, A., Møller, I. M., Schjoerring, J. K., & Jahn, T. P. (2007). Specific Aquaporins Facilitate the Diffusion of Hydrogen Peroxide Across Membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(2), 1183–1192.
- Bolton, E. C., So, A. Y., Chaivorapol, C., Haqq, C. M., Li, H., & Yamamoto, K. R. (2007). Cell- and Gene-Specific Regulation of Primary Target Genes by the Androgen Receptor. *Genes & development*, 21(16), 2005–2017.
- Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. (2018). Global Cancer Statistics 2018: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 68(6), 394-424.
- Brioukhanov, A. L., & Netrusov, A. I. (2004). Catalase and Superoxide Dismutase: Distribution, Properties, and Physiological Role in Cells of Strict Anaerobes. *Biochemistry. Biokhimiia*, 69(9), 949–962.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J. M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C. J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R. K., Collen, D., & Keshert, E. (1998). Role of HIF-1alpha in Hypoxia-Mediated Apoptosis, Cell Proliferation and Tumour Angiogenesis. *Nature*, 394(6692), 485–490.

CANIFARMA (2018). [https://codigof.mx/mueren-en-mexico-mas-de-19-hombres-al-Día-por-cáncer-de-próstata/Instituto Nacional del Cáncer. Cáncer de próstata. 9 julio 2019, Instituto Nacional del Cáncer \(INC\) Sitio web: https://medlineplus.gov/spanish/prostatecancer.html](https://codigof.mx/mueren-en-mexico-mas-de-19-hombres-al-Día-por-cáncer-de-próstata/Instituto Nacional del Cáncer. Cáncer de próstata. 9 julio 2019, Instituto Nacional del Cáncer (INC) Sitio web: https://medlineplus.gov/spanish/prostatecancer.html).

Cofey D (1994) ¿Qué es la Próstata yCuál es su Función? New Hampshire: Manual De Andrología de la Sociedad Americana de Andrología. Segunda Edición. (traducción) 21-24.

D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as Signalling Molecules: Mechanisms That Generate Specificity in ROS Homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 813–824.

De Marzo AM, Nelson WG, Meeker AK, Coffey DS (1998) Stem Cell Features of Benign and Malignant Prostate Epithelial Cells. *J Urol* 160: 2381-2392.

De Marzo, A. M., Platz, E. A., Sutcliffe, S., Xu, J., Grönberg, H., Drake, C. G., Nakai, Y., Isaacs, W. B., & Nelson, W. G. (2007). Inflammation in Prostate Carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 7(4), 256–269.

Denmeade, SR y Isaacs, JT (2002). Antecedentes de Tratamiento Contra el Cáncer de Próstata. *Reseñas De La Naturaleza. Cáncer*, 2 (5), 389–396.

Deponte M. Glutathione Catalysis and the Reaction Mechanisms of Glutathione-Dependent Enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 1830(5):3217-66.

Feldman, B. J., & Feldman, D. (2001). The Development of Androgen-Independent Prostate Cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 1(1), 34–45.

Fujiwara, S., Nakagawa, K., Harada, H., Nagato, S., Furukawa, K., Teraoka, M., Seno, T., Oka, K., Iwata, S., & Ohnishi, T. (2007). Silencing Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Inhibits Cell Migration and Invasion Under Hypoxic Environment in Malignant Gliomas. *International Journal of Oncology*, 30(4), 793–802.

Gao, W., Bohl, C. E., & Dalton, J. T. (2005). Chemistry and Structural Biology of Androgen Receptor. *Chemical Reviews*, 105(9), 3352–3370.

Gleason, D. F., & Mellinger, G. T. (1974). Prediction of Prognosis for Prostatic Adenocarcinoma by Combined Histological Grading and Clinical Staging. *The Journal of Urology*, 111(1), 58–64.

Halliwell, B. & Gutteridge, J.M.C. (2015) Free Radicals in Biology and Medicine. 5th Edition, Oxford University Press, New York.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011; 144 (5): 646-74.

Harris, M. T., Feldberg, R. S., Lau, K. M., Lazarus, N. H., & Cochrane, D. E. (2000). Expression of Proinflammatory Genes During Estrogen-Induced Inflammation of the Rat Prostate. *The Prostate*, 44(1), 19–25.

Hatziapostolou, M., Polytarchou, C., Katsoris, P., Courty, J., & Papadimitriou, E. (2006). Heparin Affin Regulatory Peptide/Pleiotrophin Mediates Fibroblast Growth Factor 2 Stimulatory Effects on Human Prostate Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32217–32226.

Ho, E., Boileau, TW-M. & Bray, TM (2004). Dietary Influences on Endocrine-Inflammatory Interactions in The Development of Prostate Cancer. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 428 (1), 109-117.

Hrycay, E. G., & Bandiera, S. M. (2015). Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Advances in Pharmacology (San Diego, Calif.)*, 74, 35–84.

Instituto Nacional del Cáncer (INCAN). Consulta de datos médicos (PDQ). Tratamiento del cáncer de próstata - Versión para profesionales de salud. 2019. Consultado en <https://www.cancer.gov/types/prostate/hp/prostate-treatment-pdq>. El 9 de abril de 2019.

IQWiG (Institute for Quality and Efficiency in Health Care). (2006). How does the prostate work? 2011 Feb 15 [Updated 2016 Aug 23]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279291/>.

Kanwal, R., Pandey, M., Bhaskaran, N., MacLennan, G. T., Fu, P., Ponsky, L. E., & Gupta, S. (2014). Protection Against Oxidative DNA Damage and Stress in Human Prostate by Glutathione S-Transferase P1. *Molecular Carcinogenesis*, 53(1), 8–18.

Kearns D.R (1971). Physical and Chemical Properties of Singlet Molecular Oxygen. *Chemical Reviews*, 71 (4), 395-427.

Khandrika, L., Kumar, B., Koul, S., Maroni, P., & Koul, H. K. (2009). Oxidative Stress in Prostate Cancer. *Cancer Letters*, 282(2), 125–136.

Kobayashi, M., & Yamamoto, M. (2006). Nrf2–Keap1 Regulation of Cellular Defense Mechanisms Against Electrophiles and Reactive Oxygen Species. *Advances in Enzyme Regulation*, 46(1), 113–140.

Konigsberg Fainstein, M. (2008). Radicales Libres y Estrés Oxidativo: Aplicaciones Médicas. *México: Editorial El Manual Moderno*.

Krumova K. and Cosa G. (2016). Chapter 1: Overview of Reactive Oxygen Species, in Singlet Oxygen: *Applications in Biosciences and Nanosciences*, 1(1), 1-21.

Kumar B, Koul S, Khandrika L, Meacham RB, Koul HK. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Res*. 2008; 68(6): 1777-85.

Laing, M. (1989). The Three Forms of Molecular Oxygen. *Journal of Chemical Education*, 66(6), 453.

Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., & Seliger, B. (2015). Hydrogen Peroxide - Production, Fate and Role in Redox Signaling of Tumor Cells. *Cell Communication and Signaling: CCS*, 13, 39.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry*, 193(1), 265–275.

Manda, G., Nechifor, M., & Neagu, T. (2009). Reactive Oxygen Species, Cancer and Anti-Cancer Therapies. *Current Chemical Biology*, 3, 22-46.

Marín-Hernández A, Gallardo-Pérez JC, Ralph SJ, Rodríguez-Enríquez S, Moreno-Sánchez R. HIF-1 α Modulates Energy Metabolism in Cancer Cells by Inducing Over-Expression of Specific Glycolytic Isoforms. *Mini Rev Med Chem*. 2009; 9(9):1084-101.

Marklund, S. L., Holme, E., & Hellner, L. (1982). Superoxide Dismutase in Extracellular Fluids. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, 126(1), 41–51.

Martínez-Sámano J, Torres-Durán PV, Juárez-Oropeza MA. (2011) El Glutathion y Su Asociación con las Enfermedades Neurodegenerativas, la Esquizofrenia, el Envejecimiento y la Isquemia Cerebral. *Rev Educ Bioquímica*. Vol.30 (2):56- 67.

Miyake, H., Hara, I., Kamidono, S., & Eto, H. (2004). Oxidative DNA Damage in Patients with Prostate Cancer and its Response to Treatment. *The Journal of Urology*, 171(4), 1533–1536.

Moreno-Sánchez, R., Hernández-Esquível, L., Rivero-Segura, N. A., Marín-Hernández, A., Neuzil, J., Ralph, S. J., & Rodríguez-Enríquez, S. (2013). Reactive Oxygen Species are Generated by the Respiratory Complex II--Evidence for Lack of Contribution of the Reverse Electron Flow in Complex I. *The FEBS Journal*, 280(3), 927–938.

NIH (2019). <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/prostata/paciente/tratamiento-prostata> -pdq.

NCI (2021). <https://www.cancer.gov/types/prostate/patient/prostate-treatment-pdq>

Oh, B., Figtree, G., Costa, D., Eade, T., Hruby, G., Lim, S., Elfiky, A., Martine, N., Rosenthal, D., Clarke, S., & Back, M. (2016). Oxidative Stress in Prostate Cancer Patients: A Systematic Review of Case Control Studies. *Prostate International*, 4(3), 71–87.

Polytarchou, C., Hatzia Apostolou, M., & Papadimitriou, E. (2005). Hydrogen Peroxide Stimulates Proliferation and Migration of Human Prostate Cancer Cells Through Activation of Activator Protein-1 And Up-Regulation of The Heparin Affin Regulatory Peptide Gene. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(49), 40428–40435.

Radi R. (2018). Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23), 5839–5848.

Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Velázquez, S. C., Marín-Hernández, Á., Gallardo-Pérez, J. C., Robledo-Cadena, D. X., Hernández-Reséndiz, I., García-García, J. D., Belmont-Díaz, J., López-Marure, R., Hernández-Esquivel, L., Sánchez-Thomas, R., & Moreno-Sánchez, R. (2019). Resveratrol Inhibits Cancer Cell Proliferation by Impairing Oxidative Phosphorylation and Inducing Oxidative Stress. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 370, 65–77.

Rodríguez-Enríquez, S., Carreño-Fuentes, L., Gallardo-Pérez, J. C., Saavedra, E., Quezada, H., Vega, A., Marín-Hernández, A., Olín-Sandoval, V., Torres-Márquez, M. E., & Moreno-Sánchez, R. (2010). Oxidative Phosphorylation is Impaired by Prolonged Hypoxia in Breast and Possibly in Cervix Carcinoma. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(10), 1744–1751.

Roy, S., Kumaravel, S., Sharma, A., Duran, C. L., Bayless, K. J., & Chakraborty, S. (2020). Hypoxic Tumor Microenvironment: Implications for Cancer Therapy. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 245(13), 1073–1086.

Toivanen, R. y Shen, MM (2017). Prostate Organogenesis: Tissue Induction, Hormonal Regulation and Cell Type Specification. *Development (Cambridge, Inglaterra)*, 144 (8), 1382-1398.

Salceda, S., & Caro, J. (1997). Hypoxia-Inducible Factor 1alpha (HIF-1alpha) Protein is Rapidly Degraded by the Ubiquitin-Proteasome System under Normoxic Conditions. Its Stabilization by Hypoxia Depends on Redox-Induced Changes. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(36), 22642–22647.

Sies, H. (1986). Biochemistry of Oxidative Stress. *Angewandte Chemie International Edition in English*, 25(12), 1058–1071.

Sies, H. (1993). Strategies of Antioxidant Defense. *European Journal of Biochemistry*, 215(2), 213–219.

Slemc L, Kunej T (2016) Transcription Factor HIF1A: Downstream Targets, Associated Pathways, Polymorphic Hypoxia Response Element (HRE) Sites, And Initiative for Standardization of Reporting in Scientific Literature. *Tumor Biol.* 37: 14851-14861.

Stroppolo, M., Falconi, M., Caccuri, A. et al. (2001). Super Efficient Enzymes. *CMLS, Celular. Mol. Life Sci.* 58, 1451-1460.

Suzuki, S., Shiraga, K., Sato, S., Punfa, W., Naiki-Ito, A., Yamashita, Y., Shirai, T. y Takahashi, S. (2013). Apocynin, an NADPH Oxidase Inhibitor, Suppresses Rat Prostate Carcinogenesis. *La Ciencia Del Cáncer*, 104 (12), 1711-1717.

Tejero, I., Gonzalez-Lafont, A., Lluch, J. M., & Eriksson, L. A. (2007). Theoretical Modeling of Hydroxyl-Radical-Induced Lipid Peroxidation Reactions. *The Journal of Physical Chemistry*, 111(20), 5684–5693.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free Radicals and Antioxidants in Normal Physiological Functions and Human Disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44–84.

Van Holde K. E. (2002). A Hypothesis Concerning Chemistr-Limited Protein-Ligand Interactions. *Biophysical Chemistry*, 101-102, 249–254.

Wells, P. G., McCallum, G. P., Chen, C. S., Henderson, J. T., Lee, C. J., Perstin, J., Preston, T. J., Wiley, M. J., & Wong, A. W. (2009). Oxidative Stress in Developmental Origins of Disease: Teratogenesis, Neurodevelopmental Deficits, and Cancer. *Toxicological Sciences: An Official Journal of The Society of Toxicology*, 108(1), 4–18.

Wyant T, William G, McCullough ML, Makaroff L. (2020). ¿Qué es el cáncer? Agosto,2021, de American Cancer Society Sitio web: <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el>

Zelko, I. N., Mariani, T. J., & Folz, R. J. (2002). Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of The Cuzn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), And EC-SOD (SOD3) Gene Structures, Evolution, And Expression. *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3), 337–349.

Ziello, J. E., Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 Regulatory Pathway and its Potential for Therapeutic Intervention in Malignancy and Ischemia. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 80(2), 51–60.

Zhao, R. Z., Jiang, S., Zhang, L., & Yu, Z. B. (2019). Mitochondrial Electron Transport Chain, ROS Generation and Uncoupling (Review). *International Journal of Molecular Medicine*, 44(1), 3–15.

11. ANEXO 1 GENOTIPIFICACIÓN DE DU145

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA

Laboratorio de Diagnóstico Genómico

Periférico Sur 4809, Col. Arenal de Tepepan, Delegación Tlalpan,
México, D.F., C.P. 14610

Tel.: +52 (55) 53 50 19 37

www.inmegen.gob.mx

Identificación **LCH719-902-11**

Muestra analizada Cultivo celular

Línea celular identificada por el cliente como **DU 145 (ATCC® HTB-81™)**

<https://www.atcc.org/products/all/HTB-81.aspx#specifications>

ID Tubo entregado para analizar **DU-145 28/10/19**

INTERPRETACIÓN:

A partir de la muestra identificada como **DU-145 28/10/19 (LCH719-902-11)** se realizó la lisis celular para amplificar marcadores de tipo STR autosómicos y gen de la *Amelogenina*. En la electroforesis capilar se obtuvo un electroferograma de buena calidad que nombro sólo los alelos reportados en este documento.

En la muestra **DU-145 28/10/19 (LCH719-902-11)**, se observan **18 de los 19 alelos de los reportados para la línea celular humana DU 145 (ATCC® HTB-81™)**, por lo que se puede concluir que la muestra analizada contiene una clona de células de DU 145 (ATCC® HTB-81™), y no existe evidencia de que presente otro tipo de células humanas o que esté contaminada con otro tipo de células humanas.

Marcador	LCH719-902-11	DU 145
<i>D1S1258</i>	18 18	
<i>vWA</i>	17 18 19	17 18 19
<i>D16S539</i>	11 11	11 13
<i>CSF1PO</i>	10 11	10 11
<i>TPOX</i>	11 11	11 11
<i>D8S1179</i>	13 14	
<i>D21S11</i>	20 20	
<i>D18S51</i>	12 13	
<i>Penta E</i>	12 14	
<i>D2S441</i>	9 14	
<i>D19S433</i>	13 13	
<i>TH01</i>	7 7	T T
<i>FGA</i>	22 22	
<i>D22S1045</i>	18 18	
<i>D15S818</i>	10 10	10 13
<i>D13S317</i>	12 13 14	12 13 14
<i>D7S820</i>	7 10 11	T 10 11
<i>D6S1043</i>	11 11	
<i>D18S1248</i>	12 13	
<i>D1S1656</i>	15.0 16 17.3	
<i>D12S391</i>	17 18 20 21	
<i>D2S1338</i>	18 18	
<i>Penta D</i>	9 13	
<i>Amelogenina</i>	XY	XY

12. ANEXO 2 GENOTIPIFICACIÓN DE PC3

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA
Laboratorio de Diagnóstico Genómico
Periférico Sur 4809, Col. Arenal de Tepepan, Delegación Tlalpan,
México, D.F., C.P. 14610
Tel.: +52 (55) 53 50 19 37 www.inmegen.gob.mx

Identificación **LCH719-902-12**

Muestra analizada Cultivo celular

Línea celular identificada por el cliente como PC-3 (ATCC® CRL-1435™)

<https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1435.aspx#specifications>

ID Tubo entregado para analizar **PC-3 28/10/19**

INTERPRETACIÓN:

A partir de la muestra identificada como PC-3 28/10/19 (LCH719-902-12) se realizó la lisis celular para amplificar marcadores de tipo STR autosómicos y gen de la *Amelogenina*. En la electroforesis capilar se obtuvo un electroferograma de buena calidad que nombro sólo los alelos reportados en este documento.

Al analizar la muestra identificada como PC-3 28/10/19 (LCH719-902-12), se observan los 12 alelos reportados para la línea celular humana PC-3 (ATCC® CRL-1435™).

Marcador	LCH719-902-12	PC-3
<i>D3S1358</i>	16 18	
<i>vWA</i>	17 17	17 17
<i>D16S539</i>	11 11	11 11
<i>CSF1PO</i>	11 11	11 11
<i>TPOX</i>	8 9	8 9
<i>D8S1179</i>	13 13	
<i>D21S11</i>	20 20.2	
<i>D18S51</i>	14 15	
<i>Power E</i>	10 17	
<i>D2S441</i>	10 11	
<i>D19S433</i>	13.2 14	
<i>TH01</i>	6 7	6 7
<i>FGA</i>	24 24	
<i>D22S1045</i>	15 15	
<i>D5S818</i>	13 13	13 13
<i>D13S317</i>	11 11	11 11
<i>D7S820</i>	8 11	8 11
<i>D6S1043</i>	14 18	
<i>D10S1248</i>	16 18	
<i>D1S1656</i>	12 16	
<i>D12S891</i>	21 21	
<i>D2S1338</i>	18 20	
<i>Power D</i>	9 9	
<i>Amelogenina</i>	XX	XX

Realizaron el estudio: M. en GS. Anallely Muñoz Rivas y M. en C. Beatriz E. Villegas Torres